



Universidad Austral de Chile
Facultad de Ciencias Agrarias
Escuela de Ingeniería en Alimentos

**Estabilidad de pigmentos antioxidantes del
jugo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) como
potencial complemento de alimentos
funcionales**

Memoria presentada como parte de
los requisitos para optar al título de
Ingeniero en Alimentos.

Carolina de la Paz Jara Oyarzún

Valdivia – Chile

2013

PROFESOR PATROCINANTE:



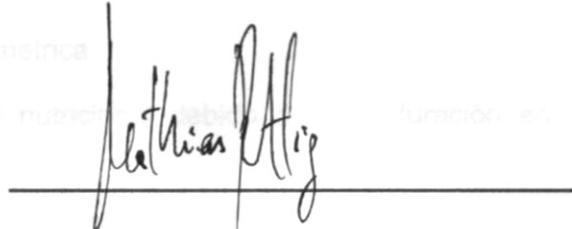
Sr. Rodrigo Acuña López
Ingeniero Agrónomo, M.Sc. Dr. Hort.
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal
Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile

PROFESOR CO PATROCINANTE:



Sr. Kong Shun Ah Hen
Ingeniero en Alimentos, Dipl. Ing., Dr. Ing.
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile

INFORMANTE:



Srta. Karen Mathias Rettig
Ingeniero en Alimentos

AGRADECIMIENTOS

Quisiera en primer lugar agradecer a mis padres Magaly y Víctor por el incondicional apoyo y paciencia que siempre obtuve de ellos, los cuales han sido muy importantes para mí

A mi hermano Cristian por su compañía en mi estadía estudiantil en la ciudad de Valdivia.

A la Srta. Karen Mathias por toda su ayuda constante durante todo este trabajo de tesis.

A mi profesor Patrocinante Sr. Rodrigo Acuña por su preocupación, entrega de conocimientos y disposición para ayudarme en todo momento.

A mi profesor Co Patrocinante Sr. Kong Shun por su participación y apoyo en este trabajo de tesis.

A todos mis profesores del Instituto por la formación profesional que me otorgaron durante los años que estuve en la Universidad.

Muchas gracias.....

Totales!!!

ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
	RESUMEN	1
	SUMMARY	3
1	INTRODUCCIÓN	5
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1	Alimentos funcionales	7
2.2	Conservación de hortalizas y sus procesados	8
2.2.1	Clorofilas y su relación con temperaturas	8
2.2.2	Clorofilas y su relación con el pH del conservante	9
2.2.3	Carotenoides	11
2.2.3.1	Efecto de la temperatura y pH	12
2.3	Lechuga: características nutritivas	14
2.3.1	El aumento en el consumo de frutas y hortalizas	14
2.3.1.1	Programa 5 al día	14
2.4	Procesos industriales para jugos de hortalizas	16
2.5	Metodología de análisis extracción de pigmentos	18
2.5.1	Absorbancia espectrofotométrica	18
2.6	Cambios en el potencial nutricional debido a la maduración en vegetales	20
2.6.1	Madurez fisiológica	20
2.6.2	Madurez de hortalizas de hojas verdes	21
3	MATERIAL Y MÉTODO	22
3.1	Materia prima	22
3.2	Materiales y equipos	22

3.2.1	Separación y procesados de hojas	22
3.2.2	Extracción jugo de lechuga	23
3.2.3	Determinación de pigmentos	23
3.3	Diseño experimental	24
3.3.1	Proceso elaboración jugo de lechuga	25
3.3.2	Metodología análisis de pigmentos en laboratorio	25
3.3.3	Extracción de pigmentos	25
3.3.4	Determinación cuantitativa de clorofilas y carotenoides	26
3.3.5	Tasa de degradación de pigmentos antioxidantes	27
4	PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS	28
4.1	Efecto de la temperatura sobre pigmentos	28
4.2	Efecto del conservante sobre pigmentos	31
4.3	Variabilidad de factores sobre pigmentos antioxidantes	34
4.3.1	Variabilidad de la concentración de los pigmentos: entre y en los días de almacenamiento	36
4.4	Tasa de degradación de pigmentos por día de almacenamiento y su estabilidad	38
5	CONCLUSIONES	41
6	BIBLIOGRAFIA	42
7	ANEXOS	46

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición nutritiva de la lechuga	15
2	Identificación de los tratamientos para elaboración de jugo de lechuga	24
3	Patrones de clorofilas y carotenoides	26
4	Cálculo de ecuaciones de pigmentos antioxidantes	26
5	Porcentajes de las sumas de cuadrados e interacciones de los factores sobre pigmentos antioxidantes	35
6	Efecto de los tratamientos sobre pigmentos entre y en los días de almacenamiento	37
7	Variación porcentual con respecto a la degradación sobre pigmentos antioxidantes	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura de clorofilas <i>a</i> y <i>b</i>	9
2	Degradación química de las clorofilas	11
3	Estructura química de principales carotenoides	13
4	Diagrama de flujo general de procesos industrialización de jugos de hortalizas	14
5	Identificación de pigmentos en espectro de absorbancia de una bebida verde	17
6	Coeficiente de variación porcentual en relación a la tasa de degradación de pigmentos antioxidantes	27
7	Pigmentos vs temperatura con niveles del conservante, en función de los días de almacenamiento	30
8	Pigmentos vs conservante con niveles de la temperatura, en función de los días de almacenamiento	33

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Diagrama de flujo proceso jugo de lechuga	46
2	Descripción línea de flujo jugo de lechuga	47
3	Metodología extracción de pigmentos	49

RESUMEN

Se caracterizó la estabilidad (dinámica) de pigmentos antioxidantes (clorofilas y carotenoides) en el zumo o jugo de Lechuga (*Lactuca sativa* L.) Cultivar *Justine*, bajo técnicas de almacenamiento para su uso como posible complemento de éstos compuestos, en la formulación de productos alimenticios funcionales. Se consideraron técnicas de conservación del jugo en base a variabilidad de pH (alcalino y ácido), como también temperaturas de almacenamiento durante diez días. Para ello se determinó la concentración de pigmentos fotosintéticos en el extracto de lechugas cosechadas con criterio de consumo fresco, a través de absorbancia espectrofotométrica, cumpliendo todos los protocolos para la extracción de pigmentos establecidos por el Método AOAC Oficial 942.04, obteniendo resultados de interés, de acuerdo a investigaciones presentes en la literatura.

El desarrollo del ensayo, se llevó a cabo en los laboratorios del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL), de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile. El diseño experimental utilizado fue un ANDEVA con arreglo factorial de 3x3 donde el primer factor correspondió a la temperatura de almacenamiento del jugo (5, 20 y 35°C) y el segundo al conservante (pH 4.5; 7.5; control), considerándose los controles respectivos. Los resultados con diferencias estadísticas (una vez comprobados los supuestos del ANDEVA), fueron diferenciados a través del test de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha=0,05$). La tasa de degradación media diaria y las dinámicas de pigmentos se establecieron para cada tratamiento (9) en almacenamiento.

Al medir las concentraciones de los pigmentos, se encontraron diferencias significativas en el efecto del conservante frente al efecto de la temperatura.

Los resultados obtenidos mostraron que los pigmentos fotosintéticos de interés antioxidante, mantuvieron mayor estabilidad en soluciones alcalinas y en condiciones de temperaturas distintas a la refrigeración (cerca de los 20 °C), identificándose además variabilidad asociada a las características propias de la molécula. El factor más importante dentro del almacenaje correspondió al conservante o efecto pH.

Los resultados también permiten considerar algunas técnicas de conservación, además de valorar el aporte de antioxidantes para compuestos nutracéuticos de interés nutritivo para la salud humana.

Sin embargo, otros estudios son necesarios para determinar niveles organolépticos e inocuidad, mejorar las técnicas de laboratorio para obtener resultados más concluyentes. y, ajustar por lo tanto, una condición más acercada a los criterios exigidos por la industria, en donde se busque formular alimentos funcionales ricos en clorofila y con pausada degradación.

Palabras claves: Jugo de lechuga, clorofilas, carotenoides, compuestos funcionales, espectrofotometría, temperatura, conservante.

SUMMARY

Characterized stability (dynamic) antioxidant pigments (chlorophylls and carotenoids) in the juice or juice, lettuce (*Lactuca sativa L.*) cultivar *Justine* under storage techniques for use as a possible complement of these compounds, in the formulation of products Functional Foods. Considered conservation techniques based juice pH variability (alkaline and acid), as well as storage temperatures for ten days. For this purpose, the concentration of photosynthetic pigments in the extract of lettuce harvested fresh consumption judiciously through spectrophotometric absorbance, fulfilling all protocols for the extraction of pigments established by the AOAC Official Method 942.04, obtaining interesting results of According to research reported in the literature.

Assay development was carried out in the laboratories of the Institute of Science and Technology of Food (ICYTAL), Faculty of Agricultural Sciences of the Universidad Austral de Chile. The experimental design was a factorial ANOVA 3x3 where the first factor corresponded to the juice storage temperature (5, 20 and 35 °C) and the second to the preservative (pH 4.5, 7.5, control), considering respective controls. The results were statistical differences (after checking the assumptions of ANOVA) were differentiated through the test of Tukey multiple comparisons ($\alpha = 0,05$). The average daily rate of degradation and dynamics of pigments were established for each treatment (9) storage.

By measuring the concentrations of the pigments, significant differences were found in the preservative effect compared to the temperature effect.

The results showed that the antioxidant interest photosynthetic pigments, maintained stability in alkaline solutions and different temperature conditions for cooling (close to 20 °C), also identified variability associated with the characteristics of the molecule. The most important factor in the preservative or storage corresponded to pH effect.

The results also allow us to consider some conservation techniques, and to assess the contribution of antioxidants for nutritional interest nutraceuticals for human health.

However, further studies are needed to determine organoleptic and safety levels, improve laboratory techniques to obtain more conclusive results. and adjust therefore approached one more condition to the standards required by the industry, where they seek to formulate functional foods rich in chlorophyll and slow degradation.

Keywords: Lettuce juice, functional compounds, chlorophylls, carotenoids spectrophotometry, temperature, preservative.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la demanda de productos funcionales es cada vez mayor, asociado a nuevos estilos de vida saludable de la vida moderna.

Los vegetales, buenos representantes de este tipo de alimentos, son un componente importante de la dieta, generalmente en asociación con un alimento proteico e hidrato de carbono. Además, no sólo proporcionan variedad de color y textura a las comidas, sino también nutrientes.

Más allá de lo anterior, la funcionalidad de los alimentos tiene que ver con propiedades diferentes a la nutrición misma (estructuralidad), las cuales han sido investigadas en los últimos años con interesantes perspectivas.

Se hace referencia a que productos funcionales son capaces de intervenir en procesos biológicos retardando por ejemplo, procesos degenerativos (oxidación) en las moléculas base, lo que induce al mantenimiento en el tiempo de la funcionalidad de la célula y órganos de quien los consume. Un grupo de alimentos que contienen este tipo de productos funcionales son principalmente las frutas y hortalizas, dentro de las cuales uno de los compuestos de mayor interés son las clorofilas presentes en magnitudes variables en las hortalizas de hojas.

Por otro lado, las condiciones productivas de las hortalizas en la zona sur de Chile, favorecen la producción de hortalizas de hojas, lo que ha sido ratificado por numerosas investigaciones locales.

Se propone que el jugo de lechuga puede responder en parte a la demanda de productos funcionales, convirtiéndose potencialmente en una alternativa agroindustrial y de economía local, promoviendo con ello el consumo de compuestos bioactivos como las clorofilas, que presentan resultados en favor de los nuevos estilos de vida.

Debido a lo anterior, en el presente ensayo se planteó la siguiente hipótesis:

“El jugo de lechuga mantiene sus compuestos bioactivos (pigmentos antioxidantes) durante diez días estables en almacenamiento”.

Para cumplir con ella se propusieron los siguientes objetivos:

Objetivo General

Caracterizar el jugo de Lechuga (*Lactuca sativa* L.) cv. *Justine*, bajo diferentes criterios de conservación como potencial complemento de productos funcionales, con énfasis en la concentración de pigmentos antioxidantes.

Objetivos Específicos

- Determinar el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre las clorofilas *a*, *b* y carotenoides en jugo de lechuga.
- Determinar el efecto de agentes conservantes ácidos y básicos sobre la concentración de clorofilas *a*, *b* y carotenoides, en almacenamiento para el jugo de lechuga.
- Determinar la tasa de degradación de pigmentos antioxidantes, para cada tratamiento por día de almacenamiento.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Alimentos funcionales

Se definen como aquellos alimentos, los que con independencia de aportar nutrientes, han demostrado científicamente que afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporcionan un mejor estado de salud y bienestar. Estos alimentos, además de ejercer un papel preventivo ya que reducen los factores de riesgo, provocan la disminución de enfermedades. Entre los alimentos funcionales más importantes, se encuentran aquellos enriquecidos en contenido de clorofilas (CARVAHLO, *et al.* 2006).

