Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Estudio de la aplicación de luz UV pulsada y su combinación con otras tecnologías emergentes en matrices frutales

Ferrario, Mariana Inés

2016-03-18

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Ferrario, Mariana Inés. (2016-03-18). Estudio de la aplicación de luz UV pulsada y su combinación con otras tecnologías emergentes en matrices frutales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Ferrario, Mariana Inés. "Estudio de la aplicación de luz UV pulsada y su combinación con otras tecnologías emergentes en matrices frutales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-18.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Industrias

Estudio de la aplicación de luz uv pulsada y su combinación con otras tecnologías emergentes en matrices frutales

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Industrial

Mariana Inés Ferrario

Directora de Tesis y Consejera de Estudios: *Dra. Sandra N. Guerrero*

Buenos Aires, 2016

Fecha de defensa: 18 de marzo de 2016

ESTUDIO DE LA APLICACIÓN DE LUZ UV PULSADA Y SU COMBINACIÓN CON OTRAS TECNOLOGÍAS EMERGENTES EN MATRICES FRUTALES

El objetivo principal de este trabajo residió en evaluar la eficiencia de la aplicación de luz pulsada (LP) en modo estanco (LP_e) y en flujo continuo (LP_c) y su combinación con ultrasonido de alta intensidad (US) y temperatura moderada (44-56 °C) para preservar jugos frutales. Se estudió la cinética de inactivación y la dinámica del crecimiento en el almacenamiento refrigerado de diversos microorganismos patógenos y deteriorativos inoculados y la flora nativa de varios jugos frutales (manzana, frutilla, naranja y melón) tratados por las tecnologías simples o combinadas mediante los modelos de Weibull, bifásico y doble Weibull. La efectividad de los tratamientos dependió de la absorbancia en el rango UV y turbidez de los jugos y del microorganismo evaluado. Estudios de citometría de flujo mostraron que células de *S. cerevisiae,* evidenciaron desestabilización de la integridad de la membrana y presencia de una subpoblación con daño subletal a bajas dosis de LP (12 J/cm^2) y mediante microscopía electrónica de transmisión, presencia de vacuolas expandidas, pérdida y coagulación del contenido intracelular, y menor densidad electrónica. Los estudios de flora nativa, color y análisis sensorial concluyeron en la definición de un jugo de manzana preservado por LP_c (0,73 J/cm^2; 155 mL/min) combinado con US (30 min) y temperatura moderada, seguro y de buena calidad organoléptica, cuya vida útil refrigerada fue de 6 días. El producto propuesto evidenció mediante un análisis de conglomerados aceptabilidad por un grupo específico de consumidores interesados en la acidez y el intenso sabor a manzana del producto.

.

Palabras clave: jugos frutales, luz pulsada, ultrasonido, tratamientos combinados, microbiología predictiva, análisis sensorial.

STUDY OF THE APPLICATION OF PULSED LIGHT AND ITS COMBINATION WITH OTHER EMERGING TECHNOLOGIES IN FRUIT MATRICES

The overall objective of this study was to evaluate the efficacy of pulsed light technology (PL) in a static (PL_s) or continuous flow (PL_c) modes in combination with high intensity ultrasound (US) to preserve fruit juices. The inactivation kinetics and growth dynamics under refrigeration conditions of relevant microorganisms and native flora in apple, strawberry, orange and melon juices treated by the proposed single or combined technologies were studied by Weibull, biphasic and double Weibull models. The antimicrobial efficiency of the applied treatments depended on absorptivity and turbidity of juices as well as the strains. Flow cytometry studies revealed sub-lethal damage at low PL doses (< 12 J/cm^2) and loss of membrane integrity in PL treated *S. cerevisiae* cells, while transmission electron microscopy observations showed expanded vacuoles, loss of inner content by puncture sites, less electronic density, among others. The combination US and PL_s showed additive effects in *S. cerevisiae* inactivation in apple juice. Analysis of native flora, colour and sensory properties of apple juice processed by the combined PL_c (0.73 J/cm^2, 155 mL/min) and US (30 min) treatment ratified a product microbiologically safe with good organoleptic quality, with a 6 day shelf life. Apple juice treated by the combined PL/US method exhibited high acceptability by a group of consumers interested in the acidity and intense apple flavour of the juice.

Keywords: pulsed light, ultrasound, fruit juices, combined treatments, predictive microbiology, sensory analysis.

Agradecimientos

A la Universidad de Buenos Aires, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por el aporte económico brindado para la realización de esta tesis.

A los integrantes del Departamento de Industrias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por proporcionarme el lugar de trabajo para llevar a cabo la investigación para esta tesis, y por su atenta colaboración con la asistencia de los equipos.

A la Dra. Sandra Guerrero por su excelente dedicación y constante atención en la dirección de esta tesis, por acompañarme a crecer profesionalmente y por su continuo aliento y apoyo.

A la Dra. Stella Alzamora por brindarme la excelente oportunidad de iniciar mi Doctorado mediante una beca de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica y por su asistencia.

A mis compañeros de trabajo Marcela, Mercedes, Analía, Paula, Eunice, Gabriela, Andrea y Silvia por su amistad y compartir largas horas de trabajo.

A mi familia por el acompañamiento a lo largo de toda mi vida, mis amigos y compañeros de facu… mil gracias por bancarme tantos años durante tantos exámenes y largas cursadas.

A mi familia…

INDICE

1 Introducción *Error! Bookmark not defined.*

1.1 Producción de frutas y sus derivados en Argentina *Error! Bookmark not defined.*

1.2 Naranja ..... Error! Bookmark not defined.

*1.2.1 Composición..... **Error! Bookmark not defined.***

1.3 Manzana ..... Error! Bookmark not defined.

*1.3.1 Composición..... **Error! Bookmark not defined.***

1.4 Frutilla..... Error! Bookmark not defined.

*1.4.1 Composición..... **Error! Bookmark not defined.***

1.5 Melón..... Error! Bookmark not defined.

*1.5.1 Composición..... **Error! Bookmark not defined.***

1.6 Composición de los jugos frutales ..... Error! Bookmark not defined.

1.7 Obtención de jugos frutales ..... Error! Bookmark not defined.

*1.7.1 Sidra de Manzana ("Apple cider") ..... **Error! Bookmark not defined.***

1.8 Ecología microbiana de frutas y derivados. ..... Error! Bookmark not defined.

1.9 Métodos de preservación de jugos frutales más utilizados *Error! Bookmark not defined.*

*1.9.1 Tratamiento térmico..... **Error! Bookmark not defined.***

*1.9.2 Tecnologías emergentes de preservación..... **Error! Bookmark not defined.***

*1.9.2.1 Campos eléctricos pulsados ..... **Error! Bookmark not defined.***

*1.9.2.2 Altas presiones hidrostáticas ..... **Error! Bookmark not defined.***

*1.9.2.3 Luz UV-C ..... **Error! Bookmark not defined.***

*1.9.2.4 Pulsos de luz de alta intensidad ..... **Error! Bookmark not defined.***

*1.9.2.4.1 Definición ..... **Error! Bookmark not defined.***

*1.9.2.4.1 Efecto de la LP sobre los microorganismos ..... **Error! Bookmark not defined.***

*1.9.2.4.2 Equipos de LP disponibles en el mercado..... **Error! Bookmark not defined.***

*1.9.2.4.3 Marco regulatorio..... **Error! Bookmark not defined.***

*1.9.2.4.4 Susceptibilidad de los microorganismos..... **Error! Bookmark not defined.***

*1.9.2.4.5 Ventajas y limitaciones..... **Error! Bookmark not defined.***

*1.9.2.4.6 Factores que determinan la eficiencia del procesamiento por LP..... **Error! Bookmark not defined.***

*1.9.2.4.7 Cuantificación..... **Error! Bookmark not defined.***

*1.9.2.5 Ultrasonido de alta intensidad..... **Error! Bookmark not defined.***

*1.9.2.5.1 Definición ..... **Error! Bookmark not defined.***

*1.9.2.5.2 Parámetros que afectan la efectividad del tratamiento por US **Error! Bookmark not defined.***

*1.9.2.5.3 Efecto sobre los microorganismos..... **Error! Bookmark not defined.***

*1.9.2.5.4 Equipos de US ..... **Error! Bookmark not defined.***

*1.9.2.5.4.1 Escala laboratorio **Error! Bookmark not defined.***

*1.9.2.5.4.2 Escala industrial **Error! Bookmark not defined.***

1.10 Tecnologías combinadas de preservación..... Error! Bookmark not defined.

1.11 Algunas herramientas de estudio que contribuyen a la determinación de la inocuidad de productos preservados ..... Error! Bookmark not defined.

1.11.1 Microbiología predictiva ..... ***Error! Bookmark not defined.***
1.11.1.1 Clasificación de los modelos matemáticos ..... ***Error! Bookmark not defined.***
1.11.1.2 Validación de los modelos matemáticos ..... ***Error! Bookmark not defined.***
1.11.1.3 Limitaciones ..... ***Error! Bookmark not defined.***
1.11.1.4 Aplicaciones ..... ***Error! Bookmark not defined.***
1.11.2 Citometría de flujo ..... ***Error! Bookmark not defined.***
1.11.3 Microscopía electrónica de transmisión ..... ***Error! Bookmark not defined.***

1.12 Estudio del color en los alimentos ..... *Error! Bookmark not defined.*
1.12.1 Medición de color con espectrocolorímetro o espectrofotómetros de reflectancia ..... ***Error! Bookmark not defined.***
1.12.2 Funciones de color ..... ***Error! Bookmark not defined.***
1.12.3 Análisis sensorial de alimentos ..... ***Error! Bookmark not defined.***
1.12.4 Jueces ..... ***Error! Bookmark not defined.***
1.12.5 Selección del panel ..... ***Error! Bookmark not defined.***
1.12.6 Selección del sitio de la prueba ..... ***Error! Bookmark not defined.***
1.12.7 Sala de prueba ..... ***Error! Bookmark not defined.***
1.12.8 Clasificación de las pruebas de evaluación sensorial ..... ***Error! Bookmark not defined.***
1.12.8.1 Pruebas discriminativas ..... ***Error! Bookmark not defined.***
1.12.8.2 Pruebas afectivas ..... ***Error! Bookmark not defined.***
1.12.8.3 Vida útil sensorial ..... ***Error! Bookmark not defined.***

2 Objetivos *Error! Bookmark not defined.*

2.1 Hipótesis y objetivo general ..... *Error! Bookmark not defined.*

2.2 Objetivos específicos ..... *Error! Bookmark not defined.*

3 Materiales y Métodos *Error! Bookmark not defined.*

3.1 Materia prima ..... *Error! Bookmark not defined.*

3.2 Reactivos ..... *Error! Bookmark not defined.*

3.3 Medios de cultivo ..... *Error! Bookmark not defined.*

3.4 Microorganismos ..... *Error! Bookmark not defined.*

3.5 Preparación de inóculos ..... *Error! Bookmark not defined.*

3.6 Caracterización de los jugos ..... *Error! Bookmark not defined.*

3.7 Estudios de inactivación ..... *Error! Bookmark not defined.*
3.7.1 Tratamiento LP en sistema estanco ..... ***Error! Bookmark not defined.***
3.7.1.1 Descripción del equipo ..... ***Error! Bookmark not defined.***
3.7.1.2 Estudios de reto microbiano ..... ***Error! Bookmark not defined.***
3.7.1.2.1 Efecto de la contaminación inicial de jugo de manzana en la efectividad del proceso ***Error! Bookmark not defined.***
3.7.2 Tratamiento de ultrasonido de alta intensidad ..... ***Error! Bookmark not defined.***
3.7.3 Estudios de reto microbiano en tratamiento LP_e en combinación con temperatura moderada ***Error! Bookmark not defined.***
3.7.4 Estudios de reto microbiano en tratamiento LP_e con pretratamiento US ***Error! Bookmark not defined.***
3.7.5 LP en flujo continuo (LP_c) ..... ***Error! Bookmark not defined.***
3.7.5.1 Caracterización del equipo de LP_c ..... ***Error! Bookmark not defined.***
3.7.5.2 Caracterización del procesamiento LP_c ..... ***Error! Bookmark not defined.***

3.8 Estimación de Energía eléctrica por orden ..... *Error! Bookmark not defined.*

3.9 Enumeración de la población sobreviviente ..... *Error! Bookmark not defined.*

3.10 Representación gráfica de las curvas de supervivencia .. *Error! Bookmark not defined.*

3.11 Modelado matemático ..... *Error! Bookmark not defined.*

3.11.1 Modelado matemático del estudio de la influencia de la contaminación inicial en la efectividad del tratamiento por LP_e ..... ***Error! Bookmark not defined.***

3.12 Dinámica del crecimiento de poblaciones microbianas sobrevivientes durante el almacenamiento en refrigeración de jugos frutales tratados con LP_e ..... *Error! Bookmark not defined.*

3.12.1 Evolución de los microorganismos inoculados y tratados con LP_e y US+LP_e. ***Error! Bookmark not defined.***

3.12.2 Evolución de la flora nativa ..... ***Error! Bookmark not defined.***

3.13 Evaluación del color en el almacenamiento ..... *Error! Bookmark not defined.*

3.14 Estudio del daño celular por citometría de flujo *Error! Bookmark not defined.*

3.15 Microscopía electrónica de transmisión ..... *Error! Bookmark not defined.*

3.16 Análisis sensorial ..... *Error! Bookmark not defined.*

3.16.1 Área de prueba ..... ***Error! Bookmark not defined.***

3.16.2 Jueces ..... ***Error! Bookmark not defined.***

3.16.3 Test de diferencia contra control ..... ***Error! Bookmark not defined.***

3.16.4 Test de campo ..... ***Error! Bookmark not defined.***

3.16.4.1 Segmentación ..... ***Error! Bookmark not defined.***

3.16.5 Test de vida útil sensorial ..... ***Error! Bookmark not defined.***

4 Resultados y Discusión *Error! Bookmark not defined.*

Parte I *Error! Bookmark not defined.*

4.1 Determinación de la dosis por LP_e ..... *Error! Bookmark not defined.*

4.2 Efectividad del tratamiento por LP_e de jugos frutales .... *Error! Bookmark not defined.*

4.2.1 Perfil de temperatura ..... ***Error! Bookmark not defined.***

4.2.2 Caracterización de los jugos frutales por absorbancia, turbidez y tamaño de partícula ***Error! Bookmark not defined.***

4.2.3 Estudios de reto microbiano ..... ***Error! Bookmark not defined.***

4.2.3.1 Modelado matemático de la respuesta microbiana ..... ***Error! Bookmark not defined.***

4.2.3.1.1 Análisis comparativo de los modelos matemáticos de predicción utilizados ***Error! Bookmark not defined.***

4.2.3.1.2 Análisis de componentes principales para los parámetros de los modelos. ***Error! Bookmark not defined.***

4.2.3.1.3 Utilización de esporas de A. acidoterrestris para determinar la influencia de la contaminación inicial del jugo de manzana en la efectividad del tratamiento por LP_e ***Error! Bookmark not defined.***

4.2.3.1 Dinámica del crecimiento de poblaciones microbianas sobrevivientes durante el almacenamiento en refrigeración de jugos frutales tratados con LP_e. ***Error! Bookmark not defined.***

4.2.3.1.1 Microorganismos inoculados ..... ***Error! Bookmark not defined.***

4.2.3.1.2 Flora nativa ..... ***Error! Bookmark not defined.***

*4.2.4 Análisis mediante citometría de flujo del estado fisiológico de las células microbianas frente al tratamiento LP_e ..... **Error! Bookmark not defined.***
*4.2.5 Evaluación del daño de células tratadas con LP_e mediante microscopía electrónica de transmisión ..... **Error! Bookmark not defined.***

***4.2 Efectividad de tratamiento por LP estanco combinado con otros factores de stress** Error! Bookmark not defined.*
*4.2.1 Utilización de ultrasonido de alta intensidad. Estudios de reto microbiano **Error! Bookmark not defined.***
*4.2.2 Utilización de temperatura moderada en el procesamiento LP_e **Error! Bookmark not defined.***
*4.2.2.1 Perfil de temperatura ..... **Error! Bookmark not defined.***
*4.2.2.2 Estudios de reto microbiano ..... **Error! Bookmark not defined.***
*4.2.3 Combinación de US y LP estanco asistido por temperatura ... **Error! Bookmark not defined.***
*4.2.3.1.1.1 Dinámica del crecimiento de la flora nativa sobreviviente durante el almacenamiento en refrigeración de jugos frutales con tratamiento US+LP_e. **Error! Bookmark not defined.***
*4.2.4 Análisis mediante citometría de flujo del estado fisiológico de las células microbianas frente al tratamiento combinado US+LP_e ..... **Error! Bookmark not defined.***
*4.2.5 Evaluación del daño de células sometidas a LP_e y US+LP_e por microscopia electrónica de transmisión ..... **Error! Bookmark not defined.***

***Parte III .....** Error! Bookmark not defined.*

***8.3 Efectividad del tratamiento por luz pulsada en flujo continuo (LP_c) .....** Error! Bookmark not defined.*
*8.3.1 Determinación de la dosis de LP_c ..... **Error! Bookmark not defined.***
*8.3.2 Efectividad del tratamiento por LP_c en jugo de manzana ..... **Error! Bookmark not defined.***
*8.3.2.1 Perfil de temperatura ..... **Error! Bookmark not defined.***
*8.3.2.2 Estudios de reto microbiano ..... **Error! Bookmark not defined.***
*8.3.2.2.1 Modelado matemático de la respuesta microbiana **Error! Bookmark not defined.***

***8.4 Efectividad del tratamiento de luz pulsada en flujo continuo, LP_c en combinación con US .....** Error! Bookmark not defined.*
*8.4.1 Estudios de reto microbiano ..... **Error! Bookmark not defined.***
*8.4.1.1 Comparación de la inactivación microbiana por LP_e, LP_c y US+LP_c **Error! Bookmark not defined.***
*8.4.2 Dinámica de crecimiento de la flora nativa sobreviviente durante el almacenamiento refrigerado de jugo de manzana natural tratado con US+LP_e ..... **Error! Bookmark not defined.***

***8.5 Efectividad del tratamiento de luz pulsada en flujo continuo, LP_c en combinación con US- Estudios de calidad sensorial y organoléptica** Error! Bookmark not defined.*
*8.5.1 Evolución del color en el almacenamiento refrigerado ..... **Error! Bookmark not defined.***
*8.5.2 Apariencia del jugo de manzana procesado mediante LP_c y US+LP_c .... **Error! Bookmark not defined.***
*8.5.3 Análisis sensorial ..... **Error! Bookmark not defined.***
*8.5.3.1 Test de diferencia contra control ..... **Error! Bookmark not defined.***
*8.5.4 Evaluación sensorial del jugo de manzana natural procesado mediante US+LP_c ..... **Error! Bookmark not defined.***
*8.5.5 Estimación de la vida útil sensorial del jugo de manzana natural procesado por US+LP_c **Error! Bookmark not defined.***

***9 Conclusiones** Error! Bookmark not defined.*

Parte III - Tratamiento por LP_c ***.....*** *Error! Bookmark not defined.*

10 Apéndice *Error! Bookmark not defined.*

10.1 Definiciones ***.....*** *Error! Bookmark not defined.*

10.1.1 Parámetros y estimadores .....**Error! Bookmark not defined.**

10.1.2 Significancia estadística .....**Error! Bookmark not defined.**

10.2 Análisis de varianza (ANOVA) ***.....*** *Error! Bookmark not defined.*

10.2.1 Test F de significación de la regresión .....**Error! Bookmark not defined.**

10.3 Coeficiente de determinación (R^2) ***.....*** *Error! Bookmark not defined.*

10.4 Análisis de residuales ***.....*** *Error! Bookmark not defined.*

10.4.1 Versus valores predichos, $\hat{Y}_i$ .....**Error! Bookmark not defined.**

10.5 Métodos de comparaciones múltiples por mínima diferencia significativa *Error! Bookmark not defined.*

10.5.1 Mínima diferencia significativa de Fisher (MDS) .....**Error! Bookmark not defined.**

10.5.2 Test de Dunnett .....**Error! Bookmark not defined.**

10.6 Regresión múltiple/Método de superficies de respuesta *Error! Bookmark not defined.*

10.6.1 Selección de la mejor ecuación de regresión .....**Error! Bookmark not defined.**

10.7 Análisis multivariado ***.....*** *Error! Bookmark not defined.*

10.7.1 Análisis de la varianza multivariado .....**Error! Bookmark not defined.**

10.7.2 Análisis de componentes principales .....**Error! Bookmark not defined.**

11 Bibliografía *Error! Bookmark not defined.*

1 Introducción

1.1 Producción de frutas y sus derivados en Argentina

La Organización Mundial de la Salud (OMS) promueve un consumo mínimo de 400 g de frutas y hortalizas por día, y un óptimo diario de cinco porciones de frutas o verduras, con el fin de prevenir enfermedades crónicas, en particular las cardiopatías, el cáncer, la diabetes tipo 2 y la obesidad (OMS, 2003). En la última década los consumidores a nivel mundial han puesto un interés creciente en el consumo de derivados de frutas por la conveniencia nutricional que los mismos representan. Sin embargo todavía en la Argentina, sólo el 4,8 % de la población consume al menos las cinco porciones diarias de frutas y verduras recomendadas, siendo el promedio de consumo por habitante inferior a 2 porciones por día. Es por ello que el Ministerio de Salud de la Nación lanzó en el 2010 la "Campaña Nacional de Promoción del Consumo de Frutas y Verduras" con el fin de que la población argentina conozca e incorpore a sus comidas frutas y verduras frescas de estación que aportan beneficios para la salud (Msal, 2010).