Los vegetales de hoja verde, constituyen componentes importantes de los alimentos funcionales por vitaminas, minerales y compuestos biológicamente activos que están asociadas con las actividades de la dieta (KIMURA y RODRIGUEZ – AMAYA, 2003).

Las hortalizas de hoja verde, contienen varios tipos de pigmentos fotosintéticos, que principalmente son clorofilas y carotenoides (KIMURA y RODRÍGUEZ-AMAYA, 2002). Además, la clorofila y la concentración de carotenoides se correlacionan con el potencial fotosintético de las plantas, proporcionan alguna indicación del estado fisiológico de ellas (GAMON y SURFUS, 1999). Sin embargo, el contenido de pigmentos en las plantas es importante, no sólo debido a la coloración y la función fisiológica, sino también por su papel reconocido en la salud (LIU *et al.*, 2007). Los carotenoides y clorofilas tienen un papel importante en la prevención de diversas enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, tales como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades crónicas (SANGEETHA y BASKARAN, 2010).

2.2 Conservación de hortalizas y sus procesados

Las hortalizas pueden consumirse en crudo o sometidos a distintos tratamientos, que dado su carácter perecedero, se podrían utilizar diversos métodos de conservación, los cuales pueden obtener diferentes productos hortícolas agradables al consumidor, que sean útiles para evitar las pérdidas de cosechas de diferentes hortalizas (CHEN y CHEN, 1993). Estos métodos se han ido desarrollando y podrían clasificarse así:

- Aplicación de calor: esterilización, pasteurización, deshidratación.
- Aplicación de frío: refrigeración y congelación.
- Aplicación de conservantes: ácidos y bases.

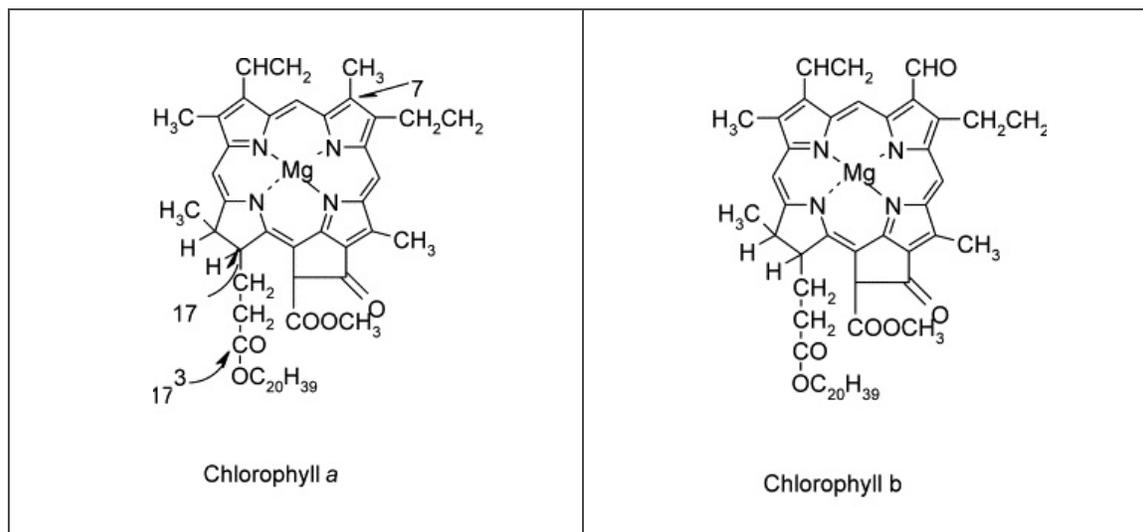
Habitualmente se efectúa un tratamiento previo a los distintos métodos de conservación que consiste en lavar bien la hortaliza, pelar en caso necesario, eliminar las partes no deseables y/o cortarla. A continuación se debe someter a pasteurización, (tratamiento con agua hirviente o vapor de agua) en condiciones de temperatura entre 60 y 85 °C durante un periodo de 20 a 30 min, con el fin de inhibir enzimas, eliminar gases, sustancias sápidas no deseables y producir ablandamiento de tejidos. (HERNÁNDEZ, 1999).

2.2.1 Clorofilas y su relación con temperaturas

Son pigmentos responsables del color verde característico de las hortalizas de hojas, altamente susceptibles a la degradación durante el procesamiento, lo que provoca cambios de color en los alimentos (SCHWARTZ y VON ELBA, 1983). La composición de estos pigmentos produce coloración específica en este tipo de alimentos, que es uno de los atributos visuales de calidad (XUE y YANG, 2009). Las principales clorofilas, presentes en las hortalizas, incluyen clorofila *a* y clorofila *b*, que en general se encuentran en la relación aproximada de 3:1 (FENNEMA, 2000). La clorofila *b* difiere de la clorofila *a*, por la presencia de un residuo de aldehído en lugar de un grupo metilo en la posición 7 de carbono, como se observa en la Figura 1.

Además de las diferencias estructurales entre la clorofila *a* y *b*, sus estabilidades térmicas también son diferentes. La clorofila *a*, tiende a ser térmicamente menos estable que la clorofila *b* (SCHOEFS, 2003).

FIGURA 1: Estructura de clorofilas *a* y *b*.



FUENTE: SCHOEFS, (2003).

La variación de la concentración de clorofila, se ha utilizado como una forma de medir calidad en los vegetales verdes (SWEENEY y MARTIN, 1961). Estudios han demostrado que el calentamiento excesivo de estos productos alimenticios causa pérdidas considerables en la calidad organoléptica de los alimentos (HAYAKAWA y MADERAS, 1977). En este aspecto, el proceso de escaldado, por ejemplo, inactiva clorofilasas y enzimas responsables del envejecimiento y pérdida rápida del color verde, pero al mismo tiempo, se produce la degradación de la clorofila (TIJKERS, 2001).

2.2.2 Clorofilas y su relación con pH del conservante

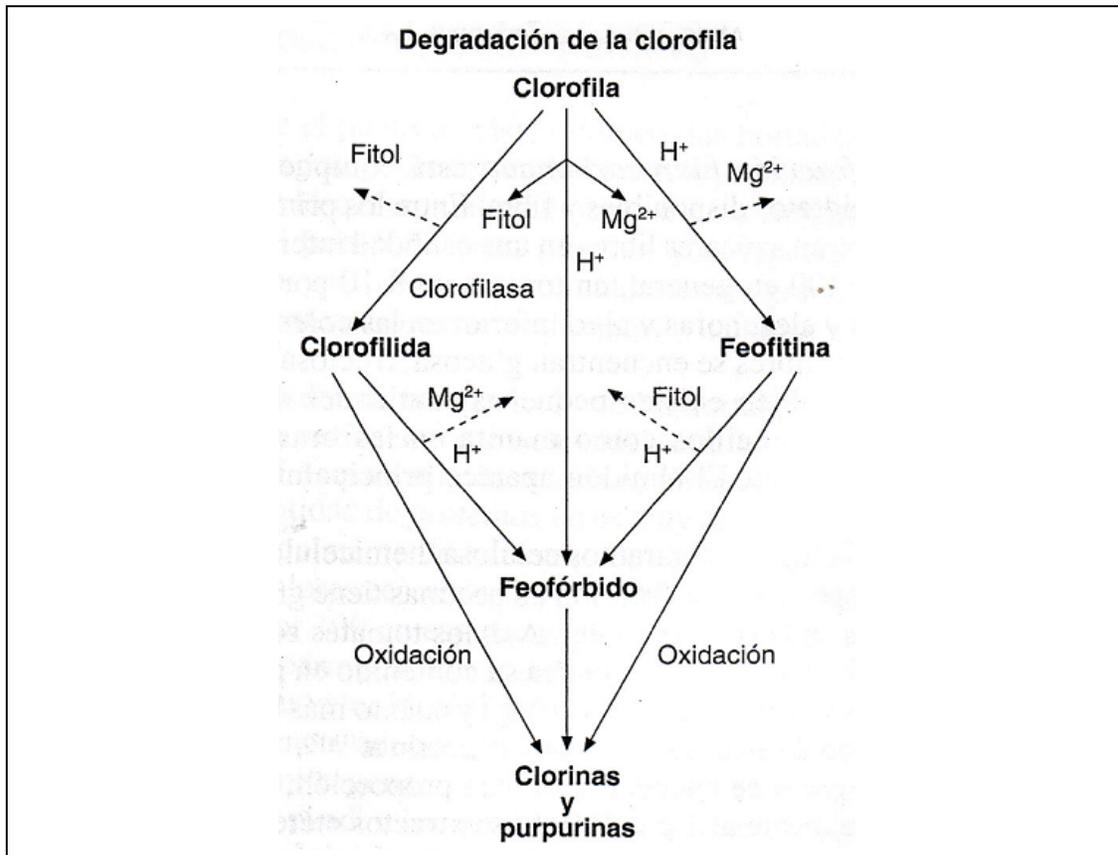
Las investigaciones realizadas han señalado, que la principal causa de la decoloración de los vegetales verdes durante el proceso, es la conversión de las clorofilas a feofitinas por la influencia del pH. El color verde de los vegetales se convierte en un color verde oliva cuando se calienta o se someten a condiciones ácidas (GUNAWAN y BARRINGER, 2000).

Durante esta reacción, los iones de hidrógeno pueden transformar las clorofilas a sus correspondientes feofitinas por la sustitución de los iones de magnesio en el anillo de porfirina (GANDUL y ROJAS, 1989). La conversión de la clorofila a feofitina y feoforbido resulta en un cambio de verde brillante a opaco de color verde oliva, que es en última instancia percibida por el consumidor como una pérdida de calidad (FRANCIS, 1964). La feofitina se ve degradada por efecto de la enzima clorofilasa como se puede observar en la Figura 2, esta degradación forma compuestos indeseables tales como feoforbido, el cual puede ser metabolizado a compuestos incoloros en tejido metabólicamente activo.

Estos pigmentos son sensibles a muchas reacciones de degradación química o enzimática. Las acciones simultáneas de enzimas, ácidos débiles, el oxígeno, la luz y el calor pueden conducir a la formación de un gran número de productos de degradación (DRAGAN, 2011).

Agentes alcalinizantes especializados en blanquear, tales como bicarbonato de sodio, han sido utilizados para elevar el pH de las hortalizas verdes y, por tanto, conservar la clorofila después del procesamiento (BLAIR y AYRES, 1943).

FIGURA 2: Degradación química de las clorofilas.



FUENTE: HERNANDEZ, (1999).

2.2.3 Carotenoides

Los pigmentos carotenoides constituyen un grupo de compuestos que realizan una serie de funciones que los hacen indispensables para la vida, fundamentalmente debido a las diferentes funciones que llevan a cabo en relación con la fotosíntesis (Britton, 1995). Durante muchos años, la importancia nutricional de los carotenoides se debió a que algunos de ellos poseen actividad *provitamínica A* (NYAMBAKA, y RYLEY, 2004). El interés por estos isoprenoides se haya multiplicado en los últimos años se ha debido a una gran variedad de estudios que parecen indicar que actúan como antioxidantes y que podrían ser beneficiosos para la prevención de diversas enfermedades crónicas humanas no transmisibles, aunque existe todavía cierta controversia al respecto.

En cualquier caso, las funciones y efectos debidos a estos pigmentos se deben a sus propiedades físico-químicas y que éstas a su vez son consecuencia de su estructura química (MELENDEZ-MARTINEZ *et al*, 2007).

Al ser pigmentos solubles en grasa, son responsables de los colores rojo, amarillo, naranja y morado de una variedad de frutas y vegetales, se dividen en los carotenos (por ejemplo, el licopeno y β -caroteno), que contienen sólo carbono y grupos de hidrógeno, y las xantofilas (por ejemplo, la luteína, la zeaxantina), que son sus derivados oxigenados (RUSSEL, 2002) tal como se aprecia lo mencionado anteriormente en la Figura 3.

Existe un interés en evaluar la biodisponibilidad de estos compuestos a partir de alimentos vegetales de hojas verdes debido a los muchos beneficios de salud propuestas relacionadas con su consumo. Esto se basa en que los antioxidantes y carotenoides son capaces de inactivar las especies reactivas de oxígeno y por lo tanto pueden ayudar a retrasar o prevenir el daño oxidativo, y por tanto degeneración celular. Además, la xantofila, luteína y zeaxantina, que se encuentra en los vegetales verdes o amarillo oscuro, existen de forma natural en altas concentración y se han propuesto para desempeñar un papel protector contra el desarrollo de la degeneración de la piel ocasionada por la edad. (RYAN, 2007).

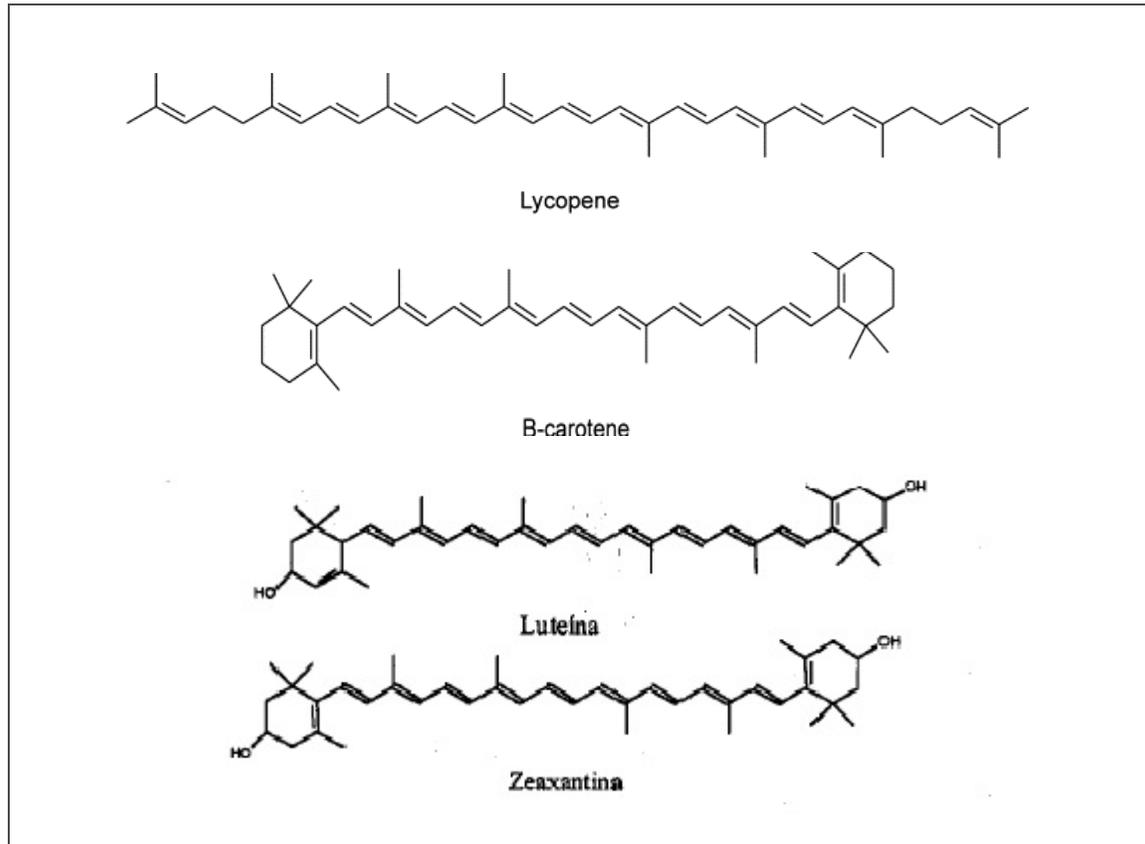
2.2.3.1 Efecto de la temperatura y pH

El escaldado industrial de los alimentos puede producir pérdidas cuali y cuantitativas inmediatas, por cual se ha empelado la técnica de la inactivación enzimática que previene pérdidas posteriores durante el procesado y almacenamiento. Otra forma de lograr resultados de conservación es usar la congelación o la adición de antioxidantes o la exclusión del oxígeno (vacío, envases impermeables al oxígeno, atmósfera inerte) que disminuyen las pérdidas durante el procesado y almacenamiento de los alimentos que contienen carotenoides (WAGNER y WARTHESEN, 2009).

Valores de pH extremos ácidos y alcalinos pueden provocar isomerizaciones *cis/trans* de ciertos dobles enlaces, reagrupamientos y desesterificaciones, lo cual debe ser tenido en cuenta a la hora de manipularlos en laboratorio con fines analíticos.

Así, por ejemplo, algunas xantofilas son excepcionalmente lábiles al medio alcalino, de ahí que a la hora de analizar fuentes naturales de éstos se recomienda no saponificar el extracto de pigmentos. Los factores que influyen en la degradación de éstos pigmentos, exposición a la luz, actividad de agua, temperatura, presencia de oxidantes o antioxidantes, presencia de sulfitos (HOWARD *et al.* 2006).

FIGURA 3: Estructura de principales carotenoides.



FUENTE: MELENDEZ-MARTINEZ, (2007).

2.3 Lechuga: Características nutritivas

MAROTO (2000), menciona que la lechuga es un alimento que aporta muy pocas calorías, alto porcentaje de agua (90-95%). Entre sus vitaminas se destacan el ácido fólico, la vitamina C y la provitamina A, ambas con acción antioxidante relacionadas con la prevención de enfermedades cardiovasculares, mal formaciones congénitas fetales, etc. Mientras que las vitaminas del grupo B, se encuentran pero en menores proporciones.

En cuanto, al aporte de minerales posee fósforo, potasio, hierro, calcio y fibra necesaria para el buen funcionamiento intestinal. Dentro de su aporte nutricional encontramos cantidades de beta-sitosterol, stigmasterol, encargados de participar en importantes funciones biológicas tales como la reducción de los niveles de colesterol y algunos tipos de cáncer (PAMPLONA, 1999).

Presentes investigaciones atribuyen a este alimento propiedades calmantes y sedantes debido a la presencia de sustancias como lactucina (que se encuentra en el látex de la lechuga). Esta sustancia es la responsable de características sensoriales como el sabor amargo de los alimentos que la contienen. (YAMASHITA y KAWANISHI, 2010).

2.3.1 El aumento en el consumo de frutas y hortalizas

2.3.1.1 Programa 5 al día

Una dieta rica en frutas y hortalizas ha sido recomendada, para reducir el riesgo de muchas enfermedades crónicas. Se recomienda que los adultos consuman al menos 400 g de frutas u hortalizas al día. (O.M.S., 2003 citado por UNGAR, *et al.* 2013).

El programa "5 al Día" se inició en 1991 en los Estados Unidos, para modificar los hábitos alimentarios de los adultos estadounidenses. El objetivo del programa es animar a la gente para comer al menos 5 porciones de frutas u hortalizas cada día. (NASKA *et al.* 2006).

Las recomendaciones de la guía de Alimentos de la Universidad de Canadá propone: jugo de frutas, jugo de verduras, ensaladas verdes, entre otros vegetales.

Se estableció el número de porciones por categoría de alimentos para cada día, la cual se define: una porción de frutas y hortalizas de tamaño medio 80 g, 125 ml de jugo de frutas u hortalizas, 250 g de ensalada, corresponden a las porciones recomendadas para la ingesta diaria. (HEIMENDINGER, 2009).

En el cuadro 1, se observa la dosis diaria recomendada del consumo de lechuga.

CUADRO 1: Composición nutritiva de la lechuga.

INFORMACION NUTRICIONAL		
Porción: 3/4 de taza (85 g)		
	100 g	1 porción
Energia (Kcal)	13	11
Proteínas (g)	1.3	1.1
Grasa total (g)	0.3	0.2
H de C disp. (g)	2.3	2.0
Sodio (mg)	1.8	1.5
Fibra (g)	5.0	4.3
Potasio (mg)	255.0	216.8
A retinol (mg)	97.0	82.45
C carotenos (mg)	8.0	6.8
Ac. Fólico (mg)	73.2	62.2
Calcio (mg)	22.0	18.7
Fosforo (mg)	23.0	19.5
Magnesio (mg)	8.9	7.5

FUENTE: INTA, (2011).

2.4 Procesos industriales para jugos de hortalizas

La industria hortofrutícola ha pasado a ser una de las principales actividades agrícolas, la cual ha incrementado su producción en los últimos años, debido al aumento en la superficie plantada y a la obtención de mejores rendimientos, logrados a través de mejoramientos en las técnicas de producción e introducción de nuevas especies (CRUESS, 1998).

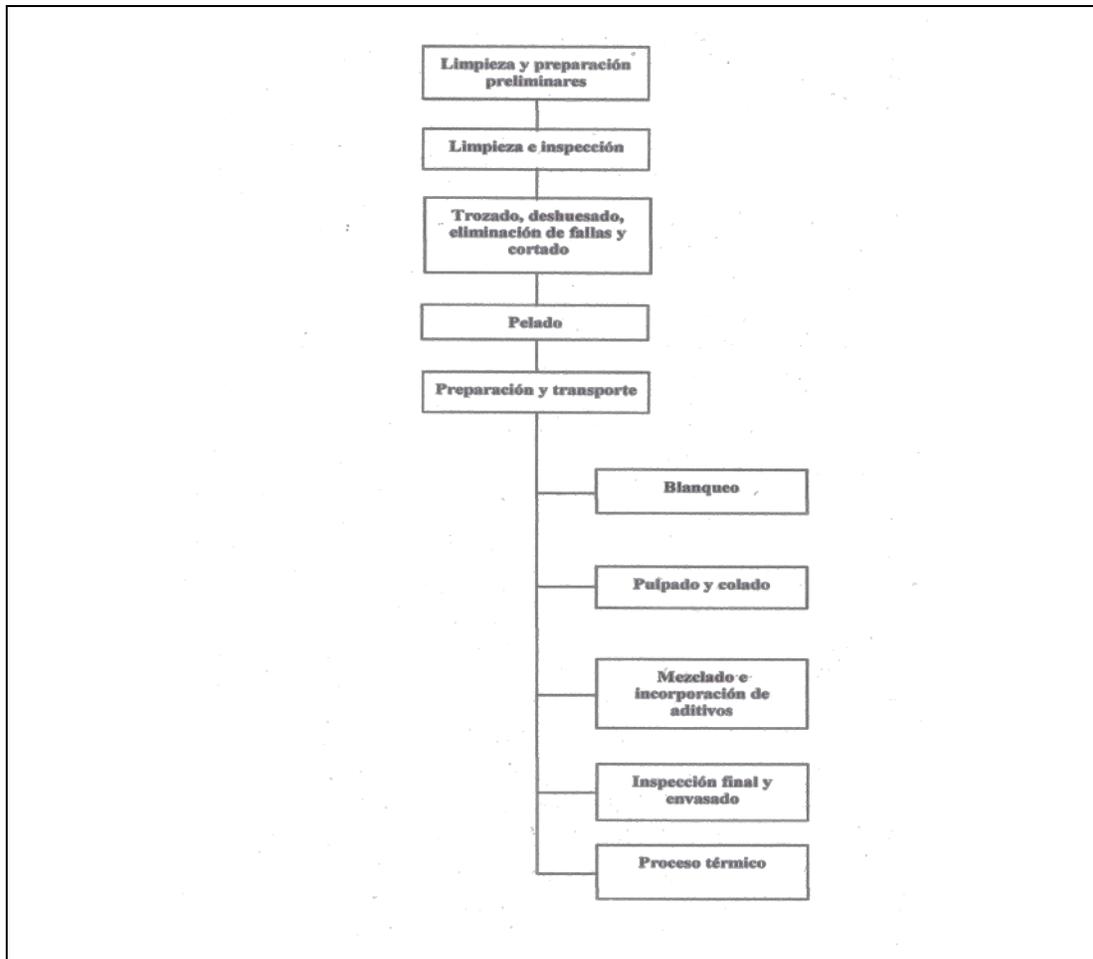
En términos generales, la producción hortofrutícola tiene dos destinos: el consumo en fresco y la industrialización. Dependiendo de su uso final, las hortalizas frescas pueden ser sometidas a diversos procesos industriales.

Para cada tipo de fruta y hortaliza hay uno o más procesos de industrialización, cada uno de los cuales presenta problemas específicos en relación al control de procesos y generación de residuos. (SACH, 2009).

Es posible identificar algunos procesos unitarios básicos, que se repiten en los diferentes procesos de industrialización y que tienen características similares. La Figura 4, presenta un esquema general de estos procesos que impulsan a obtener un óptimo producto final. A su vez la elaboración de jugos, requiere de operaciones tales como: extracción, tamizado y concentración.

La industria procesadora de jugos de hortalizas, genera importantes cantidades de residuos sólidos, con una alta carga de material orgánico. El carácter estacional de la industria hortofrutícola, se traduce en una alta generación de contaminantes en un período relativamente breve. El tratamiento de diversas especies, permiten mitigar en parte esta característica, haciendo posible un mejor uso de las instalaciones de las plantas procesadoras (HOMSI, 1996).

FIGURA 4: Diagrama de flujo general de procesos industrialización de jugos de hortalizas.



FUENTE: SACH, (2009).

Cabe mencionar la importancia de implementar estrategias que permitan obtener materias primas de alta calidad para ser procesadas y que le permitan al consumidor contar con un producto que sea inocuo. Una de las medidas más importantes implementadas, es la prevención en la contaminación de hortalizas con patógenos microbianos (hongos y bacterias) con residuos químicos y contaminantes físicos, los cuales deterioran el producto en cuanto a su calidad organoléptica y vida útil.