Además, la exigencia por adquirir productos de textura, flavor y apariencia lo más semejantes a la fruta fresca es cada vez mayor. Este patrón de consumo ha llevado, en los últimos años, al desarrollo de nuevas técnicas de preservación con el propósito de obtener frutas mínimamente procesadas mejorando su calidad y extendiendo su vida útil.

1.2 Naranja

La Argentina ocupa el octavo lugar en la producción mundial de cítricos con alrededor de 1670 mil toneladas. La producción de limón es las más significativa (50%), seguida de naranja (28%), mandarina (15%) y pomelo (8%) (Minagri, 2013a). Las plantaciones se hallan localizadas en dos grandes regiones: Noroeste (NOA) y Litoral Nordeste Argentino (NEA). En particular, la producción de naranja en Argentina está mayormente dirigida al mercado de fruta fresca. Sólo un 30 % de la producción de la misma se destina a la

industrialización. Asimismo, el jugo de naranja es el jugo cítrico más importante a nivel mundial. Se lo comercializa mayoritariamente concentrado y congelado, aunque también esterilizado y envasado asépticamente, y en una menor proporción fresco refrigerado. La producción mundial de jugo concentrado congelado de naranja es de aproximadamente 2,2 millones de toneladas. La Argentina con una producción de 8.000 toneladas anuales, tiene una mínima participación en el contexto internacional, (inferior al 1 %).

1.2.1 Composición

La naranja es una fruta de bajo contenido graso y bajo valor calórico. Aporta gran cantidad de pectinas, fibra soluble y en particular alto contenido de vitamina C, dado que 100 g de naranja aporta el 83 % de la ingesta diaria recomendada de este componente. También aporta varios ácidos orgánicos, entre ellos ácido málico, ácido cítrico, ácido ferúlico y ácido caféico (**Tabla 1.1**).

Tabla 1.1. Composición de la naranja

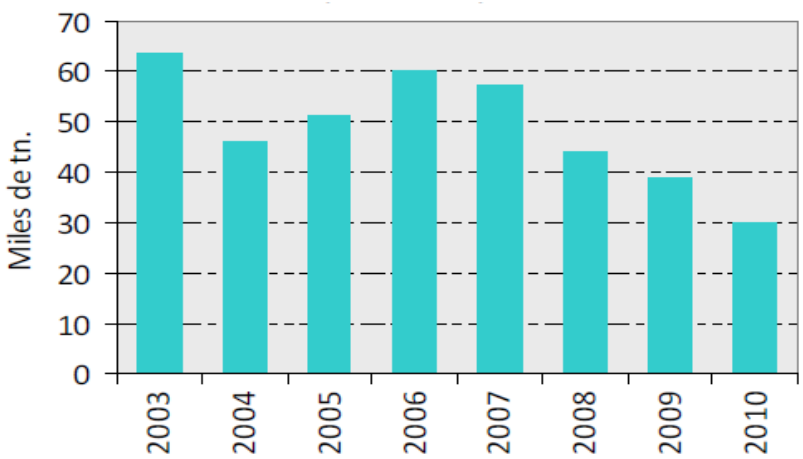
Composición por 100 g de porción comestible	
Calorías	42,0
Hidratos de carbono (g)	8,6
Fibra (g)	2,0
Potasio (mg)	200
Magnesio (mg)	36,0
Calcio (mg)	15,8
Hierro (mg)	0,3
Vitamina C (mg)	32,0
Fósforo (mg)	28,0
Vitamina A (µg)	40,0

1.3 Manzana

La producción argentina de manzana promedia las 900 mil toneladas anuales, donde la región del Alto Valle del Río Negro y Neuquén, concentra el

85 % del volumen total de manzana. Las principales variedades de manzana que se cultivan en Argentina son: Red Delicious (61,1 %), Granny Smith (15,1 %), Gala y Royal Gala (15 %), Crisp Pink (4,1 %) otras variedades (4,4 %) (Minagri, 2013). La producción de manzana se destina en un 56 % al consumo en fresco y 44 % a la industrialización de jugos y caldos de sidra. En la región del Alto Valle, Valle Medio y Mendoza, existe una red de agroindustrias elaboradoras de jugos concentrados, sidra, deshidratados, conservas, pulpas deshidratadas y licores. Los jugos concentrados se obtienen por concentración del jugo de distintas variedades de manzana (Alimentos argentinos, 2008). La producción argentina de jugo concentrado de manzana promedia las 50.000 toneladas métricas anuales. En la **Figura 1.1** se observa la evolución de la producción del jugo de manzana en la Argentina, la cual osciló entre 30 y 60 mil toneladas en el periodo comprendido entre 2003 y 2010. La industria emplea en promedio 6,7 kg de manzana para obtener 1 kg de jugo concentrado.

Figura 1.1. Evolución de la producción de jugo concentrado de manzana en la Argentina en el período 2003-2010 (SPE, 2010).



1.3.1 Composición

La manzana tiene un alto contenido de agua (85 %) y aporta hidratos de carbono fundamentalmente fructosa, glucosa y sacarosa. Contiene cantidades apreciables de fibra, tanto soluble como insoluble, siendo esta última la más

abundante. Las manzanas son una importante fuente de flavonoides diversos como los flavonoles, catequinas y prociaciadinas. En su composición presentan ácidos orgánicos como el caféico, p-cumárico, clorogénico, ferúlico, cítrico y málico (Magrama, 2000) (**Tabla 1.2**).

Tabla 1.2. Composición de la manzana Granny Smith

Composición por 100 g de porción comestible	
Calorías	41,5
Hidratos de carbono (g)	10,5
Fibra (g)	1,5
Magnesio (mg)	4,0
Vitamina C (mg)	4,0
Vitamina A (µg)	1,5
Vitamina E (mg)	0,5

1.4 Frutilla

En Argentina la producción de frutilla abarca una superficie cultivada de entre 1.000 y 1.250 hectáreas. El mercado interno absorbe prácticamente la totalidad de la producción nacional, que es de 20.000 - 25.000 toneladas por año. La mayor producción se concentra en Santa Fé, Tucumán y Buenos Aires. Pertenece a la familia Rosaceae, siendo *Fragaria ananassa* Duch, la especie que se cultiva comercialmente. El cultivo de frutillas admite diversas alternativas de procesado que van desde la preparación para consumo en fresco, a la industrialización mediante el trozado y posterior congelado de frutillas enteras para la elaboración de yogures, mermeladas, jugos, helados y otros variados productos industrializados (FAA, 2010).

1.4.1 Composición

Las frutillas están compuestas principalmente por agua (90 %), y en menor proporción por hidratos de carbono (con una cantidad moderada alrededor del 5% de su peso), fundamentalmente fructosa y glucosa. Son muy ricas en vitamina C (con un porcentaje incluso superior al que posee la

naranja), y ácido fólico. Entre los minerales se destacan el hierro, calcio y yodo, además del fósforo, magnesio y potasio. Contienen diversos ácidos orgánicos, entre los que destacan el ácido cítrico, málico, oxálico, y también contienen pequeñas cantidades de ácido salicílico. Las frutillas constituyen una de las frutas con mayor capacidad antioxidante, debido su alto contenido en antocianinas, polifenoles (ácido elágico) y de vitamina C (Moreiras y col., 2001) (**Tabla 1.3**).

Tabla 1.3. Composición de la frutilla

Composición por 100 g de porción comestible	
Calorías	41,0
Hidratos de carbono (g)	8,1
Proteínas (g)	0,8
Fibra (g)	1,6
Calcio (mg)	27,0
Potasio (mg)	244,0
Hierro (mg)	0,8
Vitamina C (mg)	60,0
Fósforo	27,0

1.5 Melón

El melón pertenece a la familia de las cucurbitáceas, la cual incluye también a la sandía, la calabaza, y los pepinos entre otros. Es una planta anual, es decir que florece, germina y sucumbe en el plazo de un año, de porte rastrero, tallos herbáceos muy ramificados y con un ciclo de cultivo de entre 3 y 5 meses. Sus colores pueden ser muy diversos en función del tipo de melón. El melón constituye la cuarta fruta más consumida del mundo, luego de las naranjas, las bananas y las uvas. La parte aprovechable de la planta del melón es el fruto, dedicado principalmente a la alimentación humana. Del fruto prácticamente todo es comestible: la corteza (en confituras), las semillas (como frutos secos o para la obtención de aceite) y fundamentalmente la pulpa (en fresco o procesado). También se consume como jugo obtenido y preservado

por distintos métodos desde los más tradicionales, tal como la pasteurización a los más modernos, como los denominados “cold-pressed” procesados en frío por altas presiones hidrostáticas (**Introducción, apartado 1.9.2.2**).

Los principales tipos comerciales de melón cultivados en Argentina son: Rocío de Miel o HoneyDew, Amarillo, Escrito o Reticulado, Galia, Charentais y Piel de Sapo. En la Argentina el cultivo de melón se encuentra difundido en las provincias de San Juan, Santiago del Estero, Entre Ríos, Mendoza, Buenos Aires, Río Negro y en menor medida en Salta. La provincia que concentra la mayor superficie cultivada es San Juan con 1.500 (mil quinientas) hectáreas destinadas mayormente al mercado interno. Le siguen en importancia Santiago del Estero, con 800 (ochocientas) hectáreas y Mendoza con 400 (cuatrocientas) hectáreas. La producción en Entre Ríos se ajusta al cultivo bajo invernadero con una superficie cercana a 20 (veinte) hectáreas. Otras provincias que participan ocasionalmente, sumando a la superficie total del país, son Buenos Aires, La Rioja y Catamarca (Campos y col., 2006).

El problema que enfrenta el cultivo de melón en Argentina es el destino del excedente de producción que no puede comercializarse en el mercado de fruta fresca, ya sea porque no hay demanda (sobreoferta) o porque la calidad de la fruta no alcanza los requerimientos necesarios para su consumo en fresco. Una de las posibles soluciones involucra la realización de estudios para detectar nuevos mercados y opciones para industrializar el melón. Como por ejemplo, la elaboración de jugo de melón y bolitas de melón congeladas (Mincyt, 2007). Si bien Argentina es productor de jugo de naranja y manzana y en menor medida de jugos de frutilla y melón, no es un consumidor importante de jugos de frutas naturales en el mercado doméstico (Ceballos Guzmán, 2010). Es por ello que los países de América Latina ven más factible la exportación a Estados Unidos o Europa donde el poder adquisitivo y la concienciación de la salud respecto al consumo de frutas está más desarrollada a nivel general (Industria Alimenticia, 2013).

1.5.1 Composición

El melón contiene una alta cantidad de agua (90-95 %), una cantidad de azúcar inferior a la de otras frutas (6 %) a su vez bajo contenido de grasa, lo que lo convierte en un fruto de poco contenido calórico. Aporta la mitad de la dosis diaria recomendada de vitamina C y una importante cantidad de ácido fólico. También es una fuente importante de provitamina A, potasio, y en menor medida de fósforo, hierro y magnesio (**Tabla 1.4**).

Tabla 1.4. Composición del melón

Composición por 100 g de porción comestible	
Calorías	52,4
Hidratos de carbono (g)	13,1
Fibra (g)	0,8
Potasio (mg)	11,8
Magnesio (mg)	11,8
Calcio (mg)	15,8
Hierro (mg)	0,4
Vitamina C (mg)	32
Folatos (µg)	2,7
Provitamina A (µg)	3

1.6 Composición de los jugos frutales

El ***jugo de fruta*** es el líquido extraído a partir de la fruta madura. Los jugos son sustancias heterogéneas que constan de una fase dispersa llamada "pulpa" y otra fase líquida. Esta última es una solución acuosa de azúcares, ácidos orgánicos, compuestos nitrogenados, vitaminas, sustancias pécticas, minerales, compuestos aromáticos, pigmentos y flavonoides, que en conjunto constituyen los sólidos solubles. La definición de madurez varía según el tipo de fruta, y en general, los niveles de azúcares y ácidos orgánicos indican el estado de madurez. En la maduración, el contenido de azúcares aumenta y el de ácidos disminuye (Yúfera, 1998). El dulzor del jugo proviene de disacáridos,

como la sacarosa, y de monosacáridos, como la fructosa y glucosa. Los ácidos orgánicos otorgan la acidez del jugo. Los más comunes son el cítrico, málico y tartárico, pero el fumárico, succínico y benzoico pueden estar también estar presentes. El nivel de grados Brix de los jugos será el correspondiente al jugo exprimido de la fruta y el contenido de sólidos solubles del jugo de concentración natural. Según el CODEX Alimentarius (2005), los grados Brix de los jugos de naranja, manzana, frutilla y melón no pueden ser inferiores a 11,2-11,8; 11,5; 8,0 y 7,5, respectivamente (**Tabla 1.5**). El pH del jugo juega un rol importante en la severidad de los tratamientos de preservación a aplicar. Valores bajos de pH constituyen un estrés adicional favoreciendo la destrucción de microorganismos, aspecto de particular importancia cuando se quieren obtener derivados mínimamente procesados.

Tabla 1.5. Valores mínimos de °Brix y acidez permitidos de jugos de fruta y niveles aportados de ácido ascórbico.

Parámetro	Naranja	Manzana	Melón	Frutilla
° Brix[1]	11,2-11,8	11,5	8,0	7,5
Acidez[2] (ác. cítrico anhidro %m/m)	0,5	0,4	0,03	0,65
Ácido ascórbico[1] (mg/100 mL)	50	4	32	60

[1] CODEX Alimentarius (2005). [2] Ministerio de Salud y Protección Social (2013).

1.7 Obtención de jugos frutales

El método de extracción del jugo influye en las características físico-químicas y sensoriales del jugo resultante. Existen diferentes procedimientos según el tipo de fruta (**Tabla 1.6**, FAO, 2001). En el procedimiento de extracción inevitablemente se ponen en contacto numerosos componentes y sistemas enzimáticos, originariamente alojados en diferentes compartimentos, que pueden determinar reacciones y variaciones negativas en el color, sabor y aroma.

Tabla 1.6. Procedimiento de obtención del jugo según las características de la fruta

Fruta	Tipo	Procedimiento
Naranja	Firme, Semillas y cáscara no comestible	Escariado, prensado de pulpa
Manzana	Firme, Semilla no comestible	Molienda gruesa, prensado
Melón	Suave, semillas y cáscara no comestibles	Pre-pelado, prensado de pulpa
Frutilla	Suave, todo comestible	Cortado, molienda, prensado

Existen distintos tipos de prensado que afectan la calidad y el rendimiento del jugo obtenido (FAO, 2001). El prensado en frío involucra la utilización de una prensa hidráulica que lentamente extrae elevados niveles de nutrientes del producto gracias a la aplicación de una corriente de aire de muy baja temperatura. El mayor beneficio de esta metodología es que genera un elixir completamente libre de pulpa, lo cual lo hace muy fácil de digerir y absorber (Helms, 2014). Este tipo de prensado genera menor rendimiento y color más claro que el prensado en caliente. Éste último involucra la aplicación

de calor durante un dado tiempo determinado y se obtiene un gran rendimiento de un jugo con un color fuerte y homogéneo.

La operaciones post-extracción abarcan la clarificación enzimática, centrifugación, filtración, homogenización, desaireación, concentración, recuperación de aromas, pasteurización, almacenamiento y envasado. El tipo de operación a aplicar depende del tipo de jugo que se desee obtener. En la **Figura 1.2a** se muestra, a modo de ejemplo, los distintos procesamientos aplicados para obtener los distintos jugos de manzana.

1.7.1 Sidra de Manzana ("Apple cider")

En este apartado se hace una breve mención al jugo integral sin pasteurizar, comercializado como "apple cider" en los EE.UU y Canadá, debido a la confusión existente entorno a la terminología utilizada en distintos países y con el propósito de definir los distintos tipos de derivados frutales. Mientras que industrialmente también se producen jugos o néctares que contienen parte de la pulpa de la fruta (jugo integral), la gran mayoría de estos productos se somete a despectinización (jugo clarificado). En la **Figura 1.2b** se muestra la diferencia en la apariencia de los dos productos, siendo evidente la turbidez de la sidra de manzana. La sidra de manzana se elabora artesanalmente o en pequeñas unidades, con un proceso bastante simple, el cual consiste en un primer paso de lavado, cortado y maceración de las manzanas. Luego, se emplea una tela en la cual se envuelve el procesado de manzana. A continuación, una prensa hidráulica exprime la masa de las manzanas envueltas en la tela y finalmente se obtiene el jugo denominado "sidra de manzana", el cual se envasa y se refrigera.

La sidra de manzana es un producto de vida útil corta, de dos semanas aproximadamente, ya que las levaduras que naturalmente contiene en pocos días empiezan a fermentar el jugo y dan origen a la bebida alcohólica que se conoce a la mayoría de los países "Hard Cider" (EE.UU.) y que no corresponde a las características del producto descripto en este apartado. La sidra de manzana hasta la década de los ochenta se consideraba un producto seguro debido a su naturaleza ácida. Desde entonces, sin embargo, varios

brotes de ETAs (enfermedades transmitidas por alimentos) implicaron a este producto y se empezaron a tomar medidas adicionales para asegurar su inocuidad.

Figura 1.2. a) Esquema que resume la elaboración de distintos tipos jugo de manzana. b) Jugo de manzana clarificado (derecha) y Jugo de manzana integral o sidra de manzana (izquierda)

a)

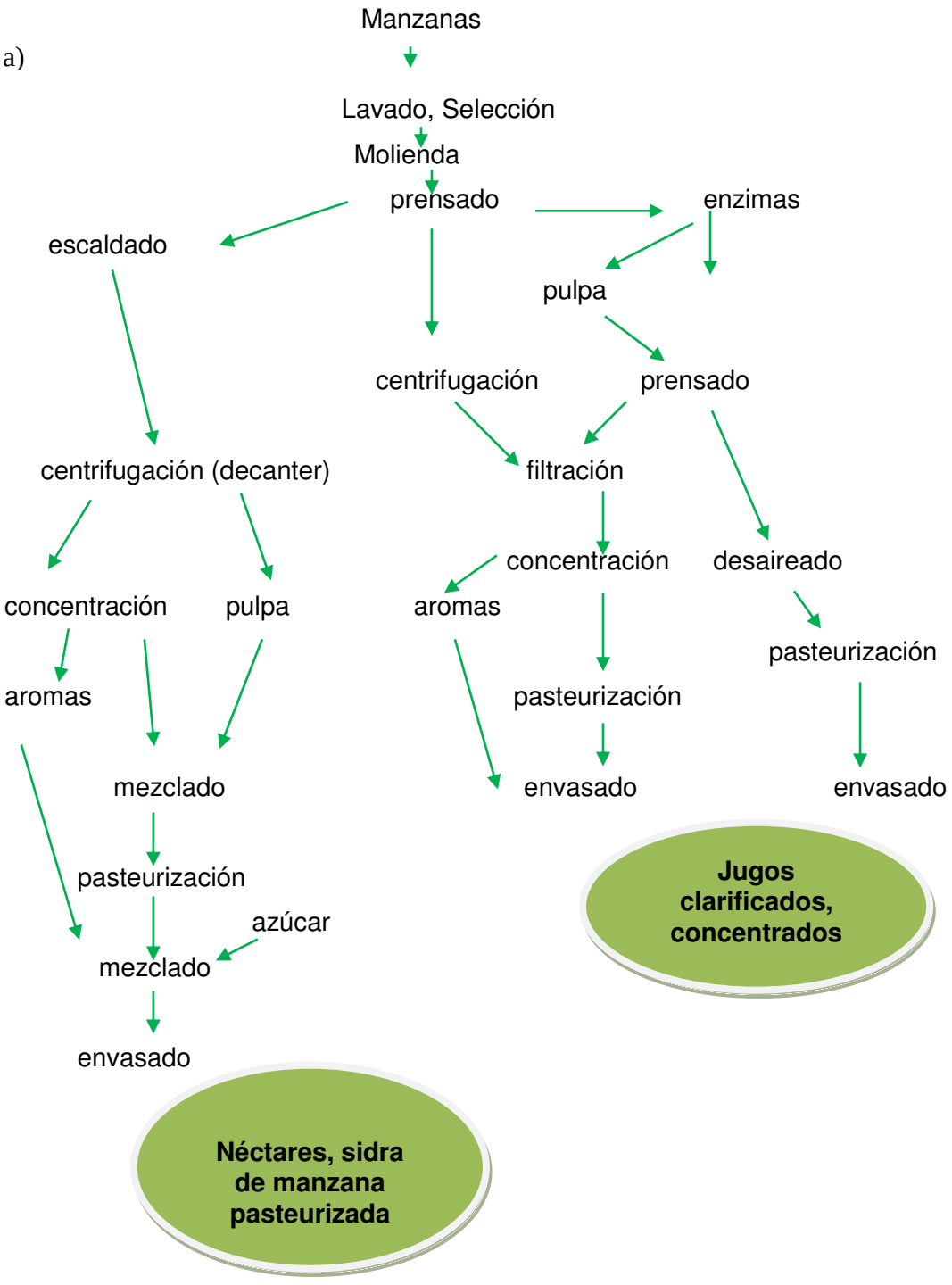


Figura 1.2. ***Continuación…***

b)

1.8 Ecología microbiana de frutas y derivados.

La microflora de los frutos frescos está constituida por una población primaria o nativa cuya presencia y cantidad difiere con el área geográfica, condiciones climáticas, tratamientos con agroquímicos, cultivar y aún de las distintas partes del fruto (Bracket, 1999). Las causa del deterioro microbiológico en naranja entera es principalmente fúngica, producida en mayor grado por *Penicillium digitatum*; *Penicillium italicum, Alternaria citri, Fusarium spp.* y *Trichoderma viride* (Ferreyra, 2004), mientras que en frutillas los hongos más encontrados son *Botrytis cinerea*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Rhizopus*. El melón también es deteriorado principalmente por *Rhizopus* y la manzana por *Penicillium*, *Botrytis*, *Colletetrichum*, *Mucor* y *Monilinia* (Barth y col., 2009). Otros microorganismos deteriorativos menos frecuentes son mohos de los géneros *Trichoderma*, *Aureobasidium pullulans* y algunas levaduras (Tournas y Katsoudas, 2005). Una microflora secundaria (hongos, bacterias, parásitos, virus, etc) proveniente de fuentes externas, puede contaminar los frutos durante las etapas de pre y postcosecha, almacenamiento e industrialización. Las posibles fuentes de contaminación precosecha incluyen: suelo, agua de riego, agua utilizada para la aplicación de insecticidas y fungicidas, abonos a partir de deshechos animales, insectos, pájaros, animales domésticos. La contaminación postcosecha puede provenir de la manipulación, equipamiento de cosecha, contenedores, transporte, equipamiento de proceso, insectos, etc. Janisiewicz y col., (1999) demostraron que la mosca de la fruta resultó ser un buen vector para la contaminación de manzanas con daños superficiales, con una cepa de *E. coli* O157:H7 marcada

con fluorescencia. El proceso de lavado de la fruta sana, que tiene lugar previo a la extracción del jugo, elimina mayoritariamente la flora secundaria y en mucha menor medida a la flora primaria. De este modo, restos de la flora microbiana puede introducirse en el jugo.

Los jugos concentrados y los jarabes de fruta (con a_w reducida y alta concentración de azúcar) son alterados por hongos y levaduras osmofílicos tales como *Zygosaccharomyces bailii* y *Z. rouxii*, *Aspergillus Níger*, *Eurotium* spp. Y *Penicillium* spp. (Pitt y Hocking, 1997, Gould y Jones, 1989), *Candida* spp, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula* spp., *Brettanomyces intermedis*, *Schizosaccaromyces pombe*, *Totulopsis holmii*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranifaciens*) (Arias y col., 2002, Stratford y col., 2000). La fermentación acética o láctica, producida por bacterias heterofermentativas de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, y homofermentativas del género *Pediococcus* ocurre principalmente en el rango de 32 °C a 35 °C, dando como resultado la producción de ácido láctico, ácido acético, etanol, CO_2, y eventualmente diacetilo y mucílagos, provocando la opalescencia del jugo, formación de burbujas, aspecto gomoso y/o sabor anormal a manteca (Ferreyra, 2004). Esta contaminación proviene de la superficie de las frutas y la no adecuada sanitización del equipamiento utilizado para el procesamiento. La refrigeración (0-5 °C) retarda pero no previene del deterioro de los derivados frutales.

Hace ya algunos años se ha identificado una bacteria emergente deteriorativa en productos derivados de frutas contaminados, como jugo de manzana envasado asépticamente y jugo de naranja: *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Wisotzkey y col., 1992). Este microorganismo no patógeno, es esporoformador, termoacidófilo y está caracterizado por tener ácidos grasos ω-alicíclicos como principal constituyente lipídico de la membrana, a diferencia de *Bacillus acidoterrestris*. La detección visual de la contaminación es difícil, debido a que no produce gas durante el desarrollo y por lo tanto, no se hinchan los contenedores. *A. acidoterrestris* es considerado microorganismo alterador debido a que produce a partir de la vainillina (Smit y col., 2011) 2-6 dibromofenol y 2-metoxifenol (guaiacol), los cuales en pequeñas cantidades (ppb), provocan malos olores y sabores (Oteiza, 2011). Este microorganismo ha sido aislado de varios jugos ácidos como manzana, tomate, uva blanca, naranja y ananá (Bevilacqua y col., 2010).

El número reportado de brotes de infecciones humanas asociadas con el consumo de frutas, vegetales y jugos de fruta no pasteurizados se ha incrementado en los últimos años. Las posibles causas comprenden cambios en los hábitos alimentarios, métodos de producción y procesamiento, fuentes de producción y la emergencia de patógenos que previamente no se reconocía que estuvieran asociados con materias primas frutihortícolas (Beuchat y Ryu, 1997).

La supervivencia y crecimiento de un patógeno en estos productos están determinados por sus capacidades metabólicas, pero sus manifestaciones pueden estar fuertemente influenciadas por factores intrínsecos y extrínsecos. Por ejemplo, el desarrollo de hongos puede producir incremento del pH, aumentando las probabilidades de crecimiento de bacterias patógenas.

Los alimentos ácidos, como los jugos de fruta, no fueron reconocidos como vehículo de enfermedades transmitidas por alimentos, hasta que recientemente (desde 1991) se documentaron varios brotes de *Escherichia coli* O157:H7, diferentes serotipos de *Salmonella enterica* y el parásito protozoario *Cryptosporidium parvum* asociados a jugo de manzana y jugo de naranja no pasteurizados, en los Estados Unidos y Australia (Mazzotta, 2001; Sivapalasingam y col., 2004; Vojdani y col., 2008) y *L. monocytogenes* en tomate, apio y lechuga (Ho y col., 1986). Estos incidentes llevaron a que la Administración Federal de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) estableciera normativas a implementarse a partir de 2002 para asegurar la sanidad de estos productos, según el tamaño de la planta productora. Los requerimientos incluyen la implementación de los principios del Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP) en la producción de jugo fresco, y la aplicación de tratamientos que aseguren la reducción de al menos 5 ciclos logarítmicos del microorganismo de significación pública identificado como el más resistente al tratamiento particular aplicado (FDA, 2001). La norma no especifica el tipo de tratamiento a aplicar, sino que considera la letalidad acumulada por la utilización de más de un tratamiento, posibilitando la aplicación del concepto de barreras y la obtención de productos mínimamente procesados. HACCP es obligatorio tanto en EE.UU como en la Unión Europea. En el mercado internacional constituye una exigencia que se materializa en forma de barreras al comercio. El sistema se basa en la identificación de

peligros potenciales para la inocuidad de los alimentos, su control a través de medidas preventivas y el continuo monitoreo de las mismas (FDA, 1998).

Los exportadores de alimentos necesitan contar, además, con garantías de inocuidad en sus procesos mediante el aval del Estado o de certificadoras de reconocimiento internacional. En nuestro país, aunque el requerimiento de plan HACCP no es obligatorio, el SENASA homologa los sistemas para productos elaborados de origen animal. Para el resto de los alimentos el aval sólo puede conseguirse a través de una certificadora privada.

La guía desarrollada por la FDA incluye una lista de "microorganismos pertinentes", dentro de los que se encuentra *L. monocytogenes* (FDA, 2002). *Listeria monocytogenes* es un bacilo gram-positivo no formador de esporos patógeno, ampliamente distribuido en el ambiente y que se encuentra asociado con la suciedad, heces de pájaros y animales y, aguas servidas (Beuchat, 2002). Históricamente, los brotes de listeriosis han sido asociados primariamente a carnes listas para consumo, debido a la resistencia de *L. monocytogenes* a las sales y nitritos usadas como preservadores; a productos lácteos por su resistencia a las temperaturas de refrigeración; y al de consumo de productos inadecuadamente calentados o recontaminación de alimentos pasteurizados (Yuste y col., 2002). También se ha demostrado que *L. monocytogenes* tiene mayor resistencia térmica que otros patógenos como *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* (Baumann y col., 2005).

Aunque la listeriosis humana es esporádica, se han reportado casos con consecuencias severas en niños menores de 1 año, mujeres embarazadas, adultos inmunodeprimidos y ancianos. Las manifestaciones de la enfermedad incluyen meningitis, abortos y septicemia perinatal. En los casos diagnosticados, la mortalidad es del 30%, afectando especialmente a ancianos y recién nacidos. La mayoría de los individuos saludables sólo presenta síntomas menores como nauseas, diarrea y/o fiebre no muy alta. En muchos casos estos síntomas, similares a los de una gripe, pueden no ser atribuidos a una enfermedad transmitida por alimentos (ETA), por lo que la mayoría de los casos de listeriosis no son reportados (Hoffmans y col., 1997).

Este patógeno de naturaleza ubicua ha sido recuperado a partir de jugo de manzana sin pasteurizar (pH 3,8) (Sado y col., 1998); jugo mezcla de manzana y frutos rojos (frambuesa) sin pasteurizar (pH 3,8) y jugo de manzana

(pH 3,7) luego de 1 día de almacenamiento a 5 ºC (Baumann y col., 2005). Otro estudio confirmó que *L. monocytogenes* fue capaz de sobrevivir en jugos concentrados de manzana, naranja, ananá y uva blanca (pH 3,6 a 5,5) (Oyarzábal y col., 2003).

La supervivencia de este patógeno a valores de pH bajos (3,0 a 4,5) ha recibido poca atención, probablemente debido a que se asume su rápida muerte bajo estas condiciones. Sin embargo, resultados obtenidos por Parish y Higgins, (1989) en sistemas modelo ajustados a pH 3,6, indicaron que el tiempo necesario para reducir la población de *L. monocytogenes* desde un inóculo inicial de 10^6 UFC/ml a niveles indetectables fue de 20 días a 4 ºC y de 5 días a 30 ºC. Por otra parte, Ferrante y col. (2007) demostraron que *L. monocytogenes* puede sobrevivir en jugo de naranja luego de ser tratado térmicamente a 45 ºC durante 50 min. Por lo tanto, en productos de alta acidez refrigerados puede encontrarse *Listeria* y puede producirse una masiva contaminación si estos alimentos son consumidos en un período corto de tiempo.

Se ha comprobado que bacterias patógenas como *Listeria* y *Salmonella* no crecen activamente en jugo de fruta con pH < 4,4, pero sí pueden sobrevivir y adaptarse al ambiente ácido (Parrish, 1998). Está bien documentado que la adaptación de estos patógenos al medio ácido, aumenta la tolerancia a condiciones de crecimiento desfavorables y extiende su supervivencia, pudiendo incrementar también su resistencia térmica. Mazzotta (2001) estudió la inactivación térmica (56 a 62 ºC) de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* y *L. monocytogenes* en jugos de manzana, naranja y uva blanca ajustados a pH 3,9, a partir de cultivos en fase estacionaria y cultivos adaptados al medio ácido. Este autor demostró que la adaptación al medio ácido incrementó la resistencia térmica de los tres patógenos a todas las temperaturas evaluadas, y que dicho aumento de los valores de tiempo de reducción decimal (D) fueron mayores en los casos de *L. monocytogenes y E coli* O157:H7*,* resultando la primera más resistente a temperaturas de tratamiento mayores a 65 ºC.

1.9 Métodos de preservación de jugos frutales más utilizados

Existen numerosos métodos de preservación de los jugos frutales que involucran métodos tradicionales como el tratamiento térmico, concentración, deshidratación por congelación, refrigeración, tratamientos químicos, filtración por membranas, y emergentes como la aplicación de altas presiones hidrostáticas, campos eléctricos pulsados o la luz UV-C (Root y Barrett, 2005). Debido a la amplísima variedad de tecnologías existentes para la preservación de jugos, a continuación sólo se describirán los métodos térmicos tradicionales y algunas tecnologías emergentes.

1.9.1 Tratamiento térmico

En la actualidad, la aplicación de calor es el método de procesamiento más común a nivel mundial, por su habilidad de inactivar microorganismos y enzimas deteriorativos (Rawson y col., 2011). El tratamiento térmico de un alimento depende de: la termorresistencia de los microorganismos y enzimas presentes en el alimento, la carga microbiana inicial que contenga el alimento, el pH del alimento y el estado físico del alimento. En el caso de los jugos, existen diferentes tratamientos, los cuales difieren en la temperatura y el tiempo de proceso empleados (**Tabla 1.7**). Los mismos se emplean de acuerdo con los requerimientos de las autoridades sanitarias de regulación, la industria y el consumidor. La pasteurización es un tratamiento térmico que se utiliza desde comienzos del siglo XX, la cual se convirtió en una medida de seguridad imprescindible para eliminar los posibles microorganismos patógenos presentes en los jugos además de ayudar a prolongar su vida útil reduciendo la carga de microorganismos descomponedores. La pasteurización de los jugos está calculada para la reducción de 5 ciclos logarítmicos de los oocistos de *Cryptosporidium parvum,* siendo el mismo más termoresistente que los patógenos bacterianos.

Tabla 1.7. Tratamientos térmicos tradicionalmente utilizados en el procesamiento de jugos (Renard y Maingonnat, 2012).

Tipo de tratamiento	Temperatura - tiempo	Tipo de envasado
Pasteurización (LTLT)	71 °C por 3 s para jugo de naranja y 6 s para jugo de manzana	No Aséptico
Pasteurización (HTST)	95-98 °C por 15-30 s	No Aséptico
Ultrapasteurización (UHT)	138 °C por 2 s	No Aséptico

La pasteurización HTST, de sus siglas en inglés "High Temperature Short Time", consiste en someter al jugo a una temperatura de entre 95 y 98 °C por 15 a 30 segundos, generalmente en equipos que disponen de intercambiadores de calor donde la transferencia de calor tanto para el tratamiento térmico como para el proceso de enfriamiento es muy eficiente. Mediante este tratamiento se pueden procesar en forma continua grandes volúmenes de producto, y por ser un sistema cerrado, existe escasa probabilidad de contaminación del producto cuando se aplican buenas prácticas de procesamiento (Miller y Silva, 2012).