Entre las estrategias desarrolladas que permiten garantizar materias primas inocuas al consumidor, se cuentan a las buenas prácticas agrícolas (BPA); buenas prácticas de manufactura (BPM) y la implementación de análisis de peligros y puntos críticos de control (PCC) tal como describe (PIROVANI, 2001).

2.5 Metodología de análisis extracción pigmentos

Es de interés, disponer de procedimientos analíticos que son capaces de identificar rápidamente, con precisión y cuantificar los pigmentos presentes en los productos alimenticios. Existen metodologías, las cuales se pueden utilizar para el análisis de extracción de clorofilas, debiendo el pigmento ser extraído antes del análisis, a partir de una matriz compleja. Por lo tanto, se pide una extracción eficiente y con los respectivos protocolos analíticos. Dado que tanto las clorofilas y carotenoides, poseen una larga cadena de dobles enlaces conjugados que reaccionan fácilmente con el ácido, la base, el oxígeno y la luz (ANGUELOVA y WARTHESEN, 2000).

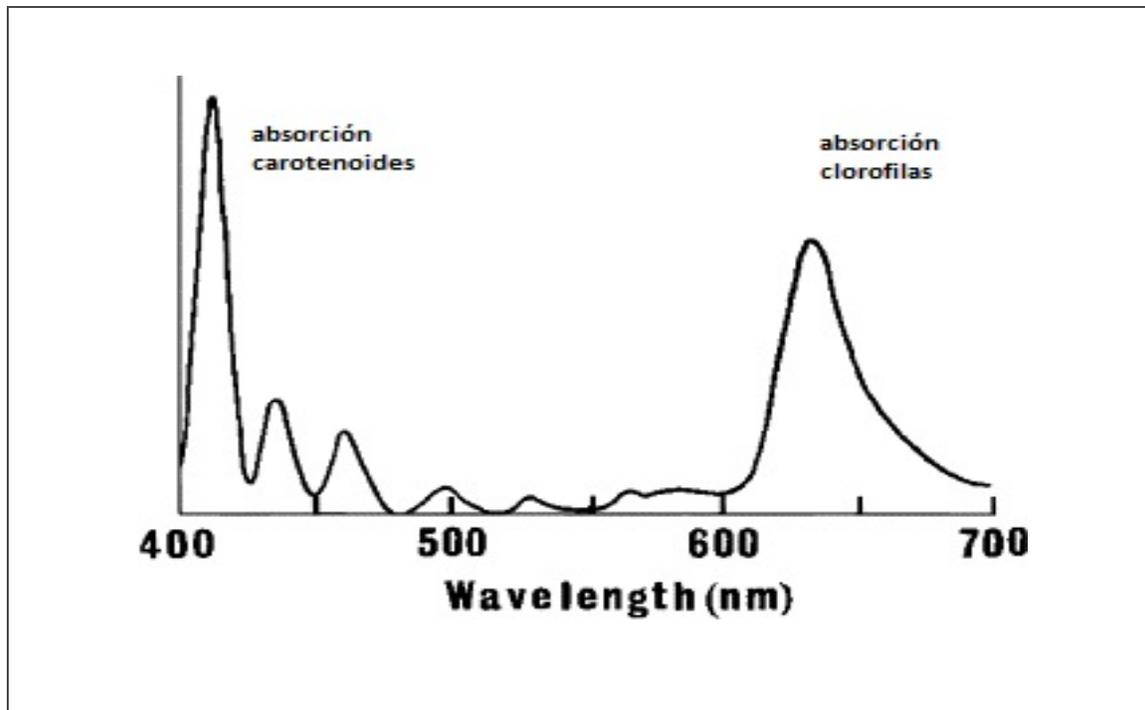
2.5.1 Absorbancia espectrofotométrica

El espectro de absorbancia refleja la organización del sistema de doble enlace conjugado y constituye la huella digital de pigmentos fotosintéticos, este método parece ser la forma más sencilla de identificar los principales pigmentos presentes en una mezcla. Una vez identificado, es posible utilizar un conjunto de ecuaciones para estimar sus respectivas concentraciones (BERTRAND y SCHOEFS, 1999).

Las mediciones requieren extracción de pigmentos con un disolvente, generalmente éter de petróleo y acetona, para los que se han establecido ecuaciones, adaptadas a la situación particular. (SCHOEFS, 2000).

El espectro de absorción, identifica pigmentos a temperatura ambiente de una bebida verde, como se observa en la Figura 5. Se puede apreciar que los picos de 410nm, corresponden al nivel absorbido por carotenoides, en tanto los que se encuentran entre 630 y 645 nm pertenecen a clorofilas *a* y *b*. Los métodos espectroscópicos por lo general permiten una identificación crudo de los pigmentos presentes en un extracto (BRITTON, 1995).

FIGURA 5: Identificación de pigmentos en espectro de absorbancia de una bebida verde.



FUENTE: SCHOEFS, (2002).

2.6 Cambios en el potencial nutricional debido a la maduración en vegetales

2.6.1 Madurez fisiológica

El estado de madurez que poseen los productos hortofrutícolas al ser cosechados, es esencialmente importante para su manejo, transporte y comercialización, ya que se ha comprobado que repercute directamente en su calidad y potencial de almacenamiento. Por lo tanto, es de importancia, el estudio de los conceptos de madurez y calidad, para la tecnología post cosecha (RICHTER, 1992).

Un término aplicable a cualquier órgano vegetal lo constituye la madurez hortícola, la cual se define como el estado de desarrollo de una planta o parte de la planta, que posee los requisitos para ser utilizada por el consumidor para un propósito particular. De acuerdo con esta definición, un producto dado puede estar hortícolamente maduro en cualquier estado de desarrollo (WATADA, 1986).

En fisiología post cosecha, los términos madurez fisiológica y madurez de consumo, denotan diferentes estados de desarrollo en el caso de los vegetales (HEATON y MARANGONI, 1993).

La definición más aceptada para el estado madurez fisiológica, es la siguiente: “aquella condición, en la cual un producto ha alcanzado un estado de desarrollo suficiente, para que después de la cosecha y manejo post cosecha, su calidad sea al menos la mínima aceptable para el consumidor” (MANGOS y BERGER, 1997).

La madurez de consumo sería: “el estado de desarrollo en que el producto ha alcanzado su máxima calidad estética y sensorial que lo hacen apto para el consumo humano inmediato” (HORMAZABAL, 1999).

2.6.2 Madurez de hortalizas de hojas verdes

Las hortalizas de hojas verdes, tienen una vida útil muy corta, cuando se exponen a condiciones desfavorables de post cosecha. El tiempo de conservación es un proceso rápido, que provoca un cambio dinámico en el que la composición del producto, la población microbiana asociada, temperatura, humedad relativa, luz y los cambios de envases de atmósferas tienen altos niveles de interacción (MOREIRA, 2003).

Ciertos atributos físicos y químicos de los vegetales de hojas, se han utilizado como índices de calidad. La pérdida de humedad, conduce a la pérdida de peso y la contracción durante el almacenamiento. En la post cosecha, la pérdida de agua puede causar un rápido deterioro, reducir la calidad a través del encogimiento. Además, la retención de color verde es un indicador evidente de la calidad, para los vegetales de hojas y tienen un gran impacto en la elección de los consumidores (GIANNAKOUROU y TAOUKIS, 2003).

Por lo tanto, la madurez será un factor a considerar al momento de seleccionar y someter los vegetales a procesos industriales que puedan dar mayor o menor calidad al producto final buscado.

3 MATERIAL Y MÉTODO

El desarrollo de la presente investigación, se realizó en los laboratorios del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, (ICYTAL) de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile, Valdivia, y buscó evaluar el efecto de la temperatura y conservante sobre el jugo de lechuga durante un período de almacenamiento de diez días, sobre los contenidos de clorofilas y carotenoides. Se determinaron los cambios producidos en el jugo de lechuga en relación al tiempo de almacenamiento. De igual forma, se determinó la tasa de degradación de las clorofilas y carotenoides para cada tratamiento por día de almacenamiento.

3.1 Materia prima

La materia prima a utilizar corresponde a lechugas, Cultivar *Justine*, (tipo mantecosas o comúnmente llamadas “españolas”) las cuales fueron recolectadas desde la Estación Experimental Santa Rosa, ubicada en el sector Cabo Blanco, perteneciente a la misma Universidad.

Luego de realizar los protocolos de saneamiento considerados para garantizar la inocuidad del producto, y extracción del zumo, la determinación de los datos se efectuó en las dependencias del Instituto de Ciencias y Tecnología de los Alimentos de la Universidad Austral de Chile, durante el verano de 2013.

3.2 Materiales y equipos

Para el proceso de elaboración de jugo de lechuga, se utilizaron distintos materiales, los cuales se describen a continuación:

3.2.1 Separación y procesado de hojas (higienización)

- Tablas para cortar, cuchillos de mesa, fuentes plásticas, bandejas plásticas, papel absorbente, toallitas húmedas desinfectantes con cloro, marcador permanente
- Hipoclorito sódico, 100 ppm (R.S.A. Chile, 2010)

3.2.2 Extracción del jugo de lechuga

- Acido ascórbico, 2.5 g en 100 ml solución (R.S.A. Chile,2010)
- Bicarbonato sódico, 2.5 g en 100 ml solución (R.S.A. Chile, 2010)
- Tubos falcon de 20 ml
- Pasterizador (cacerola de acero inoxidable con agua temperatura: 65 ± 85 °C)
- Congelador (MADEMSA, mod. MFH X 2000, -18 °C)
- Extractor de jugo no industrial (SINDELEN, mod. EX – 350, RPC)
- Balanza industrial
- Centrífuga manual

3.2.3 Determinación de pigmentos

- Espectrofotómetro (RAY LEIGH, modelo UV -1601, CHINA)
- Estufas (MEMMERT, mod. 100-800, ALEMANIA)
- Refrigerador (FENSA, mod., 3005 B)
- Balanza analítica (RADWAG, mod. WCL 20, U.S.A)
- Éter de petróleo 0.1 N
- Acetona 85 % v/v
- CaCO₃ Carbonato de calcio, precipitado
- H₂O destilada
- Papel filtro (discos) WHATMAN 41, ASHLESS 150 mm.
- Vasos precipitados 100 ml y 50 ml
- Pipetas 5 ml y volumétrica de 20 ml
- Embudos para matraz
- Probetas 100 ml
- Cubetas para espectrofotómetro
- Espátulas

FUENTE: Método AOAC Oficial 942.04, (1982).

3.3 Diseño experimental

Para el diseño experimental se utilizó un Análisis de Varianza ($\alpha=0,05$), con arreglo factorial de 3x3 siendo el primer factor, temperatura de almacenamiento del jugo (5, 20 y 35°C), y el segundo, el conservante (ácido, básico, sin conservante o control), obteniendo 9 tratamientos los cuales contaron con 3 repeticiones metodológicas cada uno, como se muestra en el Cuadro 2.

Se estudiaron las posibles interacciones entre los factores y en el caso de haber diferencias se realizó una segregación de acuerdo a las diferencias mínimas con el Test de Tukey.

CUADRO 2: Identificación de los tratamientos para elaboración de jugo de lechuga.

Temperatura / conservante	5 °C	20 °C	35 °C
Sin conservante (control)	S1	S2	S3
Conservante ácido	A1	A2	A3
Conservante básico	B1	B2	B3

Los datos fueron tabulados en Software Microsoft Excel 2007 y analizados estadísticamente con el Software Statgraphics Centurión.

3.3.1 Proceso elaboración del jugo de lechuga

Para determinar las etapas del proceso, lo primero fue elaborar el diagrama de flujo, (véase Anexos 1 y 2, Línea de flujo elaboración jugo de lechuga y descripción de la misma), el cuales fue establecido de acuerdo al procedimiento de inocuidad alimentaria con el fin de lograr un producto final avalado por los procedimientos industriales para tal efecto.

3.3.2 Metodología análisis de pigmentos en laboratorio

Posteriormente a la elaboración del jugo, se realizó el análisis de pigmentos, lo cual llevó analizar los siguientes parámetros:

- Concentración Clorofilas *a*.
- Concentración Clorofilas *b*.
- Concentración Carotenoides.

Estos parámetros fueron medidos a través de espectrofotometría de absorbancia.

3.3.3 Extracción de pigmentos

Para el análisis de concentración de clorofilas y carotenoides se consideró la metodología de extracción (véase Anexo 3), que indica el Método AOAC Oficial 942.04, (1982).

3.3.4 Determinación cuantitativa de clorofilas y carotenoides

Se calculó la cantidad de clorofilas *a*, *b* y carotenoides presente en el extracto en forma periódica, expresándose como $\mu\text{g L}^{-1}$, de acuerdo a las siguientes ecuaciones como se muestran en los Cuadros 3 y 4.

CUADRO 3: Patrones de clorofilas y carotenoides.

Densidad óptica (nm)	Pigmentos
660	Clorofila <i>a</i>
642	Clorofila <i>b</i>
470	Carotenoides

FUENTE: LICHTENTHALER, (1987).

CUADRO 4: Cálculo de ecuaciones de pigmentos antioxidantes.

Clorofila total	=	$7.12 A_{660} + 16.8 A_{642.5}$
Clorofila <i>a</i>	=	$9.93 A_{660} - 0.777 A_{642}$
Clorofila <i>b</i>	=	$17.6 A_{642} - 2.81 A_{660}$
Carotenoides	=	$1000 A_{470} - (1.82 \text{ Cl } a) - (82.02 \text{ Cl } b) / 198$

FUENTE: MÉTODO AOAC OFICIAL 942.04, (1982).

3.3.5 Tasa de degradación de pigmentos antioxidantes

La tasa de degradación de los pigmentos se obtuvo por medio de relaciones porcentuales entre los días estudiados, calculándose además el coeficiente de variación, a modo de establecer cuál de los tratamientos pudiera tener una menor incertidumbre de estabilidad, como se muestra en la Figura 6.

FIGURA 6: Coeficiente de variación porcentual.

$$C_v = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100$$

σ → **Desviación estándar**

\bar{x} → **Promedio degradación pigmentos**

4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los datos de las mediciones de absorbancias leídas en el espectrofotómetro fueron sometidos a los supuestos fundamentales del ANDEVA. Se menciona además que por imposibilidad técnica de realizar mediciones previo pasteurización, el mismo día del proceso (día 0, disposición en fresco de la materia prima), ésta valoración no aparece registrada en las dinámicas gráficas mostradas más adelante. Sin embargo, algunas hojas frescas fueron congeladas (-18 °C) y almacenadas al vacío por 45 días (tiempo que pasó entre la obtención del jugo y la determinación por espectrofotometría, por disponibilidad del equipo), arrojando magnitudes en torno a $17 \mu\text{g L}^{-1}$, de clorofilas totales y $15 \mu\text{g L}^{-1}$ de carotenoides, no contando con réplicas suficientes que pudieran dar una seguridad en términos estadísticos para este día, constanding esta información sólo como un antecedente referencial.

4.1 Efecto de la temperatura sobre los pigmentos

El efecto de la temperatura no pudo diferenciarse claramente para todos los pigmentos, observándose dinámicas levemente variables asociadas más bien a las características de los mismos durante el proceso de almacenaje. Los datos se ajustaron en relación a curvas logarítmicas, con las cuales se expresaron las tendencias durante el almacenamiento (Figura 7).

La clorofila *a*, como se aprecia en las Figuras 7A, B y C, varió su velocidad de degradación media en un 70, 50 y 40 % en temperaturas de 5, 20 y 35 °C, respectivamente durante su almacenamiento en tasas relativamente similares (Cuadro 7) siendo la magnitud inicial y final dependientes más bien de las condiciones ácido-base entre valores de 8 a $0 \mu\text{g L}^{-1}$ cuando se almacenó el jugo a 5°C, lo que contrastó con la dinámica de temperaturas superiores (20 y 35°C), donde la alteración de la concentración del pigmento se amplió entre 13 y $0 \mu\text{g L}^{-1}$. Respecto a lo anterior, resulta llamativo observar que el conjunto de datos aportados bajo condiciones alcalinas a 5°C, haya promovido una desintegración acelerada de la clorofila *a* en las primeras 48 horas de almacenamiento (7 a $6 \mu\text{g L}^{-1}$).

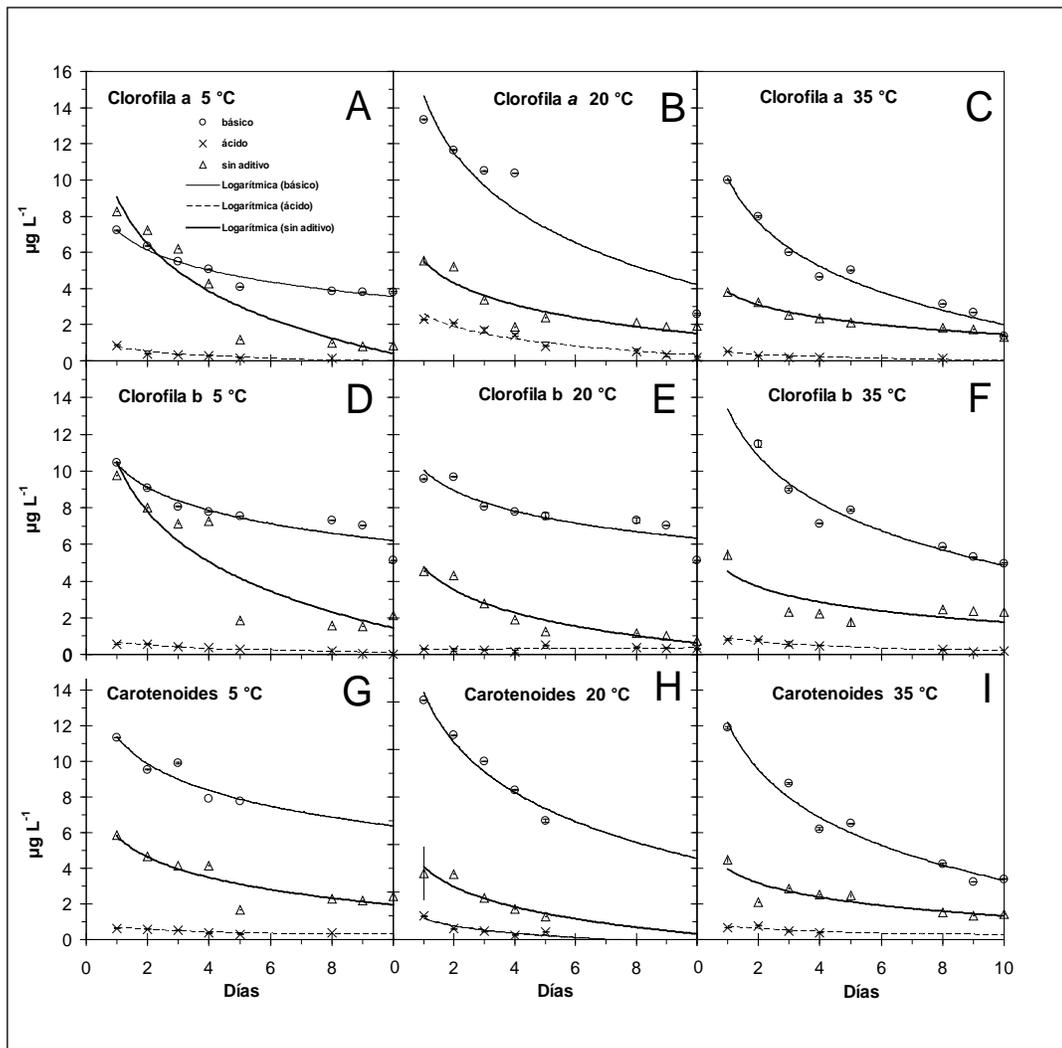
Estos datos son complejos de explicar, y pueden ser debidos al error en experimental, sobre todo si se tiene en consideración los principios de reacción enzimáticos y su termodependencia. Respecto a los tratamientos con 20 y 35°C, se observaron magnitudes más acordes a la degradación, las que para el caso de los conservantes básicos se encontraban entre 12 y 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ en las primeras 48h.

En general, aunque HAYAKAWA y MADERAS (1977), describen que un calentamiento en alimentos provoca pérdidas en la calidad organoléptica de los productos, los resultados de este ensayo no dejan claro que la clorofila *a* tenga una variabilidad negativa proporcional al aumento térmico (Cuadro 7).

La Clorofila *b* (Figuras 7D, E y F), muestra su mayor variabilidad en las primeras 72 h (niveles de inicio ($\mu\text{g L}^{-1}$) de almacenamiento, siendo similar para todos los tratamientos térmicos. Si en general, se observan estas dinámicas degradativas con los resultados de la Clorofila *a*, se pueden advertir diferencias que favorecen a la estabilidad de la Clorofila *b* posiblemente dadas por su estructura molecular (aldeído vs metilo en clorofila *a*) tal como menciona SCHOEFS (2003), mostrando una equivalente y pausada degradación oxidativa en función del tiempo, la que para todas las temperaturas estudiadas se inicia en valores de 10 a 12 y hasta 6 $\mu\text{g L}^{-1}$ al décimo día de almacenamiento en condiciones básicas, siendo el factor de pH, quien produce cambios de mayor cuantía dentro de cada tratamiento térmico.

Los carotenoides por su parte, (Figuras 7G, H e I), presentaron una dinámica de degradación más proporcional y ordenada de acuerdo a la variación térmica, observándose una suave tendencia a aumentar la velocidad de degradación (Cuadro 7) a medida que aumentó la temperatura de almacenamiento en el tiempo, Como resultado de los anterior, se observa que a temperaturas más bajas (5°C), el pigmento tuvo una degradación más pausada en condiciones básicas (11 a 7 $\mu\text{g L}^{-1}$), que fue lo que mostró mayor cambios durante el ensayo, con respecto a las temperaturas de 20 y 35°C . La inestabilidad de los carotenoides observados en esta investigación se debería al hecho de que son compuestos altamente insaturados, degradándose fundamentalmente debido a procesos oxidativos o reacciones de isomerización.

FIGURA 7: Pigmentos vs temperatura con niveles del conservante, en función de los días de almacenamiento.



En general los resultados mostrados sobre la estabilidad de los pigmentos dan cuenta de una disminución de su valor nutritivo.

4.2 Efecto del conservante sobre pigmentos

El potencial ácido-base (pH) aportado por el ácido ascórbico, el bicarbonato de sodio y su efecto en el jugo estudiado, se mantuvo prácticamente inalterado durante el ensayo y en el tiempo de almacenamiento, demostrando su propia estabilidad como se puede observar de manera general en la Figura 8.

En las Figuras 8A, D y G, se observa una velocidad de degradación constante para los tres pigmentos estudiados en soluciones ácidas (pH ~4), arrojando una magnitud inicial y final dependientes de la condición del conservante, mostrando para el caso de clorofila a valores de 1,14 a 0,12 $\mu\text{g L}^{-1}$, clorofila b 0,79 a 0,02 $\mu\text{g L}^{-1}$ y carotenoides 0,99 a 0,14 $\mu\text{g L}^{-1}$. En cuanto a estabilidad su degradación se ve afectada por el conservante ácido, lo que implicó que en estas condiciones de pH los pigmentos sufrieron degradación en forma inmediata.

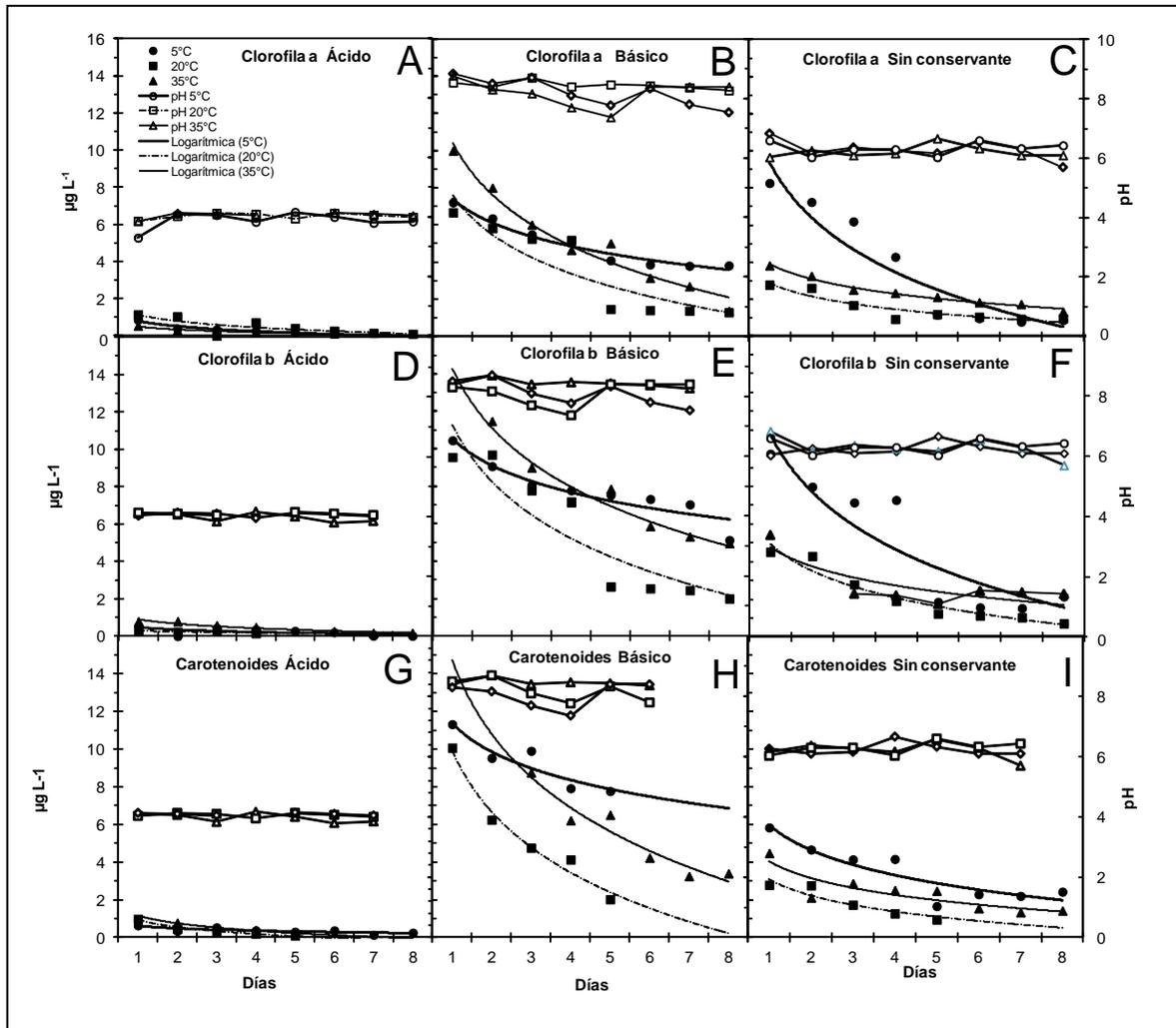
La conversión de clorofilas a feofitinas, se acentúa en condiciones de pH ácido durante el almacenamiento en función del tiempo (FRANCIS, 1964). A su vez las diferencias en términos de estabilidad entre las clorofilas se debe a un tema de estructuralidad: la sustitución del ión Mg^{++} por Fe^{++} da lugar a la formación de estos productos como señalan MAIOCCHI y AVANZA (2004) y su degradación aumenta considerablemente por efecto del pH bajo (Cuadro 7).