La ultrapasteurización o pasteurización UHT es un tratamiento a mayor temperatura, en donde el jugo se somete durante por lo menos 2 segundos a una temperatura de 138 °C, mediante un proceso térmico de flujo continuo, y posteriormente es enfriado a menos de 5 °C y envasado en forma no aséptica en envases estériles y herméticamente cerrados. Con este tratamiento térmico se destruyen prácticamente todos los microorganismos, las toxinas y las enzimas más termorresistentes. Si bien no se consigue una completa esterilización (que es la ausencia total de microorganismos y de sus formas de resistencia), se consigue la denominada "esterilización comercial".

Las enzimas que deben ser inactivadas en los jugos frutales no están completamente establecidas. Sin embargo, la pectinmetilesterasa (PME), la polifenoloxidasa y la peroxidasa generalmente están presentes y son capaces de ocasionar cambios indeseables. La PME es la más predominante y la más resistente al tratamiento térmico (Miller y Silva, 2012). La PME hidroliza los enlaces metiléster del polímero de pectina produciendo la liberación de grupos carboxílicos, que reaccionan con los iones Ca^{+2} desestabilizando el sistema, con la subsiguiente pérdida de turbidez (clarificación con formación de dos fases) en el jugo natural y gelificación en jugo concentrado (Sentandreu y col.,

2005). La inhibición de las enzimas estabiliza la pulpa en suspensión, manteniendo la turbidez de los jugos, factor de calidad importante para la aceptación por parte del consumidor. Los jugos de naranja con escaso contenido en pulpa se tornan acuosos, de viscosidad reducida y son considerados jugos de baja calidad. Sin embargo, las altas temperaturas necesarias para la inactivación de enzimas, donde la práctica comercial recomendada considera un tratamiento a 90 ºC durante 60 segundos, tienen un impacto negativo sobre otras características sensoriales y nutricionales, respecto del jugo fresco (Famworth y col., 2000). El daño en las propiedades sensoriales y nutricionales de los jugos procesados debido a la acción de tratamientos térmicos tradicionales, ha centrado el interés en nuevos métodos de preservación sin el uso de calor o al menos sin la intensidad de los tratamientos convencionales.

Numerosos estudios sobre las características de los jugos frutales tratados térmicamente, han permitido demostrar que si bien el tratamiento logra aumentar el periodo de vida útil de los jugos, su calidad desde el punto de vista sensorial y nutricional se ve afectada en mayor o menor medida. El aroma original de los jugos frescos se ve particularmente afectado por el tratamiento térmico, el cual afecta el contenido de muchos componentes volátiles del jugo, disminuyendo las concentraciones de ciertos compuestos tales como etil-butirato, linalool, hexanal y decanal, y aumentando las concentraciones de otros compuestos como α-terpineol y terpinen-4-ol. El etil-butirato y el linalool son componentes importantes del flavor a naranja fresca, mientras que el α-terpineol contribuye a la aparición de olores desagradables. El estudio de este efecto ha llevado a que se modifiquen algunas condiciones de proceso y a que se adicione la fracción volátil recuperada, particularmente durante la concentración del jugo, con el propósito de obtener un perfil aromático similar al jugo fresco (Jordán y col., 2003). El jugo fresco exhibe concentraciones mayores de ácido ascórbico y menor densidad que el jugo pasteurizado (Famworth y col., 2000), factores que influyen tanto en la calidad nutricional como sensorial del jugo. La oxidación del ácido ascórbico, compuesto responsable de atributos sensoriales y nutricionales del jugo, depende del tratamiento térmico utilizado, además de la presencia de oxígeno y de la luz (Renard y Maingonnat, 2012). Por otra parte, los tratamientos térmicos

degradan los pigmentos responsables del color de los jugos frutales, como las antocianinas, carotenoides y betalaninas (Renard y Maingonnat, 2012).

Las autoridades sanitarias y los fabricantes están enfocados en buscar nuevos tratamientos no térmicos y/o disminuir la severidad de los tratamientos térmicos tradicionales, a modo de mejorar las propiedades organolépticas y nutricionales de los jugos, debido a la demanda de jugos frescos y sin pasteurizar. Esta búsqueda es aún un desafío sin cumplimentar debido a que se ha reportado una mayor incidencia de contaminación de jugos frutales con *E. coli* O157:H7. Además, ha habido un incremento en el consumo de jugos de frutas tropicales como el jugo de melón, que están caracterizadas por presentar menores valores de acidez que los jugos cítricos y de manzana tradicionales, lo que provoca un foco adicional en el tipo de procesamiento que estos productos deben recibir, dado que la alta acidez, es una barrera adicional para la inactivación microbiana.

1.9.2 Tecnologías emergentes de preservación

La demanda creciente de alimentos mínimamente procesados que, siendo seguros, conserven las características nutricionales y respeten las exigencias medioambientales, justifica el desarrollo de nuevas tecnologías para la conservación y transformación de alimentos. Esta evolución y desarrollo están obligando a las industrias alimentarias a adaptarse, por un lado, a nuevas técnicas de producción y, por otro, a las demandas del mercado. De esta forma, aparecen procesos emergentes que utilizan tratamientos no térmicos y que, por tanto, no dañan los componentes termosensibles de los alimentos. Durante el procesamiento no térmico la temperatura del alimento se mantiene por debajo de la temperatura que se utiliza normalmente en el procesado térmico y por lo tanto, las vitaminas y nutrientes no experimentan cambios severos, maximizando la retención de las cualidades del alimento. En realidad, los nuevos métodos no térmicos de conservación de alimentos son objeto de una intensa investigación con el fin de evaluar su potencial como proceso alternativo o complementario a los métodos más tradicionales de conservación de alimentos. Entre las tecnologías emergentes que están siendo investigadas para el procesamiento de jugos, se encuentran: altas presiones (Deliza y col.,

2005), ultrasonido (Ferrante, 2007), pulsos eléctricos (Toepfl y col., 2007), pulsos de luz (Gómez y col., 2011), luz ultravioleta (Schenk y col., 2008), uso de sanitizantes (Beltrán y col., 2005), uso de antimicrobianos naturales (Char y col., 2009), etc. El avance en el conocimiento sobre dichas tecnologías ha sido impresionante en los últimos años, pero muchas de ellas se encuentran todavía en estudio y su adopción industrial es en muchos casos incierta, ya que se requiere de mayores investigaciones de naturaleza básica y tecnológica (Rajkovic y col., 2010). Un informe de la FDA (2000) realizó una evaluación crítica de la información científica disponible acerca de las tecnologías emergentes. Se analizaron los factores críticos de los procesos y se describieron los aspectos más relevantes a investigar para cada tecnología entre los que se destacaron la ausencia de protocolos experimentales estandarizados para obtener datos cinéticos confiables y el desconocimiento sobre los modos de acción de las distintas tecnologías y sobre la sinergia, aditividad o antagonismo de la combinación de procesos alternativos entre sí o con otros factores tradicionales antimicrobianos. El Comité Asesor Nacional sobre Criterios Microbiológicos para Alimentos de los Estados Unidos (NACMCF, 2004), estableció además, una serie de requisitos para generar equivalencias de varios métodos alternativos con la pasteurización. En el mismo, se discuten para cada tecnología emergente: los criterios científicos necesarios para establecer las equivalencias; la investigación futura necesaria; los microorganismos de importancia pública más reconocidos; qué datos deben ser adquiridos y que modelos deben ser utilizados para una correcta validación y que peligros biológicos involucraría su utilización.

Según la bibliografía, tecnologías emergentes como campos eléctricos pulsados (PEF), altas presiones hidrostáticas (HHP), luz ultavioleta de onda corta (UV-C), luz pulsada (LP) y ultrasonido (US) son las más implementadas para el procesamiento de jugos frutales. A continuación se describen brevemente las mismas. Las tecnologías emergentes presentan distinto grado de desarrollo. En particular, existen actualmente numerosas aplicaciones comerciales para la producción de jugos frutales procesados por HPP (p.e., Suja®, Avomix®), mientras que a menor escala existen estudios de investigación sobre preservación de jugos por tecnología PEF a escala comercial (Sampedro y col., 2013). Las aplicaciones industriales del US

involucran desgasificación de líquidos, extracción, reacciones de sonocatálsis, lavado de productos agrícolas (Hielscher Ultrasound Technology®). En el caso de LP, los estudios de investigación están actualmente enfocados en el estudio del procesamiento de jugos a escala laboratorio en sistema continuo (Muñoz y col., 2011, 2012a y 2012b).

1.9.2.1 Campos eléctricos pulsados

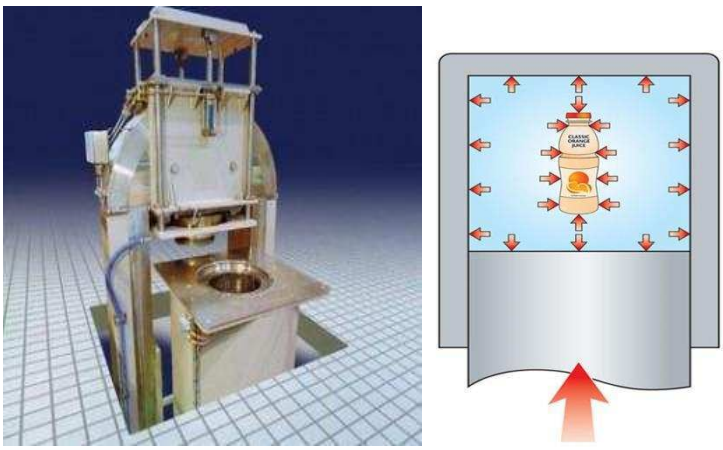
La tecnología PEF involucra la aplicación de campos eléctricos pulsados (10-50 kV cm^{-1}) de corta duración (1-100 µs). Esta tecnología se aplica a temperatura ambiente o apenas por encima, con un mínimo de calentamiento del producto. El principio del tratamiento de PEF se basa en la electroporación que involucra la formación de poros en la membrana celular como consecuencia de la aplicación de una corriente eléctrica en el alimento a procesar (Aguiló-Aguayó y col., 2012). La tecnología PEF provee el potencial de asegurar inocuidad y mantener las características físico-químicas de los jugos frutales. Este proceso logra una reducción de 5 ciclos logarítmicos de la mayoría de las bacterias patogénicas, sin embargo tiene efecto limitado en la inactivación de esporas (López-Gómez y col., 2009). Asimismo, varios autores reportaron que la tecnología PEF tiene la habilidad de mantener las características de jugo fresco y natural. Por ejemplo, el jugo de naranja procesado por PEF exhibió menor pardeamiento y retuvo mejor el color que los jugos tratados térmicamente y que presentaron mínimas alteraciones en el pH y el contenido de sólidos solubles (Aguiló-Aguayo y col., 2012).

1.9.2.2 Altas presiones hidrostáticas

El tratamiento por HHP es un método de pasteurización fría que involucra la aplicación de presiones en el rango de 100 a 1000 MPa. Tiene la capacidad de inactivar células vegetativas por ruptura de enlaces no covalentes y la consecuente ruptura de membranas celulares (López-Gómez y col., 2009). El alimento a ser procesado por esta técnica se coloca en un recipiente capaz de soportar las altas presiones, y es sumergido en agua, la cual actúa como

medio de transmisión de la presión. La **Figura 1.3** muestra un dispositivo de procesamiento de alimentos por altas presiones.

Figura 1.3 Equipo para procesamiento de alimentos por altas presiones



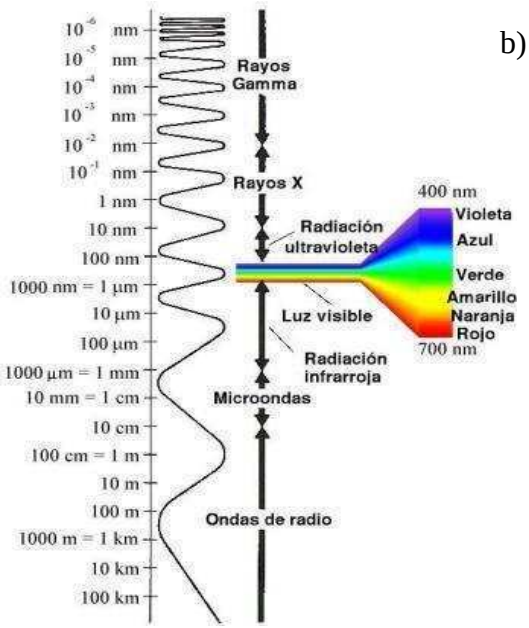
Los jugos son procesados en un sistema semi-continuo que tiene la capacidad de procesar 600 L/h y que operan a una presión máxima de 400 MPa. La inactivación microbiana por HPP se debe a modificaciones en la permeabilidad y en el intercambio de iones de la membrana celular, cambios en la forma celular, desnaturalización de proteínas y enzimas y disrupción de ribosomas. Existen actualmente jugos comerciales procesados por HHP que se producen en Japón, Francia Portugal, Reino Unido y Estados Unidos (Hogan y col., 2005).

1.9.2.3 Luz UV-C

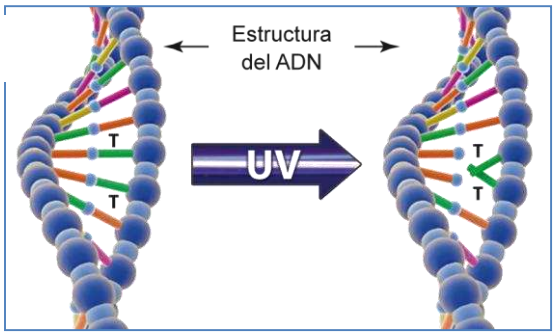
La radiación UV ocupa una banda ancha de longitudes de onda de la región no ionizante del espectro electromagnético, y se divide en varias regiones (**Figura 1.4a**). Dentro de la región UV, la longitud de onda corta (UV-C) es la que causa el mayor daño e involucra alteraciones de las moléculas de ADN a través principalmente de la formación de dímeros de pirimidinas (timina y citosina) que se encuentran adyacentes, impidiéndose el apareamiento normal de bases e imposibilitando la reproducción (**Figura 1.4b,** Shama, 1999). El daño causado en el ADN es proporcional a la cantidad de radiación UV a la que ha sido expuesto.

Figura 1.4. a) Espectro electromagnético. b) daño ocasionado por la luz UV-C en el ADN

a)



b)



Las lámparas de UV-C de uso industrial emiten en la región germicida de 254 nm que es la banda resonante de mercurio. La luz UV-C se comenzó a utilizar para la desafección de superficies, pero con los años comenzó a aplicarse como tecnología de preservación de alimentos, dado que es un proceso con numerosas ventajas:

- No aumenta significativamente la temperatura ni la humedad del alimento
- No se requieren químicos consumibles
- Tiene bajo consumo de energía
- No favorece la formación de sustancias extrañas
- No deja residuos químicos ni radioactividad residual
- No tiene restricciones legales
- Tiene bajos costo de inversión, funcionamiento y mantenimiento
- Es eficiente para bacterias, hongos y levaduras.

La FDA y el Departamento de Agricultura de EEUU (USDA) han concluido que la utilización de la luz UV-C es segura; y en el año 2000, la

FDA aprobó esta metodología como una alternativa a la pasteurización térmica de jugos frescos (US FDA, 2000).

1.9.2.4 Pulsos de luz de alta intensidad

1.9.2.4.1 Definición

La radiación con luz pulsada (LP) es una técnica de descontaminación superficial que utiliza pulsos de corta duración en un amplio rango de longitudes de onda, rico en luz UV-C. La energía es magnificada al almacenar la electricidad en un capacitor durante fracciones de segundo, y liberándola en tiempos cortos (millones o centenares de fracción de segundos) como pulsos de luz de alta intensidad. El espectro de emisión abarca longitudes de onda de la región ultravioleta (UV) al infrarrojo cercano (IR) (100-1100 nm) (**Figura 1.4a y 1.5a**) (Gómez-López y col., 2007).

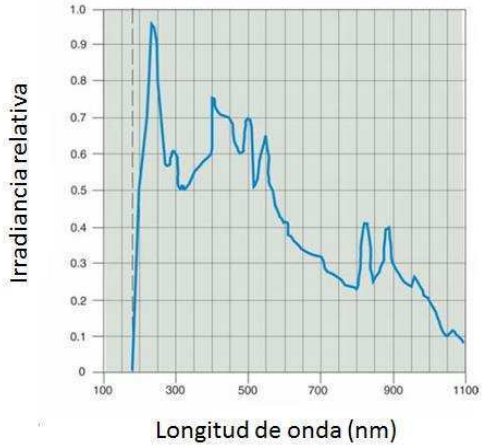
Las lámparas de LP contienen gas Xenón (**Figura 1.5b**) y se encuentran conectadas generalmente a un módulo controlador mediante un cable de alta tensión.

Cuando se aplica el disparo del voltaje, el gas xenón que contiene la lámpara se ioniza. Si el voltaje es lo suficientemente alto, el gas xenón actúa como conductor y la descarga que se produce genera la emisión de un pulso de luz en la región UV-visible.

Para disipar el calor generado en la lámpara como así también para evitar la acumulación de altos niveles de ozono producidos por las longitudes de onda más cortas, las lámparas se encuentran conectadas a un soplador, el cual genera un flujo de corriente de aire filtrado que pasa continuamente por dentro de la caja que contiene la lámpara (Manual Xenon Corp., 2007). En la **Figura 1.6** se muestra el flujo de la generación de pulsos de alta intensidad en un dispositivo de LP (Palmieri y Cacace, 2005).