En tanto, los pigmentos sometidos a soluciones alcalinas (pH ~8) mantuvieron estabilidad de interés entre los pigmentos durante su almacenamiento (Figuras 8B, E y H), observándose magnitudes iniciales y finales para las clorofilas a de 9,99 a 1,29 $\mu\text{g L}^{-1}$, clorofilas b 11,47 a 1,99 $\mu\text{g L}^{-1}$ y carotenoides 10,07 a 2,02 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente, lo cual a diferencia del pH ácido, arrojó condiciones de estabilidad favorables, por lo que se deduce que el aumentar el pH de la solución la acción de clorofilasa se vería más bien retardada, lo cual es importante en términos de estabilidad de los pigmentos, evitando pardeamiento enzimático al menos los primeros 10 días de almacenaje.

En términos generales, tal como mencionan BLAIR y AYRES (1943), incorporar agentes alcalinizantes, tales como bicarbonato de sodio puede ser positivo para la conservación, lo que es conformado en este trabajo., a su vez, han sido utilizados para elevar el pH de las hortalizas verdes y de esta forma conservar los pigmentos después del procesamiento térmico, coincidiendo con otras investigaciones establecidas por otros autores presentes en la literatura GUNAWAN y BARRINGER, (2000).

Respecto al jugo sin conservante (Figuras 8C, F, I), con (pH ~6) de manera general, se observa que en pigmentos *a* y *b* aumentan su velocidad de degradación en condiciones de refrigeración arrojando valores iniciales y finales de 8,26 a 0,87 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 9,73 a 0,72 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente, no siendo el caso de carotenoides los cuales se mostraron similares en su degradación en condiciones tanto térmicas como de refrigeración con valores de concentración de 5,84 a 2,43 $\mu\text{g L}^{-1}$.

FIGURA 8: Pigmentos vs conservante con niveles de la temperatura, en función de los días de almacenamiento.



* Las condiciones de pH 5°C, 20°C y 35°C, indican el pH del medio producto del conservante.

4.3 Variabilidad de factores sobre pigmentos antioxidantes

Al evaluar estadísticamente los resultados por día de almacenamiento, se determinó que la degradación de clorofilas *a*, *b* y carotenoides, demostraron variabilidades diferenciales de acuerdo a cada uno de los factores y su interacción (Cuadro 5), siendo el efecto del conservante (C) el que presentó mayor porcentaje de efecto al ser visualizado en la suma de cuadrados de variabilidad. Para la clorofila *a*, la variabilidad se observó para el conservante, temperatura y su interacción en un 79,37; 6,29 y 18,33%, clorofilas *b* obtuvo valores de 80,31; 5,83 y 14,86% y carotenoides arrojaron valores de 79,73; 7,32 y 12,46% respectivamente en el día 1.

Esta dinámica se mantuvo en niveles similares hasta el cuarto día, observándose un error en torno al 11%. Por lo tanto, se puede establecer que “mientras mayor sean los días de almacenamiento, el error calculado aumenta”, en términos de estabilidad de los pigmentos. A su vez, apreciar que existe una inestabilidad en clorofilas *a* respecto de las clorofilas *b*, en cuanto al efecto temperatura a partir del cuarto día, estos datos no son de extrañar puesto que, se atribuye su inestabilidad del pigmento a su estructuralidad, tal como menciona SCHOEFS (2003).

Posteriormente los tres pigmentos se diferenciaron en el quinto día de almacenaje, en el cual se aprecia una disminución en la variabilidad de los datos, presentando valores para clorofila *a* de 47,86; 2,46 y 10,4%, clorofila *b* 45,35; 1,07y 5,88%, carotenoides 48,41; 5,37 y 6,22% respectivamente.

Los datos permiten dar cuenta de una tendencia: la degradación de los pigmentos fotosintéticos se mantiene en proporciones similares hasta el cuarto día para los factores e interacciones estudiadas, los que bordearon cercanos al 60-80, 5-7 y 8-18% para el conservante, temperatura e interacción respectivamente. Posterior a ello, la variabilidad se hace mayor y el error aumenta sensiblemente, llegando en torno al 65%, lo cual se traduce en inseguridad de la calidad del producto.

CUADRO 5: Porcentajes de las sumas de cuadrados e interacciones de los factores sobre pigmentos antioxidantes.

	Factores	GL	Clorofila a	Clorofila b	Carotenoides
	Conservante (C)	2	79.37	80.31	79.73
Día 1	Temperatura (T)	2	6.29	5.83	7.32
	T x C	4	18.33	14.86	12.46
	Total (%)	25	100.0	100.0	100.0
	<hr/>				
	Conservante (C)	2	74.96	73.86	74.61
Día 2	Temperatura (T)	2	5.48	3.70	7.02
	T x C	4	16.33	13.44	10.07
	Total (%)	22	100.0	100.0	100.0
	<hr/>				
	Conservante (C)	2	72.69	66.00	72.77
Día 3	Temperatura (T)	2	5.40	3.00	6.24
	T x C	4	15.89	9.97	9.37
	Total (%)	21	100.0	100.0	100.0
	<hr/>				
	Conservante (C)	2	69.46	59.38	69.30
Día 4	Temperatura (T)	2	5.29	2.53	6.14
	T x C	4	14.58	8.91	8.04
	Total (%)	20	100.0	100.0	100.0
	<hr/>				
	Conservante (C)	2	47.86	45.35	48.41
Día 5	Temperatura (T)	2	2.46	1.07	5.37
	T x C	4	10.4	5.88	6.22
	Total (%)	19	100.0	100.0	100.0
	<hr/>				
	Conservante (C)	2	42.27	42.71	45.04
Día 8	Temperatura (T)	2	2.34	1.03	4.14
	T x C	4	8.99	5.49	4.58
	Total (%)	20	100.0	100.0	100.0
	<hr/>				
	Conservante (C)	2	37.15	37.59	42.39
Día 9	Temperatura (T)	2	2.11	1.00	3.84
	T x C	4	7.74	4.67	3.77
	Total (%)	22	100.0	100.0	100.0
	<hr/>				
	Conservante (C)	2	30.24	29.20	33.83
Día 10	Temperatura (T)	2	1.39	1.02	3.05
	T x C	4	6.37	3.59	2.12
	Total (%)	20	100.0	100.0	100.0
	<hr/>				

La diferencia entre el porcentaje total y los factores o sus interacciones, corresponde al error, el cual no ha sido representado en esta tabla.

4.3.1 Variabilidad de la concentración de los pigmentos: entre y en los días de almacenamiento

Se evaluó el efecto de los tratamientos sobre los tres pigmentos a fin de conocer su variabilidad en el tiempo y sus posibles diferencias asociada a la acción específica o interacción de los factores (Cuadro 6).

En condiciones ácidas para las clorofilas *a* entre los días de almacenamiento, los valores menos cambiantes, correspondieron a las temperaturas de 5°C, en donde se observó un único cambio a partir del día 3. Por otra parte, para las temperaturas 20 y 35 °C muestran diferencias estadísticas a lo largo del período de almacenaje. En soluciones alcalinas se mantuvieron más bien estables en condiciones de 20 °C, durante los cinco primeros días.

Por otra parte, en los días de almacenamiento, a partir del quinto día se demuestran diferencias significativas, en pH ácido y sin conservante, pero en el caso de las soluciones básicas mantiene su estabilidad.

En tanto, las clorofilas *b* se mantuvieron estables a en condiciones básicas con temperaturas entre 20 y 35 °C en los días de almacenamiento, por lo que entre los días se mantienen estables hasta el tercer día.

Para el caso de carotenoides, se mantienen estables en condiciones similares a el caso de clorofila *a*. En el jugo sin conservante, demostraron inestabilidad a partir del primer día de almacenaje.

Los tratamientos que dieron lugar a estabilidad en el tiempo, de los pigmentos fotosintéticos fueron en condiciones distintas a la refrigeración cercanas a los 20 °C y en soluciones alcalinas. Probablemente debido a su alto pH, lo cual hace posible una mayor estabilidad en el tiempo de los pigmentos analizados. Bla bla bla

CUADRO 6: Efecto de los tratamientos sobre pigmentos entre y en los días de almacenamiento.

Pigmentos	Día	ácido			básico			sin conservante		
		5 °C	20 °C	35°C	5 °C	20 °C	35°C	5 °C	20 °C	35°C
clorofila a	1	a B	b A	b A	b B	a A	a A	b A	a A	b A
	2	b B	a B	c B	c A	a A	b B	b B	a B	c B
	3	b C	a B	c B	b A	a A	a C	c B	a B	b C
	4	a C	b D		c C	a A	b E	b C	c C	b D
	5	a C	c D	b C	c C	a A	b B	c E	b D	c E
	8	a C	b E		b D	b B	a A			
	9		d D							
clorofila b	1	b A	a A	b A		a A	a A	b A	c B	a B
	2	c B	b B	c A	b B	a A	a A	a B	a B	b B
	3	b B	a C	b B	b A	a B	b B	c C	b C	b B
	4	c C	a E	b B	b A	b B	a B	c C	b D	c C
	5	b C			c B	b B	a C		c D	b D
	8	b D		c C	d C	a C	c D		b E	c E
	9			d C		b C	c E		c F	c F
10			d C		b C	c E		d F	d G	
carotenoides	1	c A	c A	b A	b A	a A	a A	b A	b A	c A
	2	c B	a B	c B	b C	a A	a B		a B	c C
	3	b C	a C	b B	c B	a A	c B	b B	a C	a B
	4	c C	a B	b C	b D	b A	d D	a C	b D	b D
	5	d D			d E	b B	c C	b D	c C	b D
	8		c D		b D	a B	c D	d D	b D	c D
	9							c D		
10							e D			

Letras minúsculas diferentes en la misma fila, representan diferencias significativas en los días del contenido de pigmento entre tratamientos térmicos para el conservante definido. Letras mayúsculas diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas entre los días del contenido del pigmento a una temperatura y conservante determinado ($p \leq 0,05$), celdas en blanco corresponden a datos no concluyentes para el análisis.

4.4 Tasa de degradación de pigmentos por día de almacenamiento y su estabilidad.

Luego de obtener los valores porcentuales con respecto a la degradación de pigmentos por día de almacenaje en base al día 1 como 100%, se calculó el coeficiente de variación para los tres pigmentos fotosintéticos estudiados.

La variabilidad de los datos como se presenta en el Cuadro 7 para la clorofila *a*, fue mayor que para los otros dos pigmentos, terminado el período de ensayo con un 91,2 a 76,6 % de pérdida del producto. Situación similar se observa en el tratamiento sin conservante donde se perdió al final del décimo día, de un 65 a casi 90% de la clorofila *a*. Sin embargo una situación diferente y de mayor conservación fue observada para al menos un tratamiento básico (5°C), el cual sólo perdió un 47% al final del ensayo.

En cuanto a magnitud en la concentración de pigmentos se asocia a las clorofilas *a*, que mostraron porcentajes de degradación promedio en condiciones ácidas y sin conservante de un 70 y 62,8 %, comparado con pH básico demostrando un valor que se vio disminuido con un 35%.