Figura 1.5. a) Espectro de emisión de luz producido por un equipo de LP (Fuente: Manual instructivo Xenon Corp., 2007.). b) Lámpara de gas xenón utilizada por el equipo de LP (Fuente: Claranor, Pulsed Light Sterilization)

a)

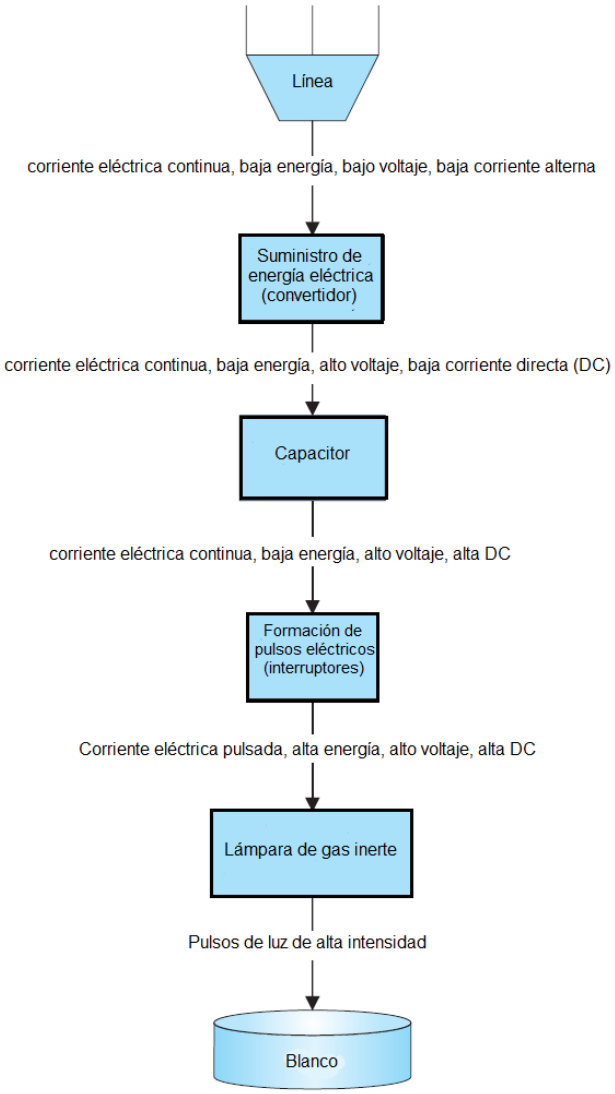


b)

1.9.2.4.1 Efecto de la LP sobre los microorganismos

La inactivación por LP puede atribuirse a diferentes mecanismos como el fotoquímico, fototérmico y/o fotofísico. El efecto germicida de la luz UV (efecto fotoquímico) se debe principalmente a la formación de dímeros de pirimidina, especialmente de timina. Dicha dimerización inhibe la formación de nuevas cadenas de ADN durante el proceso de replicación, lo que conlleva a la inactivación celular (Gómez-López y col., 2007). Por otra parte, el efecto fototérmico se refiere al daño ocasionado por un incremento en la temperatura local de los microorganismos durante tratamientos prolongados de LP.

Figura 1.6. Circuito de un sistema de LP



Este sobrecalentamiento momentáneo se produciría por una diferencia en la absorción de luz UV entre el microorganismo y el medio circundante, lo cual provocaría un flujo de vapor que dañaría la membrana plasmática y provocando la inactivación. Por último el efecto fotofísico, implica daños estructurales como daño en la pared celular, encogimiento de membrana, elución del contenido intracelular, vacuolas expandidas, entre otros, provocados por la constante perturbación de los pulsos de alta intensidad (Krishnamurthy y col., 2010). Todos estos mecanismos probablemente coexistan entre sí, y la relevancia de cada uno dependerá de la fluencia y del microorganismo (Gómez-López y col., 2007).

1.9.2.4.2 Equipos de LP disponibles en el mercado

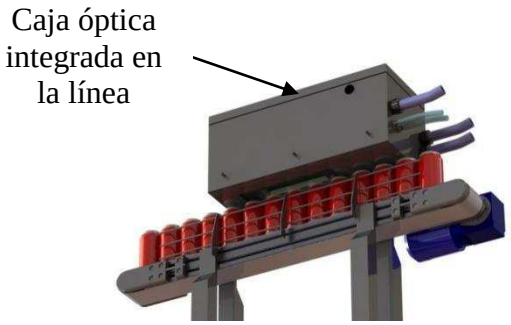
En la **Figura 1.7** se ilustra un equipo de esterilización por LP estanco, el cual consta de un módulo controlador, que aporta la fuente energía para la lámpara así como el control de la operación del proceso de esterilización; y de la cámara de esterilización, donde se encuentra la lámpara de xenón confinada a la unidad de la lámpara, y es el sitio donde se coloca la muestra a tratar.

Por otra parte, también existen en el mercado equipos de LP de procesamiento industrial para esterilización de tapones, envases, cuellos de preforma y botellas (Claranor®). El equipo se compone de una caja óptica de 44 cm de alto y de un gabinete electrónico situado a menos de 7 m de la línea (**Figura 1.8**). El mismo se sincroniza con la línea para velocidades de hasta 90.000 botellas por hora (en función del tamaño del tapón). Actualmente existen más de 100 instalaciones en funcionamiento en todo el mundo para la esterilización de tapones, botes y cuellos de preformas en líneas de envasado ultralimpio y envases de larga vida útil (Claranor®).

Figura 1.7. Equipo estanco de esterilización por LP (Xenon Corporation®)

Figura 1.8. Equipo de esterilización comercial por LP Claranor® a) caja óptica, b) bastidor electrónico

a



b

1.9.2.4.3 Marco regulatorio

La FDA ha aprobado la utilización de la LP como método de procesamiento de alimentos siempre y cuando se cumplan ciertos requisitos (FDA, 2014):

- La fuente de radiación debe consistir de lámparas de xenón diseñadas para emitir radiación en el rango de 200-1100 nm, y operar de tal modo que la duración del pulso no dure más de 2 milisegundos.
- El tratamiento deberá ser empleado para descontaminación superficial.
- Los alimentos tratados por LP deben recibir el mínimo tratamiento posible para alcanzar el efecto deseado.

Según la FDA, (1996) el tratamiento total no debe superar los 12,0 J/cm^2. Sin embargo, para la Unión Europea (UE), el tratamiento por LP cae en la regulación 258/97 correspondiente a nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios (Union, 1997); por lo cual la UE no aprueba la tecnología de LP en sí misma, sino a los alimentos e ingredientes específicos tratados mediante esta tecnología. Es por ello, que es necesario mejorar la legislación respecto a la utilización de la LP en la industria alimentaria.

1.9.2.4.4 Susceptibilidad de los microorganismos

Anderson y col. (2000) y Rowan y col. (1999) reportaron que la susceptibilidad de los microorganismos a la LP decrece en el siguiente orden: bacterias Gram-negativas, bacterias Gram-positivas y esporas fúngicas. En contraste, Gómez-López y col. (2005) no observaron un patrón de sensibilidad a LP al estudiar una extensa colección de bacterias, levaduras y hongos.

1.9.2.4.5 Ventajas y limitaciones

Ha crecido el interés de aplicar LP como tecnología de preservación de alimentos, por ser un proceso que cuenta con importantes ventajas. Entre ellas, puede mencionarse el bajo tiempo de procesamiento comparado con la aplicación de luz UV continua (UV-C). Otra de las ventajas, en relación a la radiación UV-C, radica en que se ha registrado mayor grado de destrucción a nivel celular luego de la aplicación de LP. Cheigh y col. (2012) observaron mediante TEM que una suspensión de *L. monocytogenes* en buffer fosfato, tratadas con UV-C estanco (2,1 W/m^2; 12 cm de distancia de la lámpara) presentó forma celular muy similar a las muestras control, a excepción de que la pared celular se observó un poco más borrosa. En cambio, las muestras tratadas con LP (376 W/m^2, 12 cm de distancia de la lámpara) revelaron destrucción de las estructuras celulares, como la pared celular, la membrana plasmática y ruptura de la organización interna. Por otra parte, el tratamiento por LP no deja compuestos residuales y no requiere de la aplicación de químicos que causen daños ecológicos o que sean dañinos para los humanos (Gómez-López y col., 2007).

Una de las principales desventajas que presenta la LP es el calentamiento de las muestras a dosis de exposición elevadas. Otra de las limitaciones de esta tecnología es su falta de penetración en muestras opacas y la atenuación de luz por los microorganismos a altos niveles de contaminación, lo que hace que los microorganismos de capas superiores absorban una gran proporción de los rayos, haciendo que sea muy difícil

inactivar a los que se encuentran en las capas inferiores (efecto “sombra”) (Gómez-López y col., 2007)

Tal como se describió en la **sección 1.9.2.3**, la aplicación de luz UV-C continuo tiene la ventaja respecto a la LP, que no afecta significativamente la temperatura del alimento, ni su contenido de humedad, y por lo tanto no causa daño térmico al producto, tiene bajo consumo de energía, tiene bajo costo de inversión y mantenimiento y no genera residuos tóxicos. Sin embargo, LP tiene como ventaja frente a la luz UV-C, la corta duración del pulso y las dosis más altas que brinda el sistema. Por ejemplo, Rice y Ewell (2001) para aplicar una dosis de 4 J/cm^2, requirieron de 3 h de aplicación de luz UV-C, y sólo 40 s de LP. Como desventaja adicional al calentamiento del sistema tratado por LP respecto al UV-C, puede mencionarse la generación de ozono que debe evacuarse para evitar daños en los operarios.

1.9.2.4.6 Factores que determinan la eficiencia del procesamiento por LP

El factor más importante que determina el efecto de la LP es la dosis incidente en la muestra. Debe destacarse que la energía emitida por la lámpara es diferente de la energía incidente en la muestra ya que depende de la distancia a la cual está el blanco y el medio de propagación de la luz (agua, aire, jugo). Cuanto más cerca esté la muestra de la fuente de luz, mayor es la efectividad del tratamiento. El grosor de la muestra también es un factor limitante para la inactivación microbiana, debido a la poca penetrabilidad de la luz UV. Por otro lado, el nivel de contaminación también afecta la eficiencia del tratamiento debido a la atenuación de la luz por parte de los microorganismos de las capas superiores (efecto “sombra”). Respecto a alimentos fluidos y suspensiones microbianas, el líquido absorberá luz dependiendo de su coeficiente de absortividad y la profundidad. En este caso, se deberá promover en flujo del fluido de manera tal de ubicar al alimento lo más próximos a la fuente de luz y alcanzar de esta manera, una exposición lo más uniforme posible.

1.9.2.4.7 Cuantificación

Cuando se quiere evaluar la intensidad de luz emitida por la lámpara generalmente se utiliza la irradiancia o tasa de fluencia. La irradiancia es definida como la potencia de radiación total incidente que llega de todas las direcciones a un elemento de superficie. Sus unidades son W/cm^2. El término "dosis de LP" es utilizado universalmente en la literatura y se obtiene multiplicando la irrandiancia o tasa de fluencia, si se mantienen constantes, por el tiempo de exposición a la radiación (Joule). Sin embargo, la dosis de LP, es un término que en otros contextos es usado para describir la energía total absorbida. En esta tesis, se empleará como se usa habitualmente, el término dosis de LP para referirse a la luz incidente sobre la muestra expresada en J/cm^2.

1.9.2.5 Ultrasonido de alta intensidad

1.9.2.5.1 Definición

El ultrasonido (US) se refiere a ondas de presión con una frecuencia de 20 kHz o más (**Figura 1.9**). Según el rango de frecuencia, las aplicaciones del US en el procesamiento de alimentos, análisis y control de calidad pueden dividirse en baja y alta energía. El US de baja intensidad involucra frecuencias mayores a 100 kHz e intensidades menores a 1 W/cm^2, y puede ser utilizado para detecciones no invasivas (procesos de control), caracterización físico-química de las propiedades de los materiales (Awad y col., 2012). Las aplicaciones del US de baja intensidad incluyen estimulación de células vivas, limpieza superficial de alimentos, cristalización, emulsificación, filtración, secado (Knorr y col., 2004). Por otro lado, el US de alta intensidad involucra intensidades mayores a 1 W/cm^2 y frecuencias comprendidas entre 20 y 100 kHz, y se ha utilizado para desgasificación de alimentos líquidos, inducción de reacciones de óxido-reducción, extracción de enzimas y proteínas, inactivación enzimática, inducción de la nucleación y cristalización (Knorr y col., 2004). En particular, el US de alta potencia tiene la habilidad de provocar la *cavitación*, efecto que tiene como aplicación la inactivación microbiana (Piyasena y col.,

2003). Cuando una onda de sonido penetra en un medio líquido genera ondas longitudinales, las cuales se propagan en el líquido generando alternativamente zonas de compresión y expansión. A altas intensidades, los ciclos de expansión pueden exceder las fuerzas de atracción de las moléculas del líquido permitiendo la formación de burbujas de cavitación. Dichas burbujas aumentan su tamaño durante los ciclos de expansión hasta un límite de absorción de energía, donde implosionan violentamente. La implosión genera un punto caliente (*hotspot*) donde las temperaturas alcanzan hasta 5000 K y presiones de 2000 atmósferas (Mason y col., 2005) (**Figura 1.10**). Esto último sería la causa de la acción germicida del US de alta intensidad.

Figura 1.9 Rango de frecuencias del sonido

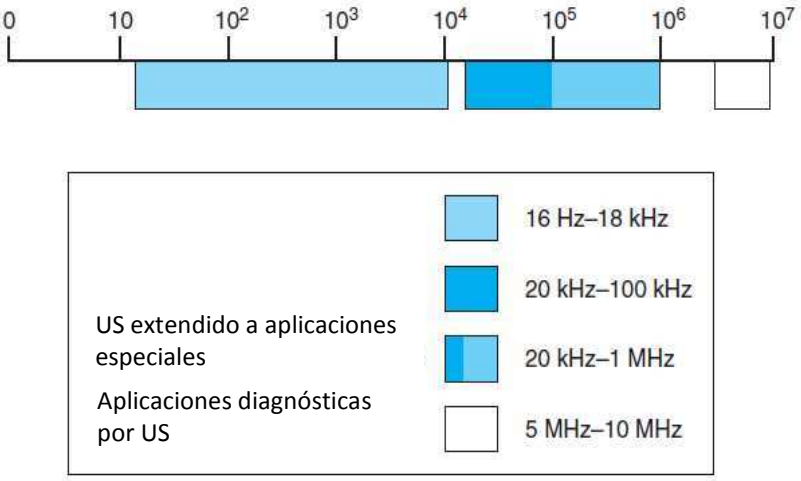
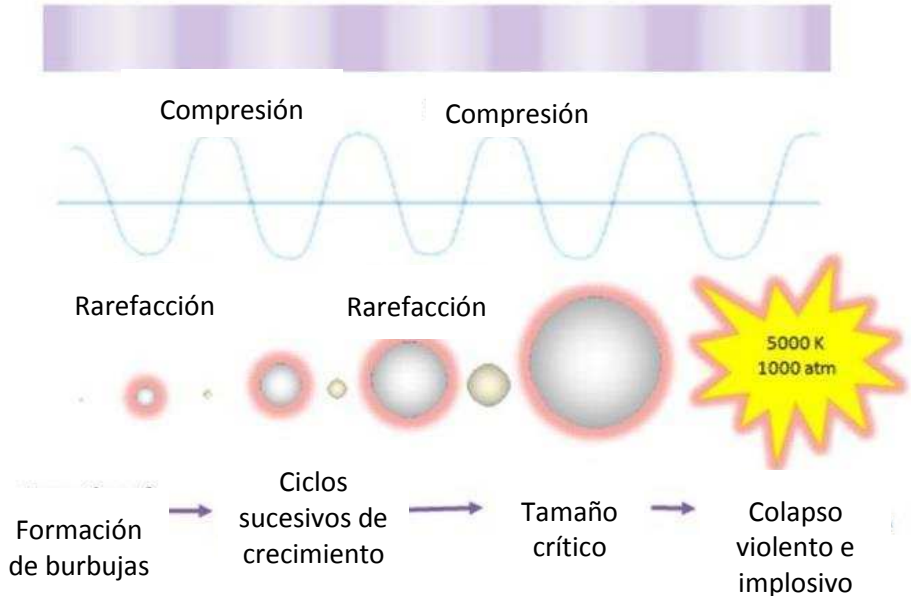


Figura 1.10 Generación de una burbuja de cavitación



1.9.2.5.2 Parámetros que afectan la efectividad del tratamiento por US

Diversos parámetros pueden influenciar la efectividad del US, es por ello que las condiciones de tratamiento deben ser elegidas cuidadosamente. Sin embargo, las variables más importantes son la frecuencia, la amplitud de las ondas de US, la presión hidrostática y la temperatura. A mayor amplitud, aumenta la tasa de inactivación, lo cual estaría asociado a un incremento en el número de burbujas sometidas al proceso de cavitación por unidad de tiempo, o a un incremento en el volumen de líquido en donde la cavitación puede ocurrir (Suslick, 1990). Respecto a la presión hidrostática, se observa un incremento en la tasa de inactivación hasta alcanzar determinado punto en que disminuye la letalidad con el aumento de la presión (Condón y col., 2005).

También se ha demostrado que la composición del medio influye en la resistencia microbiana, dado que ésta es mayor en alimentos respecto a medios de cultivo. El efecto del pH es controversial ya que algunos autores han reportado que este factor carece de influencia, mientras que otros sí (Condón y col., 2005).

1.9.2.5.3 Efecto sobre los microorganismos

El mecanismo de inactivación microbiana se debe al principio de cavitación, donde las burbujas implosionan generando altas temperaturas y presiones en el punto de colisión. Por otra parte, estas condiciones de alta temperatura y presión pueden producir la disociación del vapor de agua en radicales OH y átomos de H, que pueden generar daño oxidativo y promover la letalidad microbiana (Condón y col., 2005).

Las diferentes especies de microorganismos difieren en su resistencia al US. Las células Gram-positivas son más resistentes que las Gram-negativas. Además, los cocos resultan más resistentes que los bastones, los anaerobios más sensibles que los aerobios, y las esporas más resistentes que las células vegetativas (Mason y col., 2005). El mecanismo de inactivación es debido principalmente al adelgazamiento de la pared, calentamiento localizado y producción de radicales libres por la sonólisis del agua (Piyasena y col., 2003). Muchos parámetros influencian el efecto de la sonicación (concentración de sólidos, temperatura, intensidad de la implosión, viscosidad del medio, geometría de la cámara, etc). Estos parámetros parecen tener un valor óptimo para la cual la cavitación es máxima. Por ello, las condiciones de aplicación de US deben ser cuidadosamente controladas para tener un máximo efecto (Guerrero y col., 2001).

La aplicación individual del US no suele ser muy efectiva en la inactivación de microorganismos, dado que se requiere de muy largos tiempos de procesamiento, lo cual puede modificar las propiedades nutricionales y sensoriales de los alimentos. En particular, largos tiempos de sonicación producen desnaturalización de proteínas y los radicales libres que se generan modifican el sabor de los productos frutales y con alto contenido de grasas (Ross y col., 2003). Sin embargo, se ha visto que su combinación con otras tecnologías tradicionales o emergentes (antimicrobianos naturales o sintéticos, temperaturas moderadas, UV-C), aumentan la inactivación observada en una amplia variedad de microorganismos (Guerrero y col., 2001 y 2005; Ferrante y col., 2007; Char y col., 2010).

1.9.2.5.4 Equipos de US

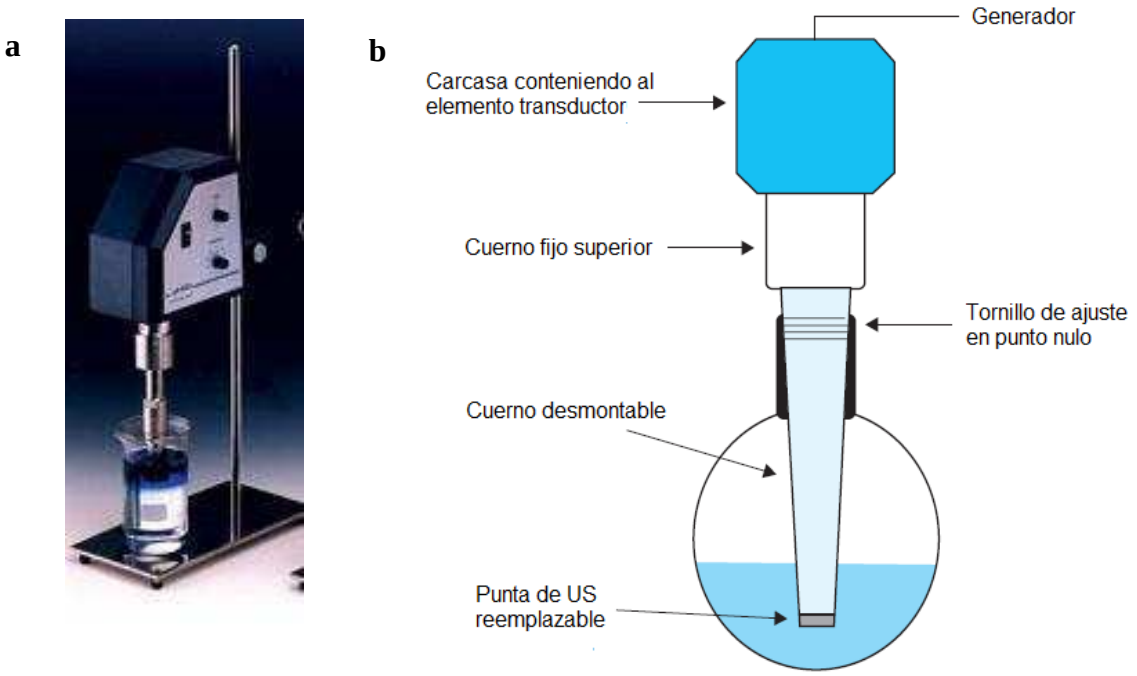
1.9.2.5.4.1 Escala laboratorio

En la **Figura 1.11a** se muestra un equipo de US a escala laboratorio para el tratamiento de muestras líquidas, el cual consta de un sistema de punta o sonda de titanio que introduce vibraciones directamente a la muestra (**Figura 1.11b**) (Mason y col., 2005).

1.9.2.5.4.2 Escala industrial

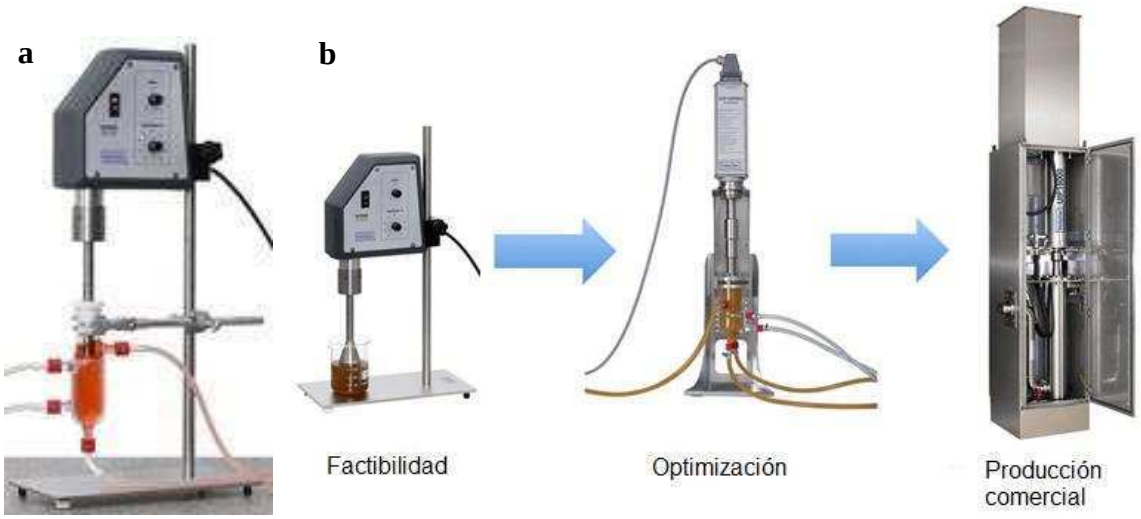
Un equipo de US industrial puede procesar aproximadamente de 10 a 50 litros por hora y pueden funcionar continuamente durante 24 horas a 7 días, si es necesario. El líquido es bombeado al reactor (vidrio o acero inoxidable). Allí se expone a una sonicación intensa definida antes de que llegue a la salida de la célula del reactor. Con el fin de enfriar el material sensible al calor durante la sonicación, las células de flujo son con camisa para mejorar la disipación de calor. En la **Figura 1.11a** se muestra un dispositivo ultrasónico de flujo continuo para el procesamiento de grandes volúmenes.

Figura 1.11. Sistema de sonda de US (a). Dispositivo ultrasónico a escala laboratorio (b)



Cuando se ha optimizado el proceso ultrasónico, los parámetros de proceso ideal pueden ser linealmente escalados a tamaño de la producción. La capacidad de proceso puede ser calculada precisamente sobre la base de los resultados obtenidos durante la optimización (**Figura 1.12b**).

Figura 1.12. Dispositivo de US de flujo continuo a escala industrial (a) (Hielscher®). Etapas de optimización para la producción comercial (b)



1.10 Tecnologías combinadas de preservación

Se estima que en los países en desarrollo, las pérdidas postcosecha exceden el 30 % debido a la falta de infraestructura o a una infraestructura inadecuada para el manipuleo, almacenamiento y elaboración eficiente de la producción agrícola, el alto costo de las tecnologías de procesamiento y la falta de información o de un apropiado conocimiento técnico de los procesos. Las tecnologías combinadas que no requieren el uso de equipo, materiales y procedimientos sofisticados y que son relativamente simples comparadas con las tecnologías tradicionales, son una alternativa interesante para la preservación de frutas y hortalizas (Alzamora y col., 2004).

El objetivo de las tecnologías de obstáculos es seleccionar y combinar factores de preservación o barreras de forma tal que la estabilidad y seguridad microbiológica puedan ser garantizadas, reteniendo las características

nutritivas y la aceptación sensorial (Leistner, 1992). Este método usa varias barreras que separadamente pueden no dar una adecuada preservación, pero que cuando se las combina pueden brindar la protección necesaria. Las barreras pueden incluir la disminución de la temperatura, pH o actividad de agua (por adición por ejemplo de NaCl o azúcares); el calentamiento mínimo; o la adición de antimicrobianos (Alzamora y col., 2015). Para que este concepto sea aplicado exitosamente, es necesario cuantificar la influencia de los distintos factores sobre el crecimiento microbiano.

La aplicación de este concepto ha sido muy exitosa en los últimos años, dentro del conjunto de tecnologías de preservación de mínimo procesamiento, y ello ha sido posible debido a los grandes avances ocurridos en el conocimiento del modo de acción de los distintos factores de preservación y de su interacción en los microorganismos (Alzamora y col., 2005b; Alzamora y col., 1995), 1993; Rojas y col., 1994).

La estabilidad u homeostasis del medio interno (composición y volumen de los fluidos) es vital para la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos. En los alimentos preservados por factores combinados, la homeostasis activa de los microorganismos vegetativos y la homeostasis refractaria pasiva de las esporas se interfieren en “un número de sitios” o de “manera cooperativa”, utilizando una combinación de factores de conservación, aplicando cada uno de ellos en forma no letal, disminuyendo la severidad de los tratamientos. Por ejemplo, en el caso de células vegetativas, se reduce la disponibilidad de energía (removiendo O_2, limitando nutrientes, reduciendo la temperatura) y/o se incrementa la demanda de energía (reduciendo a_w y pH, añadiendo compuestos activos a nivel de membrana). Para esporas, se trata de dañar estructuras claves ya sea por ataque químico, enzimático o físico sobre el córtex o provocar la germinación de las mismas (con “falsos disparadores”, por aplicación de altas presiones, etc.) (Gould, 1995).

El diseño inteligente de combinaciones de tecnologías pueden ser utilizadas para demostrar las interacciones intrínsecas entre los factores de preservación. Las interacciones antagónicas pueden ocurrir cuando dos o más factores de preservación interactúan a modo de disminuir los efectos combinados esperados de las observaciones de la efectividad individual de dichos factores. Las interacciones sinérgicas ocurren cuando la combinación

de factores de preservación producen una mayor acción inhibitoria que lo esperado por la acción individual de los factores. Los efectos aditivos e indiferentes están comprendidos entre las tendencias antagónicas y sinérgicas. El primer concepto se refiere a la inactivación obtenida cuando la combinación de las barreras resulta en la adición de las barreras aplicadas de manera separada; mientras que el segundo concepto se refiere a que el efecto combinado no excede o es igual al mayor efecto individual. La selección racional de barreras a aplicar en cuanto al tipo e intensidad, debiera resultar en una interacción sinérgica más que aditiva (Guerrero y col., 2015). Esto implica que se obtiene un método de preservación más efectivo a partir de la aplicación de factores de estrés de pequeña intensidad dirigidos a distintos sitios blanco (preservación multiobjetivo), en vez de la aplicación de factores de estrés de baja intensidad dirigidos al mismo sitio blanco. La selección de los factores de estrés a combinar no es sencilla. En cuanto al crecimiento microbiano diversos autores han concluido que los efectos de las combinaciones inhibitorias son en general aditivos y no sinérgicos, excepto cuando un factor modifica un "blanco" microbiano para hacerlo más accesible al segundo factor, o bien cuando se está en la región de la interface "crecimiento-no crecimiento" (McMeekin et al., 2010). En cuanto a la inactivación microbiana, no están todavía determinadas las bases que soportan la aditividad o la sinergia. Sin embargo, en cualquiera de los dos casos, las características de aditividad o sinergia pueden depender del patógeno que se esté considerando.

Como se comentó anteriormente, este concepto de *factores de stress en combinación* no sólo se aplica a la estabilidad microbiológica, sino que se hace extensivo a la calidad total. También desde el punto de vista microbiológico, el concepto se ha tornado más abarcativo y se refiere no sólo a la interferencia de la homeostasis por barreras sinérgicas o aditivas sobre un mismo microorganismo, sino a la aplicación selectiva de factores de conservación que puedan ser efectivos contra un organismo específico o un grupo de microorganismos solamente. Es así, que en los últimos años, un gran número de publicaciones en la literatura internacional se refiere a la utilización de este concepto con distintas finalidades: optimizar tecnologías tradicionales; desarrollar nuevos productos y como medida de seguridad o "back-up" para asegurar la calidad microbiológica de alimentos mínimamente procesados.

En general, muchas de las tecnologías emergentes, aplicadas a niveles tales que no impacten significativamente en la calidad del alimento, son procesos que no alcanzan el equivalente de pasteurización y sólo pueden pensarse en el marco de sistemas combinados o multifactoriales de conservación para lograr mayor reducción en la población microbiana y/o la inhibición del crecimiento de la flora resistente a alguno(s) de los factor(es) de inactivación (Guerrero y col., 2015). Pero poco se sabe del mecanismo de acción cuando éstos se utilizan en forma combinada; ni tampoco sobre la cinética de inhibición/inactivación microbiana o el efecto de la intensidad de los factores cuando se están considerando las nuevas técnicas alternativas. La combinación de tecnologías emergentes está tomando relevancia en productos derivados de frutas como los jugos debido al bajo pH que caracteriza a este tipo de alimentos, lo cual constituye un obstáculo adicional que coopera en la estrategia de preservación global (Alzamora y col., 2014).

La adopción de altos estándares en el control de calidad, buenas prácticas de manufactura y el sistema HACCP son esenciales para asegurar la calidad microbiológica del producto. Más aún, debido a los reducidos márgenes de seguridad, los distintos organismos de contralor internacionales han recomendado el uso de "obstáculos" adicionales en el diseño de los sistemas de preservación tal que procesos, distribución y almacenamiento no adecuados puedan todavía garantizar productos microbiológicamente seguros. Así, el uso de factores combinados juega un importante rol en la seguridad microbiológica de aquellos productos donde los puntos críticos de control sean imposibles o difíciles de controlar.

1.11 Algunas herramientas de estudio que contribuyen a la determinación de la inocuidad de productos preservados

Luego de la aplicación de algún agente de estrés para reducir la contaminación microbiana, una parte de la población puede sobrevivir sin presentar daño alguno, otra puede morir y otra puede estar subletalmente dañada (Wu y col., 2008). Esta subpoblación recibe el nombre de células viables no cultivables (VBNC), han sobrevivido a algún estrés pero le ocurren

algunos cambios como a nivel de la pared celular y de la membrana plasmática, ribosomas, ADN, ARN y enzimas; siendo la membrana el componente celular más comúnmente afectado. Son metabólicamente activas en cuanto a la respiración y fermentación, incorporan sustancias radioactivas, sintetizan proteínas e incluso pueden ser más virulentas que las células crecidas en medio de cultivo; pero no pueden ser cultivadas en medios convencionales de laboratorio (Rowan y col., 2015). Los microorganismos que presentan daño subletal son igualmente importantes que los que no presentan daño, dado que en condiciones favorables pueden resucitar y volver a tener un funcionamiento normal. Se ha reportado que muchas de las tecnologías emergentes inducen la existencia de VBNC (Ananta y col., 2005; Pataro y col. 2011; Rowan y col., 2015). Por lo tanto las condiciones de procesamiento a aplicarse (dosis aplicada, matriz, nivel de contaminación inicial, espesor de la muestra, color, opacidad, condiciones de flujo, presencia de material particulado) deben optimizarse de modo de obtener la mayor efectividad (Pataro y col., 2011).

Hoy en día existen diversos métodos matemáticos e instrumentales para ayudar a interpretar el comportamiento y los cambios estructurales que sufren los microorganismos frente a un dado factor de estrés.

En esta tesis se utlizó como herramientas la microbiología predictiva, la citometría de flujo y la microscopía electrónica de transmisión, las cuales se describen brevemente a continuación.

1.11.1 Microbiología predictiva

Para obtener juicios confiables sobre la calidad del alimento, su vida útil y su seguridad, es necesario disponer de datos cuantitativos sobre los efectos de los factores que afectan el crecimiento, la supervivencia o inactivación de los microorganismos patógenos y/o deteriorativos pertinentes. Para describir las interacciones entre varios factores de preservación cuando actúan en combinación, una buena opción es recurrir a los modelos matemáticos (Alzamora y col., 2005a).

Los beneficios de modelar la conducta microbiana en los sistemas de Evaluación de Riesgos, HACCP e inocuidad de alimentos incluyen la predicción de la vida útil, la evaluación de los aspectos higiénicos en el procesamiento y la distribución y el establecimiento de los efectos de cualquier desviación en el proceso normal de manufactura. Algunas áreas de aplicación se detallan a continuación (Alzamora y col., 2005a).

→ *Predicción de la inocuidad microbiológica:* Permiten estimar el riesgo de crecimiento o supervivencia de un patógeno después de un período de almacenamiento normal o en condiciones de abuso. Ayudan a establecer fechas de vencimiento del producto.

→ *Control de calidad:* Colaboran en la implementación del sistema HACCP, mostrando las condiciones ambientales que permiten el crecimiento o supervivencia y el rango aceptable de las mismas, sugiriendo además valores límites críticos (especialmente útil en aquellos alimentos donde la combinación de varios factores es la responsable de la estabilidad). Permiten evaluar las consecuencias cuando un punto crítico sale fuera de control. Permiten evaluar nuevos peligros.

→ *Desarrollo de productos:* Permiten evaluar las consecuencias microbiológicas de cambios en la composición de los productos y procesos y comparar formulaciones nuevas y preexistentes.

→ *Educación***:** Ayudan a explicar la conducta microbiana tanto a personal no técnico como a estudiantes universitarios, mostrando el efecto de los distintos factores ambientales de estrés y/o la importancia del control de los puntos críticos del proceso.

→ *Análisis de datos y tareas de laboratorio***:** Permiten planear tiempos de muestreo de productos y la necesidad o no de la realización de ensayos extensivos de laboratorio en distintas etapas de la cadena, procesos, número de replicados, etc., ahorrando esfuerzos y dinero.

→ *Evaluación de riesgos***:** Permiten evaluar la probabilidad de que un alimento cause enfermedad. A partir de la distribución de frecuencias de la concentración inicial de un microorganismo patógeno, los cambios que sufre ésta en el proceso y almacenamiento y la cantidad de alimento que es

consumido, se obtiene una estimación del número total de patógenos ingerido. Unido esto a consideraciones de dosis infecciosas, puede obtenerse la probabilidad de ocurrencia de infección y enfermedad.

Además de caracterizar las curvas de inactivación, los modelos más modernos permiten la visualización de distribuciones poblacionales de la inactivación microbiana. Los modelos más antiguos consideraban que cada célula de la población tenía el mismo grado de resistencia térmica y la inactivación se debía a la alteración de un sólo sitio crítico. O sea, existe homogeneidad en la respuesta al estrés y el logaritmo de la población celular decrece linealmente con el tiempo de tratamiento cuando la intensidad del tratamiento es constante. Por el contrario, los modelos más modernos consideran que existen variaciones fenotípicas en el grado de resistencia de las células individuales de una población, y esta heterogeneidad es la responsable de curvas de supervivencia no lineales. Para tener en cuenta esta no linealidad se utilizan distribuciones para modelar la supervivencia como la distribución logística, gamma, de Weibull, etc. (Coroller y col., 2006).

1.11.1.1 Clasificación de los modelos matemáticos

Se han propuesto varios esquemas para categorizar los modelos, uno de ellos propone dividirlos en modelos de crecimiento y modelos de inactivación /supervivencia. Dentro de cada categoría se subdividen en modelos primarios, secundarios y terciarios (Alzamora y col., 2005a).

Los modelos primarios describen cambios en la respuesta microbiana con el tiempo en un ambiente específico. El modelo puede cuantificar unidades formadoras de colonia por mililitro o por gramo, formación de toxinas, niveles de sustrato o productos metabólicos (que son medidas directas del crecimiento); absorbancia e impedancia (medidas indirectas de la respuesta). Una vez generada la curva de crecimiento o muerte microbiana, se utiliza una función o ecuación matemática para describir el cambio de la respuesta en función del tiempo. Ejemplos de modelos primarios son: el modelo log-lineal, que asume que todas las células de la población presentan igual sensibilidad,

con lo cual estas curvas de superviviencia resultan lineales. Otros modelos, tienen en cuenta la suposición de la existencia de subpoblaciones con diferente resistencia dentro de una misma población y permiten ajustar curvas de inactivación no lineales. Ejemplo de ello son los modelos de Cerf y de Coroller, el primero ajusta para curvas bifásicas con comportamiento log-lineal y el segundo es más versátil porque tiene en cuenta diversas formas de curvas de superviviencia (Coroller y col., 2006; Rowan y col., 2015). También existen modelos que tienen en cuenta distribuciones de frecuencias como el modelo de Weibull, que es la forma cumulativa de la función de probabilidad de las resistencias microbianas individuales a un tratamiento (Geeraerd y col., 2005).