En tanto las clorofilas *b* y carotenoides presentaron en pH básico porcentajes de 29 y 22%, dado que en condiciones ácidas presentaron 60 y 48%. El efecto de la disminución en la concentración de clorofilas y carotenoides, en general se ve influenciada por el pH, estos resultados no son de extrañar, puesto que otros autores coinciden con lo descrito anteriormente SCHWARTZ *et al.* (1999).

El coeficiente de variación para las clorofilas *a* en temperaturas de 20 °C para pH ácido y básico demostró bastante movilidad en los datos, 88 y 66 % lo cual indica que el pigmento tiende a degradarse con mayor velocidad. En el jugo sin conservante en temperaturas de 5 °C obtuvo valores de 82%, lo cual hace deducir que el comportamiento del pigmento bajo estas condiciones tiende a acelerar su velocidad de degradación que en condiciones térmicas.

De igual forma los clorofilas b en condiciones de refrigeración y sin conservante (control) presentaron movilidad en los datos con 75 y 70 %, mientras que con pH básico obtuvo un 20%, lo que refleja mayor estabilidad en el pigmento en estas condiciones de procesado así como menciona TIJKENS (2001). Los carotenoides, a su vez, demostraron estabilidad en condiciones térmicas similares a los pigmentos b, obteniendo valores de 52 y 66 % respectivamente.

CUADRO 7: Variación porcentual con respecto a la degradación sobre pigmentos antioxidantes.

		ácido						básico						sin conservante						
		5°C		20°C		35°C		5°C		20°C		35°C		5°C		20°C		35°C		
Pigmentos	Días	µg L ⁻¹	% deg																	
clorofila a	1	0,87		1,14		0,53		7,20		6,67		9,99		8,26		2,78		3,81		
	2	0,39	54,4	1,04	8,9	0,29	45,5	6,35	11,9	5,83	12,6	7,99	20,0	7,24	12,4	2,61	6,2	3,26	14,6	
	3	0,33	61,4	0,41	64,2	0,21	60,8	5,48	23,9	5,25	21,3	6,00	39,9	6,19	25,0	1,68	39,5	2,51	34,1	
	4	0,27	69,4	0,27	76,7	0,20	63,0	5,07	29,7	5,18	22,3	4,65	53,5	4,28	48,1	0,93	66,6	2,33	38,9	
	5	0,16	81,7	0,16	86,4	0,12	76,6	4,09	43,3	1,46	78,0	5,00	49,9	1,16	85,9	1,19	57,2	2,11	44,7	
	8	0,12	86,3	0,10	91,2			3,86	46,4	1,40	78,9	3,14	68,5	0,97	88,3	1,05	62,1	1,83	52,1	
	9							3,79	47,3	1,37	79,4	2,69	73,1	0,78	90,5	0,94	66,1	1,73	54,7	
	10							3,81	47,1	1,29	80,6	1,37	86,3	0,87	89,5	0,96	65,4	1,32	65,4	
	Desv Stand		0,27	13,4	0,46	33,3	0,16	12,7	1,30	14,0	2,37	32,5	2,85	22,2	3,17	33,8	0,77	22,3	0,83	16,4
	Promedio		0,36	70,6	0,52	65,5	0,27	61,5	4,96	35,7	3,56	53,3	5,10	55,9	3,72	62,8	1,52	51,9	2,36	43,5
	CV		75,9		88,0		58,3		26,3		66,6		55,9		85,2		50,5		34,9	
clorofila b	1	0,55		0,29		0,79		10,45		9,55		11,47		9,73		4,52		5,42		
	2	0,44	21,0	0,24	18,6	0,79	-0,5	9,06	13,3	9,68	-1,3	8,99	21,6	7,98	18,0	4,30	4,9	2,30	57,6	
	3	0,35	36,3	0,24	17,8	0,57	27,4	8,06	22,8	7,77	18,6	7,13	37,8	7,14	26,6	2,79	38,2	2,21	59,3	
	4	0,28	49,6	0,16	46,2	0,47	39,8	7,77	25,6	7,18	24,8	7,85	31,6	7,28	25,3	1,91	57,8	1,77	67,5	
	5	0,21	63,0			0,26	67,6	7,53	27,9	2,63	72,4	5,86	48,9	1,87	80,8	1,24	72,6	2,46	54,7	
	8	0,03	95,5			0,16	79,8	7,31	30,0	2,53	73,5	5,30	53,8	1,57	83,8	1,14	74,8	2,37	56,3	
	9	0,02	97,3			0,16	79,4	7,02	32,8	2,44	74,5	4,95	56,8	1,53	84,3	1,04	77,0	2,29	57,7	
	10							5,12	51,0	1,99	79,2			2,15	77,9	0,72	84,1			
	Desv Stand		0,20	31,2	0,06	16,2	0,27	32,3	1,55	11,5	3,39	33,5	2,31	13,8	3,44	31,4	1,50	28,1	1,23	4,5
	Promedio		0,27	60,4	0,23	27,5	0,46	48,9	7,79	29,1	5,47	48,8	7,36	41,8	4,91	56,7	2,21	58,5	2,69	58,8
	CV		75,68		24,03		59,94		19,87		62,00		31,43		70,07		68,10		45,61	
carotenoides	1	0,64		0,99		0,78		11,32		10,07		9,76		5,84		2,79		4,47		
	2	0,35	45,8	0,45	54,4	0,46	41,1	9,53	15,8	6,25	38,0	8,76	10,3	4,66	20,1	2,76	1,1	2,11	52,9	
	3	0,53	16,7	0,33	66,3	0,39	50,0	9,91	12,5	4,76	52,8	6,21	36,3	4,14	29,1	1,73	37,8	2,86	35,9	
	4	0,37	42,2	0,20	80,2			7,92	30,1	4,13	59,0	6,50	33,3	4,16	28,7	1,27	54,4	2,50	43,9	
	5	0,30	53,2	0,10	89,4			7,77	31,4	2,02	79,9	4,23	56,7	1,66	71,6	0,95	66,0	2,47	44,8	
	8	0,37	42,4									3,25	66,7	2,29	60,8			1,54	65,5	
	9	0,14	78,3									3,39	65,2	2,20	62,3			1,33	70,2	
	10	0,25	61,1											2,43	58,4			1,42	68,2	
	Desv Stand		0,16	19,0	0,35	15,4	0,21	6,3	1,48	9,7	3,00	17,4	2,57	22,1	1,48	20,6	0,84	28,3	1,03	13,6
	Promedio		0,37	48,5	0,41	72,6	0,54	45,6	9,29	22,4	5,45	57,4	6,01	44,8	3,42	47,3	1,90	39,8	2,34	54,5
	CV		42,68		83,65		38,32		15,93		55,05		42,68		43,20		44,45		43,99	

Tasa de degradación, con respecto a la variación entre los días de los tratamientos en función al tiempo de almacenamiento, medidos en µg del pigmento por L⁻¹, expresado en porcentaje por el coeficiente de variación (cv). Celdas blanco corresponden a datos no concluyentes para el análisis.

Por otra parte, los valores de las concentraciones en cuanto a la degradación de los pigmentos determinados por efecto del pH ácido y alcalino, se encuentran dentro del rango de los valores de velocidad de reacción de degradación encontrados por autores en otros vegetales verdes STEED y TONG (1996).

Los resultados obtenidos mostraron que los pigmentos fotosintéticos de interés antioxidante, mantuvieron mayor estabilidad en soluciones alcalinas y en condiciones de temperaturas distintas a la refrigeración (cerca de los 20 °C), identificándose además variabilidad asociada a las características propias de la molécula. El factor más importante dentro del almacenaje correspondió al conservante o efecto pH.

Sin embargo, otros estudios son necesarios para determinar niveles organolépticos e inocuidad, mejorar las técnicas de laboratorio para obtener resultados más concluyentes y ajustar por lo tanto, una condición más acercada a los criterios exigidos por la industria, en donde se busque formular alimentos funcionales ricos en clorofila y con pausada degradación.

Finalmente de acuerdo a la hipótesis y objetivos planteados, se acepta con condiciones sobre que “El jugo de lechuga mantiene sus compuestos bioactivos (pigmentos fotosintéticos) estables en almacenamiento”, en condiciones térmicas y pH alcalino, por lo tanto, en estas condiciones de procesamiento da lugar a formular un potencial complemento para la formulación de alimentos funcionales.

5 CONCLUSIONES

En relación a los resultados obtenidos en el presente ensayo se puede concluir:

- Respecto al efecto temperatura sobre las clorofilas *a* y carotenoides presentaron estabilidad en condiciones térmicas de almacenamiento hasta el cuarto día, las clorofilas *b* demostraron estabilidad aun en altas temperatura, teniendo tasas de degradación más aceleradas entre los primeros 4 a 5 días de inicio del ensayo. Los valores posteriores en días del 5 al 10 son en exceso variables (CV) y no permiten tener resultados concluyentes, aunque si en todos los casos se observaron tendencias claras a la disminución del contenido de los productos independientes de la temperatura.
- Los pigmentos analizados en esta investigación, mantienen estabilidad en condiciones de pH alcalino, con lo cual se pudo advertir que el factor de mayor impacto en el mantenimiento o estabilidad de los pigmentos posiblemente a ser utilizando como componentes nutracéuticos, corresponde a él conservante en una relación en torno a 10-15:1 con respecto al efecto de la temperatura en los primeros días, de almacenaje, mientras que después esta proporción cambia incluso al doble, pero con valores menos seguros.
- La tasa de degradación se vio más afectada por el efecto del pH ácido, siendo las soluciones básicas, las más adecuadas dentro de este ensayo para disminuir la velocidad de la degradación de los tres pigmentos fotosintéticos, en función del tiempo de almacenaje. El mayor período de tiempo de estabilidad de éstas, son los cuatro primeros días para clorofilas *a*, en tanto las clorofilas *b* y carotenoides de manera similar presentaron estabilidad los tres primeros días de almacenaje.

6 BIBLIOGRAFIA

- ANGUELOVA, T. y WARTHESEN, J. 2000. Degradation of the lycopene, α -carotene and β -carotene during lipid peroxidation. *Journal of Food Science*. 65: 71-75p.
- BERTRAND, M. y SCHOEFS, B. 1999. Metabolism of photosynthetic pigment in plants under stress. *Manual plant stress and crop*. 527-543p.
- BRITTON, G. 1995. Methods for the isolation and analysis of carotenoids. 407-457p.
- BLAIR, J. y AYRES, T. 1943. Protection of natural green pigment in canned peas. *Industrial and Engineering Chemistry*. 35: 85-95p.
- CHEN, B. y CHEN, Y. 1993. Stability chlorophylls and carotenoids in leaves during microwave cooking *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41: 1315-1320p.
- CRUESS, M. 1998. *Commercial fruit and vegetable products*. 402p.
- CARRILLO, J. 2005. *Conservación de alimentos mediante refrigeración*. Tesis Ingeniero Naval, mención máquinas marinas Valdivia. Chile. 143p.
- CARVALHO, P.; MACHADO, C.; MORETTI, C.; FONSECA, M. 2006. *Hortaliças como alimentos funcionais*. Brasilia. 24: 397-404p.
- DRAGAN, Z. 2011. Carotenoids and chlorophyll composition of leaf vegetables consumed in Mediterranean countries. *Eslovenia*. 129: 1164-1168p.
- FENNENA, O. 2000. *Química de los alimentos*. Acribia Zaragoza. España. 1250 p.
- FRANCIS, F. 1964. pH effect on the high temperature short time processing spinach. *Food Technology*. 18: 1645-1658p
- GAMON, J. y SURFUS, J. 1999. Evaluating the content of the pigment in a refractometer sheet. *New phytologist*. 43: 105-117p.
- GANDUL, B. y ROJAS, M. 1989. Pigment changes during storage olive brine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 37: 8-11p.