Los modelos secundarios describen las respuestas de los parámetros de los modelos primarios frente a cambios en uno o más factores ambientales como temperatura, pH o a_w. Ejemplos de modelos secundarios son el modelo de Arrhenius y el modelo de la raíz cuadrada (modelo de Bělehrádek), que describen la dependencia con la temperatura, y el modelo polinómico.

Los modelos terciarios son rutinas de software para computadora que convierten a los modelos primarios y secundarios en programas amigables. Estos programas pueden calcular las respuestas microbianas frente a condiciones que no fueron evaluadas inicialmente, comparar el efecto de diferentes condiciones o contrastar el comportamiento de varios microorganismos, por lo que permiten elegir al microorganismo blanco de ataque en situaciones específicas de formulación-procesamiento de alimentos. Ejemplos de modelos terciarios son el “USDA Pathogen Modeling Program” realizado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, disponible gratuitamente en Internet (http://www.arserrc.gov) y el “Food Micromodel” avalado por el Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación del Reino Unido.

Las tendencias en microbiología predictiva hasta la fecha han seguido dos caminos: los modelos cinéticos, en donde se modelan y predicen importantes parámetros cinéticos del crecimiento o inactivación microbiano, tales como la fase lag, la velocidad y el alcance (límite) del crecimiento o inactivación; y los modelos probabilísticos, en donde los modelos se construyen para predecir la “probabilidad” de que un evento ocurra, pero no proporciona

información sobre la velocidad a la que se produce, como por ejemplo: la germinación de las esporas bacterianas o la producción y concentración de toxina bacteriana después de un período de incubación a tiempo fijo (McMeekin y col., 2002).

1.11.1.2 Validación de los modelos matemáticos

Los modelos generales para crecimiento o inactivación derivan típicamente de pruebas realizadas en medios de laboratorio con factores controlados. Luego de recolectar un apropiado número de datos experimentales y aplicar los modelos primarios y secundarios, es importante evaluar la exactitud de dichos modelos con nuevos datos y nuevas combinaciones de factores. Existen de manera complementaria una batería de tests y métodos gráficos que permiten validar de manera interna el modelo seleccionado que se encuentran detallados en el Apéndice. Esto provee una estimación de la bondad de ajuste e indica si es que se necesitan y dónde datos adicionales (Alzamora y col., 2005a).

El segundo paso en la validación es comparar las predicciones con el comportamiento real de los microorganismos en los alimentos. Esto muestra las limitaciones del modelo y cuando un alimento en particular no es descripto con exactitud, sugiere qué factores adicionales necesitan ser incluidos en el modelo para incrementar su aplicabilidad.

La mayoría de los modelos desarrollados hasta el momento, se han basado en datos determinados en medios de laboratorio. Por lo tanto no toman en cuenta dos aspectos fundamentales:

a) el papel de la matriz alimentaria, que puede tanto aportar factores inhibitorios adicionales, como interactuar con los factores de estrés aplicados, disminuyendo su disponibilidad para actuar como antimicrobiano;

b) el papel de la flora competitiva.

Los modelos no se pueden usar con confianza para hacer predicciones en alimentos hasta concluir con la validación.

1.11.1.3 Limitaciones

- *Limitaciones estadísticas*: Con condiciones marginales de crecimiento, la variación entre los replicados aumenta. Se utilizan transformaciones matemáticas para homogeneizar las variaciones en los modelos. La transformación logarítmica de los parámetros en función del tiempo frecuentemente genera valores que se encuentran más cercanos a una distribución normal que si no se aplicara dicha transformación (Whiting, 1995).

- *Limitaciones biológicas*: Es importante especificar claramente los límites del modelo, es decir, para qué microorganismos puede aplicarse, qué factores, los rangos de cada factor y qué combinaciones de factores dan respuestas válidas. La presencia de factores inhibitorios adicionales en el alimento, que no fueron tenidos en cuenta en la construcción del modelo, lo invalidan debiendo ser muy cuidadoso en la interpretación de sus predicciones. La mayoría de los modelos predictivos no incluyen factores como el efecto del anión del acidulante o del antimicrobiano, o el efecto de otros humectantes diferentes al cloruro de sodio en la reducción del a_w, o la presencia de la flora competitiva cuando se aplica un modelo producido en medios de laboratorio al alimento real.

1.11.1.4 Aplicaciones

Los modelos que caracterizan la conducta microbiana son una herramienta muy valiosa para predecir el crecimiento o supervivencia de los microorganismos y en el planeamiento de la implementación de los programas de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP). Estos modelos han evolucionado rápidamente desde ser utilizados en los laboratorios de investigación básica a ser implementados por la industria y las agencias regulatorias. Los modelos son el medio para obtener rápidamente una estimación del comportamiento del microorganismo y son las guías para evaluar problemas potenciales. Sin embargo, los modelos no reemplazan

completamente el testeo microbiológico y el juicio del microbiólogo experimentado (McMeekin, 2010).

Los modelos predictivos proveen información muy útil para la toma de decisiones en las siguientes situaciones:

- *Predicción de seguridad y vida útil*: los modelos permiten estimar riesgos potenciales de crecimiento de patógenos en los alimentos luego de un período de almacenamiento normal o en condiciones de abuso. Ayudan a establecer "fechas de vencimiento" a través de la estimación del crecimiento de microorganismos patógenos y deteriorativos.

- *Control de calidad*: los modelos pueden ayudar en el desarrollo de programas HACCP, mostrando qué condiciones permiten el crecimiento y supervivencia y de este modo, identificar los puntos críticos de control. Estimaciones cuantitativas del crecimiento microbiano a diferentes niveles de los factores composicionales o ambientales pueden indicar los rangos permitidos de dichos factores. Contribuyen en hacer más objetivas y consistentes las decisiones de re-procesamiento, utilización rápida o reciclado de un alimento o ingrediente sin esperar los resultados experimentales (McMeekin, 2010).

- *Desarrollo de productos*: los cambios en la composición de los alimentos, o una nueva formulación pueden ser rápidamente evaluados. Los modelos muestran qué factores tienen mayor influencia sobre la población microbiana y pueden comparar las nuevas formulaciones con las viejas.

- *Planeamiento de laboratorio y análisis de datos*: permiten lograr mayor eficiencia, ahorrando tiempo, recursos y dinero; además permite que el laboratorio concentre sus esfuerzos en los pasos críticos.

Educación: a través de los modelos se puede mejorar didácticamente la capacitación del personal utilizando gráficos que pueden, por ejemplo, demostrar eficazmente la importancia de mantener las temperaturas adecuadas o los beneficios de utilizar materias primas con bajos recuentos iniciales sobre la seguridad y calidad de los productos.

Los modelos matemáticos sirven como una parte integral del análisis de riesgos microbiológicos por proveer los medios para desarrollar estimaciones realistas de exposición. En el análisis de riesgos, en definitiva, lo que se desea saber es cuáles son las chances de enfermarse luego de consumir un alimento específico. Encontrar la respuesta requiere una evaluación cuantitativa en tres áreas:

- Identificación de las fuentes de contaminación, cálculo de la frecuencia de ocurrencia y cuantificación de microorganismos patógenos en las materias primas.

- Comprensión de la fisiología, bioquímica y comportamiento de los patógenos. Conocer la rapidez con que crecerán o producirán toxinas y otros factores relacionados con la virulencia bajo las condiciones específicas del alimento cuando están presentes.

- Caracterización de la respuesta humana al patógeno, es decir, la dosis infecciosa de distintos grupos de personas.

Se deben integrar estos puntos en un modelo abarcativo, efectivo para fijar las prioridades relacionadas con la seguridad microbiológica de los alimentos objetivamente. Se debe realizar un análisis costo-beneficio para determinar las etapas que minimicen el riesgo.

El progreso en la microbiología de alimentos ha sido notable. El modelado es actualmente una técnica de investigación estándar y una herramienta poderosa en el diseño de alimentos y en el control de procesos. Sin embargo, todavía no se puede contar sólo con los modelos para determinar la seguridad de los alimentos y los sistemas de proceso. Los ensayos de laboratorio siguen siendo necesarios para determinar inequívocamente la factibilidad del crecimiento o supervivencia de patógenos en el producto.

1.11.2 Citometría de flujo

Se ha visto que la técnica de recuento en placa puede subestimar el número verdadero de bacterias viables que puede existir en un cultivo, especialmente cuando las células han sido dañadas por tratamientos físicos. Esta fracción podría permanecer viable y eventualmente crecer en alimentos procesados.

La citometría de flujo ha comenzado a ser una herramienta valiosa en microbiología de alimentos (Ueckert y col., 1995; Bunthof y col., 2001) y microbiología acuática y ambiental (Vives-Rego y col., 2000), que combina un ensayo rápido y directo para determinar el número de células, la distribución del tamaño celular y características bioquímicas y fisiológicas de las células individuales, revelando la heterogeneidad microbiana presente en una población.

La citometría de flujo es un método analítico, que consta de un equipo por el que se pasan células o partículas microscópicas en suspensión sometidas a una presión positiva, y conducidas a una cámara de flujo. De allí, por corrientes líquidas de diferentes velocidades se produce un flujo hidrodinámico que focaliza a las células en el centro de la cámara y las impulsa a pasar de a una por el haz de luz del equipo. Cuando el fotón incide en la partícula la excita y esta emite otro fotón de menor energía. Los cristales, espejos o filtros del equipo están ubicados de tal manera de conducir a los fotones emitidos de un mismo nivel de energía hacia el fotodetector correspondiente. Las señales luminosas (fotones) son convertidas en impulsos eléctricos, amplificadas, digitalizadas y almacenadas para su posterior análisis (Katsuragi y Tani, 2000).

La fuente de luz de los primeros instrumentos eran lámparas de arco de mercurio, actualmente el rayo laser de gas argón (488 nm) es el que más se usa. Y por lo general los equipos incluyen una segunda fuente de luz y quizás hasta una tercera, que puede ser otro laser con diferente longitud de onda de excitación, lámpara de arco o lámpara ultravioleta (Riera y col., 2008).

El haz que incide en la partícula es desviado en todas direcciones. La dispersión en ángulos cercanos a 0º es detectada por un fotodiodo colocado en la misma dirección de la fuente luminosa. La magnitud de esta dispersión es directamente proporcional al tamaño celular y es la “dispersión hacia adelante”

en inglés “Forward Scatter” (FSC). La luz desviada lateralmente y detectada por un fotomultiplicador colocado en ángulos próximos a 90º está relacionada con la complejidad interna o granularidad celular. Este parámetro es la “dispersión angular”, en inglés “SideScatter” (SSC) (Hewitt y Nebe Von Caron, 2004) (**Figura 1.13a,b,c**). En la **Figura 1.13d** se ilustra el gráfico de densidad de fluorescencia obtenido tras la marcación de células con dos fluorocromos. Los cuadrantes dividen las distribuciones de intensidad en regiones de células no marcadas (doble-negativo), células doblemente marcadas (doble-positivo), y células marcadas con uno sólo de los fluorocromos (Givan, 2011).

La elección del fluorocromo depende de:

- La longitud de onda de excitación de la fuente de luz de cada equipo.
- La óptica y el número de fotomultiplicadores disponibles en cada instrumento.
- Las características espectrales del colorante elegido principalmente si se requieren la combinación de dos o más fluorocromos.
- Del daño producido en la partícula que se quiere observar.

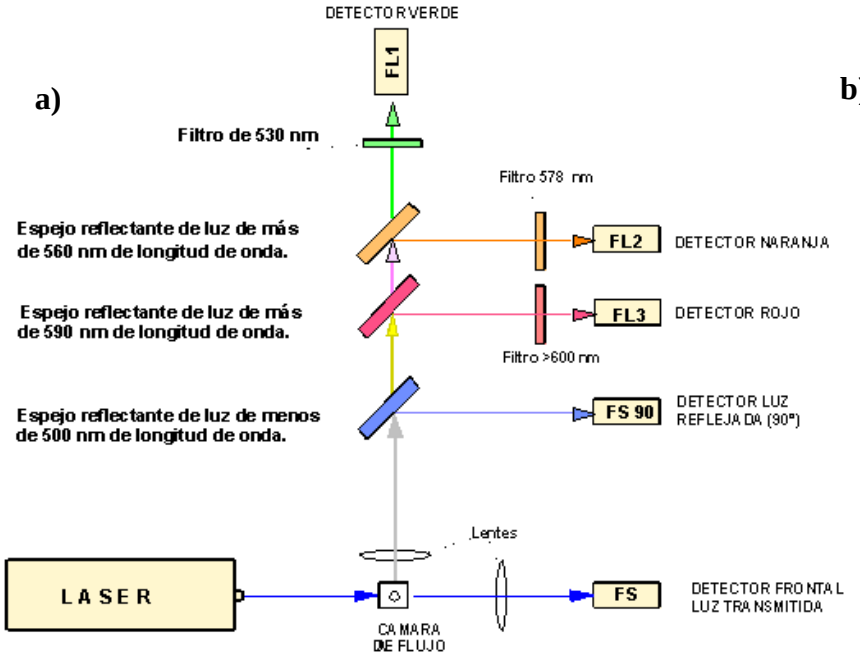
Los fluorocromos como se mencionó anteriormente se eligen de acuerdo al blanco al que se van a unir y del lugar donde se produce el daño del tratamiento aplicado. Algunos de los fluorocromos más utilizados son la fluoresceína diacetato (FDA) para observar el estado del metabolismo celular, es un compuesto lipofílico no fluorescente que difunde a través de la membrana plasmática, y dentro del citoplasma es hidrolizada por esterasas no específicas dando como resultado la fluoresceína (F) compuesto impermeable a la membrana, que emite fluorescencia verde. El ioduro de propidio (PI), compuesto impermeable a la membrana plasmática, que sólo puede atravesarla si esta fue dañada, uniéndose fuertemente a las bases de ADN y ARN, emitiendo fluorescencia roja. La rodamina 123, compuesto lipofílico catiónico que puede difundir a través de la membrana, pero solo quedará retenido en la célula si esta posee potencial de membrana. El isotiocianato de fluoresceína (FITC) es un marcador de división celular, una vez que se une covalentemente a las proteínas de membrana, la intensidad de la fluorescencia disminuye en un factor de dos por célula en cada división, entre otros (**Figura 1.12e**). Por lo tanto, ante la doble marcación de una población celular con FDA y PI, el análisis de cuadrantes del gráfico de densidad de fluorescencia

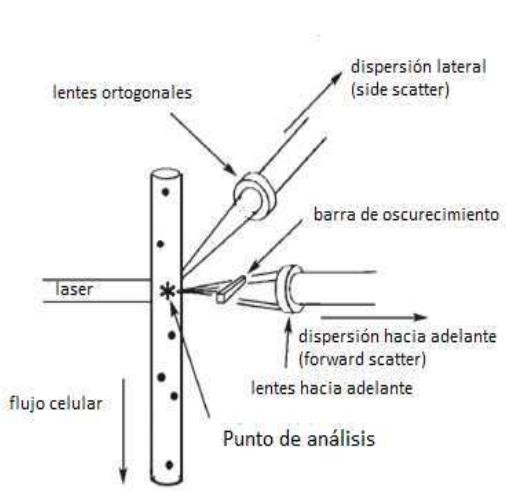
permitirá diferenciar cuatro subpoblaciones, cuyas características se detallan en la **Tabla 1.8**

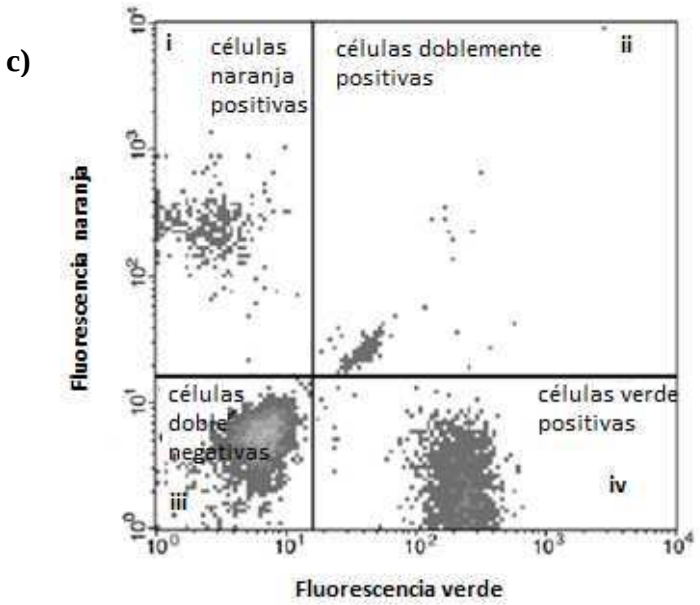
Tabla 1.8. Designación de cuadrantes de las células marcadas con FDA y PI según los posibles mecanismos celulares involucrados.

Número de Cuadrante	Propiedades de fluorescencia de las células colectadas en cada cuadrante	Posible mecanismo celular involucrado
i	F+ PI-	Actividad esterasa, membrana intacta
ii	F+ PI+	Actividad esterasa, membrana mínimamente dañada
iii	F– PI-	Actividad esterasa no detectada (o F extruido de la célula), membrana intacta
iv	F- PI+	Actividad esterase no detectada, membrana comprometida

Figura 1.13. a) Diagrama de los dispositivos de detección en un citómetro de flujo. b) Punto de análisis de un citómetro de flujo, mostrando la dispersión FSC y SSC (Givan, 2011). c) Gráfico de densidad de fluorescencia de céulas marcadas con fluorescencia verde y naranja (Givan, 2011), Los números en cada esquina indican el cuadrante d) Diagrama de puntos mostrando la dispersión de la luz FSC vs SSC (Givan, 2011). e) Esquema de marcación de una célula mediante fluorocromos (Joux y Lebaron, 2000).