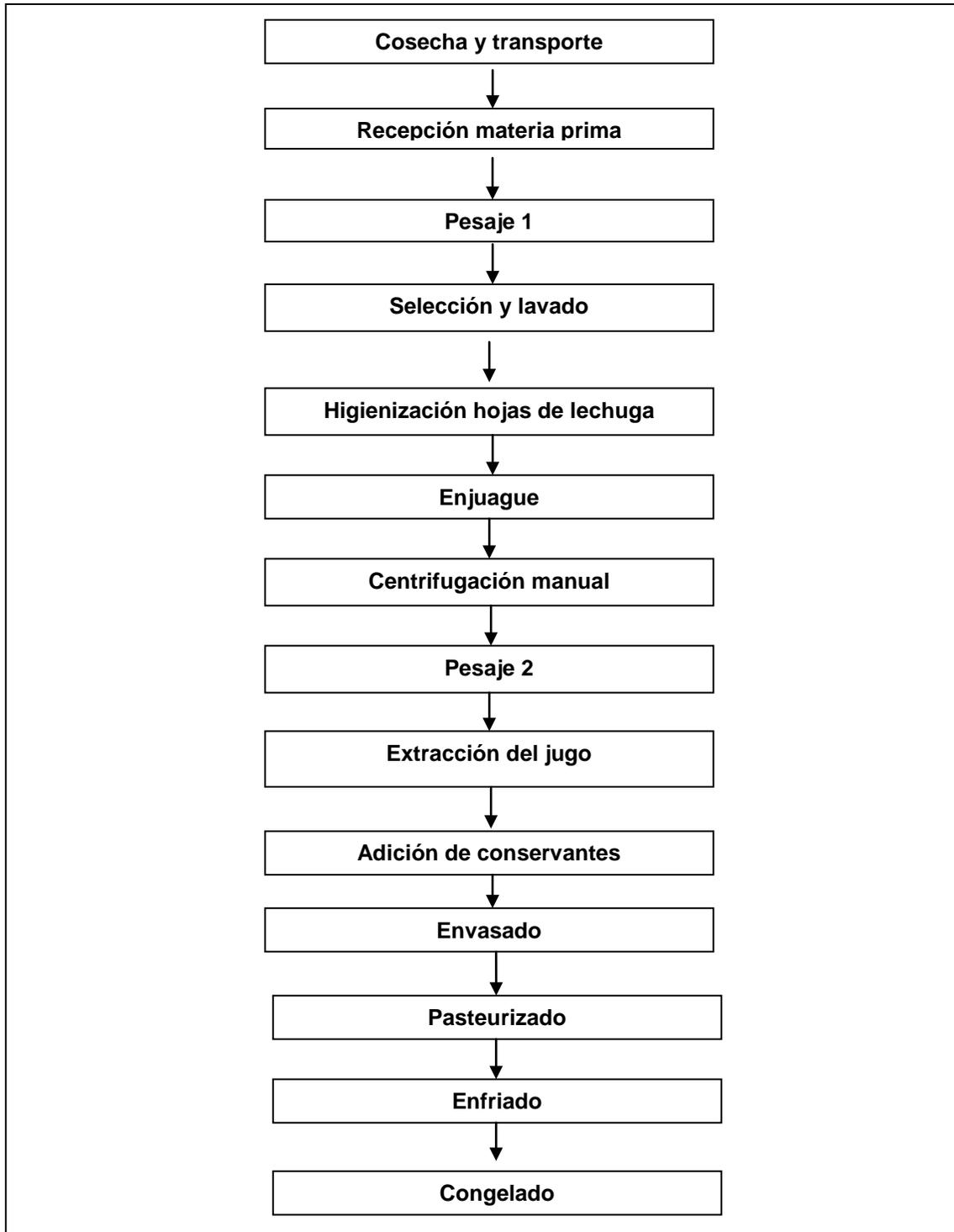
- GEBBERS, J. 2007. Atherosclerosis, cholesterol and nutrition. Medical Sciences Germany. 5: 1-11p.
- GIANNAKOUROU, M. y TAOUKIS, P. 2003. Kinetic modeling of the loss of vitamin C in green vegetables frozen. Food Chemistry. 83: 33-41p.
- GUNAWAN, M. y BARRINGER, S. 2000. The green color degradation of blanched broccoli due to acid and microbial growth. Journal of Food Processing and Preservation. 24: 253-263p.
- HAYAKAWA, K. y MADERAS, G. 1977. Influence of thermal treatment in la quality of vegetables. Journal of Food Science. 42: 778-781p.
- HEIMENDINGER, J. 2009. Community nutrition intervention strategies for reducing cancer risk. Journal of Food Science. 72: 1019-1023p.
- HERNANDEZ, M. 1999. Tratado de nutrición. Madrid, España. 1496p.
- HERPPICH, W.; MEMPEL, H. y GEYER, M. 1999. Effects of postharvest mechanical stress and climate on water relations in lettuce tissue. Postharvest Biol Technology. 16: 43-49p.
- HOMSI, J. 1996. Tratamiento de residuos industriales líquidos. Universidad de Chile
- HORMAZABAL, P. 1999. Efecto de la IV gama en la mezcla de lechuga (*Lactuca sativa*) tipo escarola y palta (*Persea americana* Mill) cvs. Edranol, Hass y Negra de la cruz. Taller de licenciatura. Universidad Católica de Valparaíso. Quillota. 53p.
- INTA (INSTITUTO DE NUTRICION Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS). 2011. Universidad de Chile.
- KIMURA, M. y RODRIGUEZ - AMAYA, D. 2003. Carotenoid composition of hydroponic leafy vegetables. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51: 2603-2607p.
- KIMURA, M. y RODRIGUEZ - AMAYA, D. 2002. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of carotenoids in green leafy vegetables. Food Chemistry. 78: 389-398p.
- LICHTENTHALER, H. 1987 Application of chlorophyll fluorescence in physiological stress research and remote sensing.. Kluwer Academic Publishers. 143-152p.

- LIU, Y.; PERERA, C. y SURESH, V. 2007. Comparison in South East Asian countries to lutein. *Food Chemistry*. 101: 1533-1539p.
- MAIOCCHI, M. y AVANZA, J. 2004. Degradación de clorofilas y feofitinas a diferentes temperaturas. *Comunicaciones científicas y tecnologías*. Universidad nacional del Nordeste. España. 7: 121- 126p.
- MANGOS, T. y BERGER, R. 1997. Determination of the main products of chlorophyll at physiological maturity. *Zeitschiriff Lebensmitter*. 204: 345-350p.
- MARANGONI, A. y HEATON, J. 1996. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. *University of Guelph Canadá*. 7: 8-15p.
- MAROTO, J. 2000. Lechugas origen botánico generalidades y usos. Madrid. Pg. 27-43.
- MELENDEZ- MARTINEZ, A.; VICARIO, I; HEREDIA, F. 2007. Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Laboratorio de color y calidad de alimentos*. Universidad de Sevilla. España. 57: 109-118p.
- MOREIRA, R. 2003. Calidad de acelgas por métodos convencionales. *Lebensm-Wiss*. 36: 135-141
- NASKA, A.; FRIEL, S.; MOREIRAS. O. 2000. Availability of fruits and vegetables from 10 european countries. *British Journal of Nutrition*. 84: 549- 556p.
- PAMPLONA, J. 1999. *Enciclopedia de los alimentos y su poder curativo*. Biblioteca de educación y salud.
- PIROVANI, M. 2001. Medidas de control para el lavado y desinfección de hortalizas con soluciones cloradas. España. 654p.
- REGLAMENTO SANITARIO DE LOS ALIMENTOS (R.S.A.) 2010. Chile. 503: 175-176p.
- RICHTER, G. 1992. *Physiology of plant metabolism Germany*. 417p.
- SANGEETHA, R. BASKARAN, V. 2010. Composition of carotenoids and retinol equivalents in plants. *Food chemistry*. 119: 1584- 1590p.
- SACH (SOCIEDAD AGRONOMICA DE CHILE). 2009. Control y prevención de la contaminación industrial de frutas y hortalizas. SANTIAGO.

- SCHOEFS, B. 2000. Analyse der Farbstoffe in Kürbiskernöl. *Lebensmittel and Biotechnologie*. 11: 8-11p.
- SCHOEFS, B. 2002. Chlorophyll and carotenoid analysis in foodstuffs. Case by case. *Trends in Analytical Chemistry*. 33: 34-39p.
- SCHOEFS, B. 2003. Chlorophyll and carotenoid analysis in foodstuffs. Properties of pigments and methods of analysis. *Trends in Science and Technology of Food*. 13: 361-371p.
- SCHWARTZ, M.; NUÑEZ, H.; MUÑOZ, A. 1999. Efecto de la temperatura de la pulpa de Kiwi sobre el color, clorofilas y acido ascórbico. *Universidad de Chile. Santiago de Chile*. 49: 44-48p.
- SCHWARTZ, S. y VON ELBA, J. 1983. Kinetics of degradation of chlorophyll in plants pirofeotina. *Journal of Food Science*. 48: 1303-1306.
- STEED, J. y TONG, C. 1996. Degradation Kinetics of Green Color and Chlorophylls in Peas by Colorimetry and HPLC. *Journal of Food Science*. 61: 924-927p.
- SWEENEY, P. y MARTIN, M. 1961 Stability of chlorophyll in plants affected by pH. *Journal Food Science*. 27: 232-240p.
- TIJKENS, L. 2001. Modeling the effect of pH on color degradation blanched broccoli. *Innovative Food Science*. 2: 315-322p.
- UNGAR, N.; SIEVERDING, M.; STADNITSKI.T. 2013. Increasing fruit and vegetable intake, "five a day". *Institute of psychology. Germany*. 65: 200-204p.
- WATADA, A. y Qi, L., 1998. Quality of fresh-cut produce. *Postharvest Biology and Technology*. 15: 201-205p.
- WATADA, A.; KO, N. y MINOTT, D., 1996. Factors affecting quality of fresh-cut horticultural products. *Postharvest Biology and Technology*. 9: 115-12p.
- WETZEL, R y LIKENS, G., 2000. *Limnological Analyses*. 3: 163-169p.
- XUE, L. y YANG, L. 2009 Deriving leaf chlorophyll content of green leafy vegetables hyperspectral reflection. *Journal of Photogrammetry and Remote Sensing..* 64: 97-106p.
- YAMASHITA, N. KAWANISHI, S. 2010. Distinct mechanisms of DNA damage in apoptosis induced by quercetin and luteolin. 33: 623-63p.

7 ANEXOS

ANEXO 1 Diagrama de flujo proceso jugo de lechuga



FUENTE: Adaptación de la línea de flujo descrita por (HORMAZABAL, 1999).

ANEXO 2: Descripción de flujo del proceso jugo de lechuga de acuerdo a los protocolos de saneamiento industrial.

Cosecha: En esta primera etapa se cosecharon las lechugas con un tiempo de maduración óptima de consumo para ser llevadas a proceso.

Transporte: Luego de la cosecha, las lechugas fueron llevadas a la Universidad, para su procesamiento.

Recepción de materia prima: La temperatura debe ser de refrigeración, lo ideal es que la humedad relativa sea alta, alrededor del 90% a 95%. Debe existir una inspección visual.

Enfriado: Se debe dejar el producto en cámara de refrigeración por dos horas a una temperatura de 5°C, antes de procesar para mantener una correcta cadena de frío en toda la elaboración del producto.

Lavado y separación: Se realizó el corte de las hojas que cubren la pella, separándolas de ésta y depositándose cada una en bandejas especialmente destinadas a ello.

Se debe tener en cuenta que la materia prima utilizada se cultiva a ras y bajo el suelo, por lo tanto, la limpieza debe ser con agua potable y de forma muy rigurosa para eliminar todo resto de tierra y otros materiales extraños, además de disminuir la carga microbiana.

Higienización de productos: Una vez lavadas fueron trasladadas, a una tina con higienizante hipoclorito de sodio a una concentración de 100 ppm, por un tiempo de 5 min.

Enjuague: Luego de la aplicación del higienizante, se realizó el enjuague con abundante agua potable.

Extracción de jugo: Este se efectuó con un extractor de jugo, el cual logró la mayor concentración de jugo.

Envasado: Se realizó el envasado del producto en tubos falcon de 20 ml.

Pasteurización: En condiciones de temperatura de 65 °C por 25 min, (pasteurización lenta) con el objetivo de eliminar la flora patógena e inactivar la mayor parte de microorganismos y enzimas que pueden causar deterioro del jugo.

Enfriado: Seguido del tratamiento térmico, los tubos fueron introducidos a una tina con agua, en condiciones de temperatura de 5 °C, con el fin, de hacer efectiva la pasteurización.

Almacenamiento: Posteriormente los tubos fueron llevados a condiciones de congelación, a una temperatura de -18 °C, con el fin de lograr conservar sus propiedades, hasta el momento de iniciar el análisis de parámetros en laboratorio.

FUENTE: R.S.A. Chile, 2010

ANEXO 3: Metodología extracción de pigmentos

Incorporación del jugo a vaso precipitado: Colocar la muestra en un vaso precipitado de 100 ml que contenga 0.4g de carbonato de calcio precipitado.

Pipetear: Sacar 20 ml y llevar otro vaso precipitado de 50 ml. Diluir en 10 ml de acetona 85% v/v.

Éter de petróleo 0.1 N: Agregar 5 ml de éter de petróleo, hasta que aparentemente toda la pigmentación de la grasa y fibra soluble se haya separado. Incorporar 50 ml de agua destilada a la solución.

Filtrado: Filtrar el extracto a través de un disco de papel filtro e incorporar el filtrado a las cubetas espectrofotométricas.

Lectura en espectrofotómetro: Llevar las muestras a leer, las concentraciones de carotenoides, clorofila *a* y *b*.

FUENTE: Método AOAC Oficial 942.04, (1982).