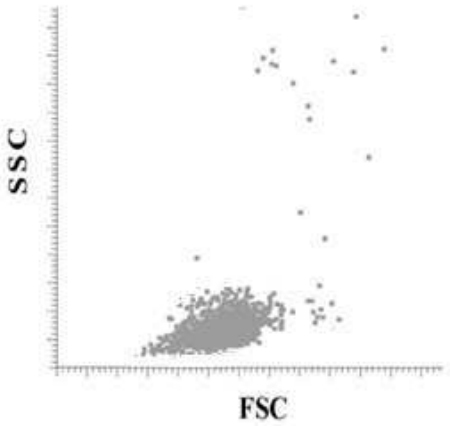
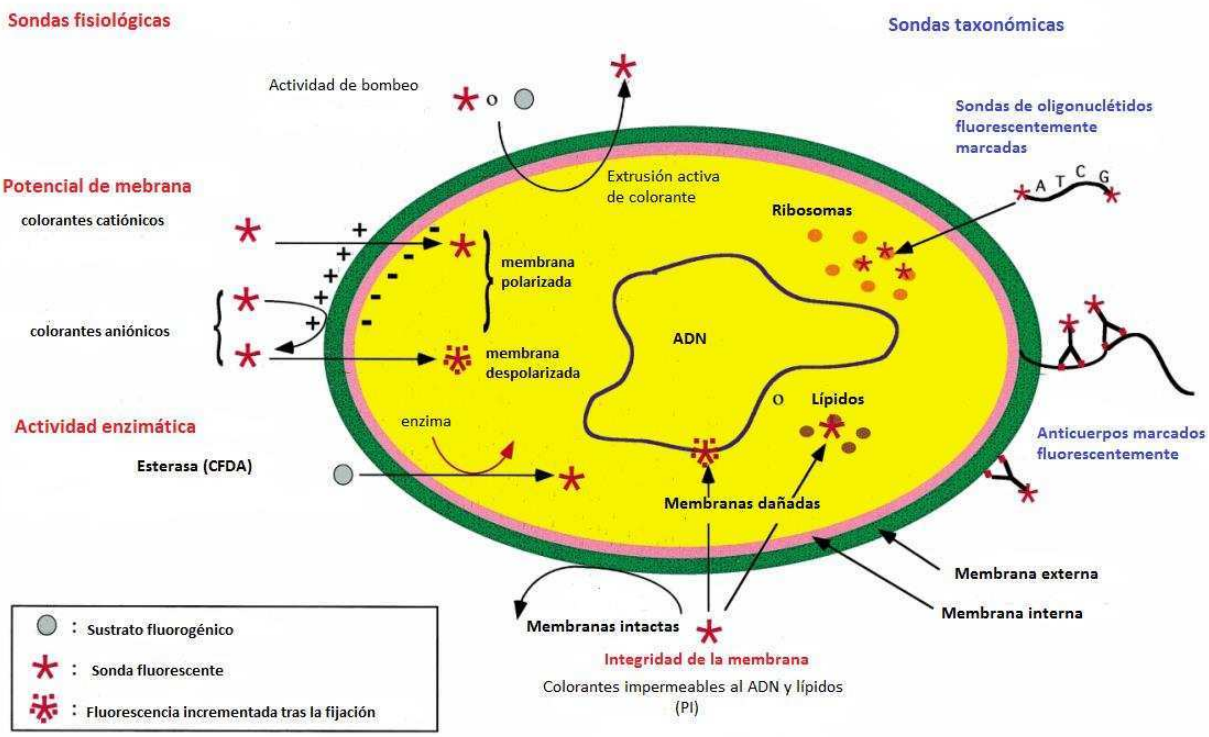


Figura 1.13. ***Continuación…***

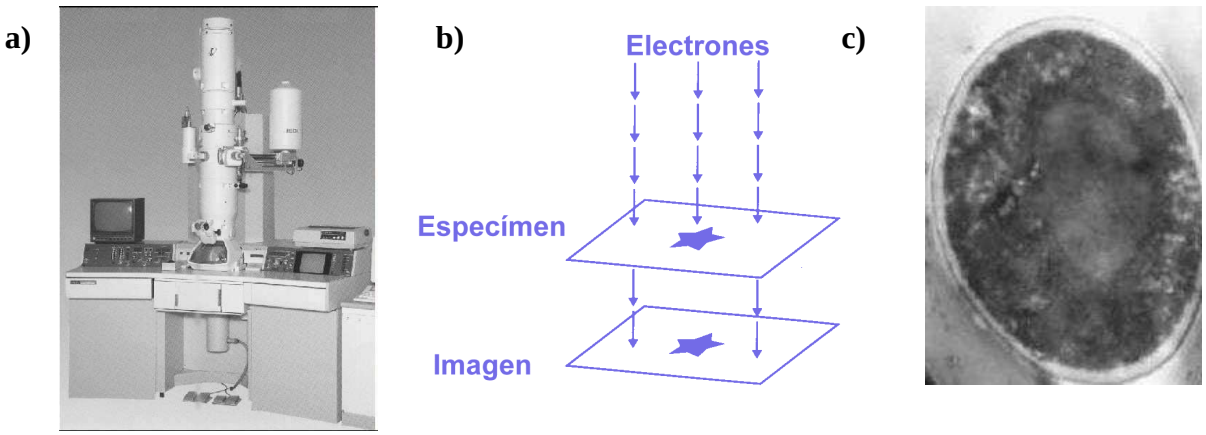
e)



1.11.3 Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) proyecta electrones a través de una capa muy delgada de tejido (espécimen) para producir una imagen bidimensional en una pantalla fosforescente (**Figura 1.14**). El brillo de un área particular de la imagen es proporcional la cantidad de electrones que fueron transmitidos a través del espécimen (Bozzola y Russell, 1992). Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar un objeto hasta un millón de veces. El tener una adecuada preparación de la muestra da lugar a una excelente definición de imagen. Son múltiples las facetas en las que interviene este tipo de microscopio, entre ellos, control de calidad señalamientos morfológicos, conformación de agregados, técnicas forenses, determinación de estratos en restauración y diferenciación histológica entre otros.

Figura 1.14. a) microscopio electrónico de transmisión. b) Esquema de obtención de imágenes por TEM (Bozzola y Russell, 1992). c) TEM de una célula de *S. cerevisiae* (extractado de Guerrero y col., 2005).



1.12 Estudio del color en los alimentos

Los caracteres organolépticos de los alimentos pueden analizarse a través

de las propiedades sensoriales de textura, apariencia y flavor (conjunción de aroma y sabor). El color es, en los alimentos, un factor determinante de la apariencia. Es un importante atributo sensorial, cuya percepción suele constituir el primer paso en la evaluación de los alimentos por parte del consumidor y es condicionante de su elección. Esto es así, debido a que el consumidor no puede evaluar la calidad microbiológica y nutricional de forma inmediata.

El color es indicativo de la calidad del producto, ya que pone de manifiesto numerosas reacciones de deterioro, las cuales generan pigmentos marrones, dando un aspecto desagradable al producto y alterando su calidad nutricional. La calidad nutricional se ve afectada, debido a que estas reacciones requieren de la participación de azúcares, compuestos nitrogenados y vitaminas. Estos reaccionan generando nuevos compuestos sin valor nutricional. El deterioro debido a cambios de color de los jugos cítricos se debe principalmente a reacciones de degradación del ácido ascórbico y a las reacciones de pardeamiento no enzimático.

El ojo humano es sensible a la radiación electromagnética en el ámbito de 380 a 770 nm de longitud de onda, la cual es comúnmente llamada “luz”. Los objetos son coloreados porque interactúan de distinta forma con la luz, usualmente blanca, incidente sobre ellos.

Los diferentes objetos se clasifican respecto a su comportamiento frente a la radiación en:

- Opacos: absorben y/o reflejan toda la luz.
- Transparentes: transmiten la mayor parte de la luz sin reflejarla ni difundirla.
- Translúcidos: parte de la luz es reflejada y parte transmitida, dando lugar a una importante componente difusa tanto transmitida como reflejada.

Cuando la luz encuentra interfases ocurre difusión (“*scattering*”, en el habla inglesa). Las partículas dispersas en un medio continuo originan múltiples refracciones y reflexiones que esparcen la luz en todas direcciones. Por eso, cuando el tamaño de partícula es pequeño, se absorbe menos luz durante el pasaje de cada partícula y, al mismo tiempo, la superficie total de interacción luz-material es mayor, dando lugar a mayor sensación de claridad.

Los principios fundamentales de la colorimetría están basados en las tres leyes de Grassman; de las cuales, la más importante establece que cualquier color puede ser igualado por la suma de tres colores primarios en cantidades convenientes. Estos colores primarios deben ser elegidos de forma tal que sean independientes entre sí, es decir, ninguno puede ser obtenido por combinación de los otros dos. En la práctica, los colores primarios a utilizar en forma aditiva son tres: rojo, verde y azul. La suma de todos ellos produce la sensación de luz blanca o acromática (Lozano, 1978).

El color puede ser definido por los siguientes atributos:

- La *claridad* es el atributo que hace corresponder a cada color una equivalencia con respecto a una escala de grises. A la cualidad psicológica claridad le corresponde la magnitud psicofísica *luminosidad*.
- El *tono o matiz* es el atributo que adjudica al color una cualidad que se define como rojo, naranja, amarillo, verde, azul, púrpura o cualquier combinación de ellos. A la cualidad psicológica tono le corresponde la magnitud psicofísica *longitud de onda dominante*.
- La *saturación* es el atributo que, fijado el tono, describe al color por su similitud con un color espectral puro, cuanto más parecido a este, tanto más saturado. A la cualidad psicológica saturación le corresponde la magnitud psicofísica *pureza.*

Una descripción cuantitativa de un color puede ser dada en los términos de los tres atributos del color mencionados previamente. El mecanismo psicofísico de visión del color da al observador humano la capacidad de apreciar los tres atributos o características del color. Sin embargo, el observador no puede percibir la composición espectral del estímulo.

La medida objetiva del color de un material puede obtenerse del análisis de su espectro visible, por transmisión o reflexión, obtenido con un espectrofotómetro. De los sistemas propuestos para la especificación del color el más difundido universalmente es el de la CIE (Comission Internationale de l'Eclairage), en el cual

el color es indicado por tres variables X, Y, Z, conocidas como los valores triestímulo y que representan a tres colores primarios imaginarios (relacionados con el verde, el rojo y el azul).

El cálculo necesario para obtener los valores triestímulo CIE para un objeto se esquematiza de la siguiente manera (**Figura 1.15a**): El valor del estímulo visual es la resultante de una combinación del espectro de la luz incidente (E vs λ) con el espectro de la muestra (R vs λ) y con las funciones de distribución de la sensibilidad del ojo para cada uno de los tres primarios imaginarios (S vs λ). El área bajo la curva resultante se integra en el espacio visible para obtener los valores numéricos de la contribución de cada uno de los tres primarios ideales (X, Y, Z) al color dado.

El factor de transmitancia o reflectancia espectral se obtiene mediante un espectrofotómetro, en el que se determina la luz transmitida o reflejada para cada λ. La distribución energética para varios iluminantes es conocida, por ejemplo: el iluminante C tiene una distribución energética similar a la luz blanca solar (difusa, cielo cubierto). Otras de las variables a fijar es el ángulo del observador o campo visual: cuando se miran objetos la información general proviene de ángulos de 10-20 ºC, pero cuando se observan detalles, el ángulo es de 2 ºC; en general, en colorimetría de alimentos se emplea éste último. En los espectrofotómetros actuales este cálculo se realiza automáticamente por un sistema de computación acoplado al instrumento. De esta manera el color queda determinado por un punto en un espacio tridimensional de coordenadas X, Y, Z. Sin embargo, la forma habitual de representación es calcular las llamadas coordenadas cromáticas x, y definidas por:

$$x = \frac{X}{X + Y + Z} \qquad (1.1)$$

$$y = \frac{Y}{X + Y + Z} \qquad (1.2)$$

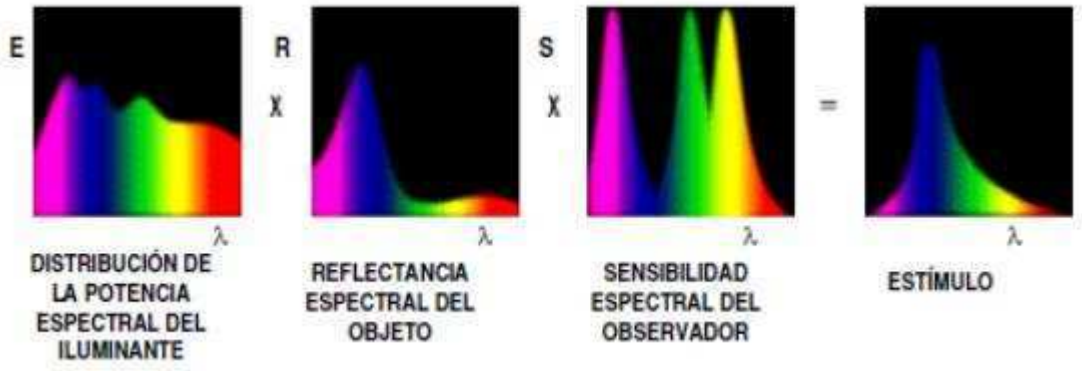
El color definido por (x,y) se representa en el diagrama cromático CIE (**Figura 1.15b)** donde sólo tiene lugar la cromaticidad del color en cuestión. Para que la especificación del color sea completa, eventualmente se utiliza la luminosidad Y como tercera coordenada, en un plano perpendicular que

representa la propiedad de reflejar más o menos luz. El plano de las coordenadas cromáticas está delimitado por una línea recta que une los extremos del espectro visible, conocida como línea de púrpuras (Kelly, 1943).

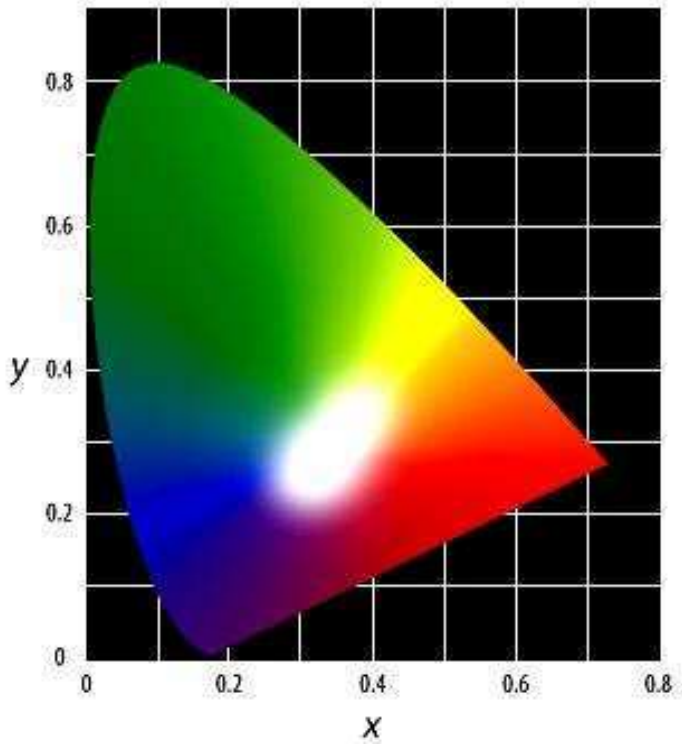
El espacio CIE 1931 es muy sencillo de manejar y es excelente para representar mezclas aditivas, pero no es homogéneo (distancias geométricas iguales no suelen representar diferencias de color iguales en la percepción por el ojo humano). Para subsanar el problema de su no uniformidad, se han desarrollado una serie de transformaciones del espacio CIE que permiten obtener mejores resultados en la evaluación de la diferencia de color. Así surgen las transformaciones CIELab (1974) y

Figura 1.15 a) Suma de radiaciones espectrales que conforman en el estímulo o flujo radiante que percibe el observador. b) Diagrama Cromático CIE

a)



b)



CIELuv (1976). El CIELuv es una transformación lineal del espacio cromático CIE, en cambio, líneas rectas en el espacio CIE corresponden a líneas curvas en el espacio CIELab. Es sencillo calcular las coordenadas cromáticas en estos sistemas a través de los valores triestímulo X, Y y Z, y viceversa.

1.12.1 Medición de color con espectrocolorímetro o espectrofotómetros de reflectancia

Los espectrofotómetros de reflectancia realizan la medición de reflectancia o transmitancia (según donde se coloque la muestra) a medida que barren las distintas λ y luego realizan la integral para todas las λ automáticamente.

Para realizar la medición objetiva del color con estos instrumentos se requiere decidir previamente cómo será la presentación de la muestra (cubeta, posición, tipo de medición; si por reflectancia o por transmitancia).

1.12.2 Funciones de color

Las funciones de color son valores que se obtienen por combinación matemática de los valores triestímulo, y que representan los atributos de color, según los distintos espacios cromáticos. Para describir un cambio de color se debe primero seleccionar la función más adecuada para ello, que es la que representa más sensiblemente la respuesta al cambio realizado en el producto (por ejemplo, pérdida o formación de pigmento).

En el espacio CIELab algunas funciones de color son las siguientes:

$$L^*_{ab} = 116.(Y/Y_n)^{1/3} - 16 \qquad (1.3)$$

$$a^* = 500.[\ (X/X_n)^{1/3} - (Y/Y_n)^{1/3}\ ] \qquad (1.4)$$

$$b^* = 200.[\ (Y/Y_n)^{1/3} - (Z/Z_n)^{1/3}\ ] \qquad (1.5)$$

Donde L^*_{ab} es el parámetro *luminosidad* que toma valores entre 0 (negro) y 100 (blanco); a* (eje rojo-verde) y b* (eje amarillo-azul) toman valores desde -120 a 120. X_n, Y_n, Z_n son los valores correspondientes al iluminante (para muestras opacas) o a la referencia (para muestras transparentes).

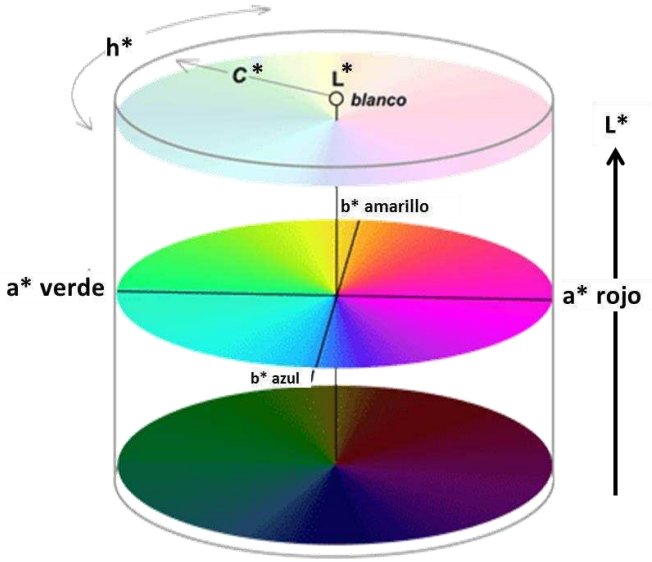
Dentro de este espacio es posible definir otras funciones que pueden ser indicativas de determinados atributos de color, como la saturación y el tono. Como se observa en la **Figura 1.16,** el centro es gris y para cualquier punto que represente un color en este modelo CIE L*a*b*, el segmento que une el centro con el punto, puede considerarse un vector que partiendo del gris apunta al color y la magnitud del mismo es considerada el croma (C*) del color, que representa la pureza de tono (saturación) y el ángulo entre ese vector y el eje horizontal de abscisas (a*) es el ángulo de tono (h*). Croma (C*) puede distribuirse en los cuatro cuadrantes del plano a*b*; sus valores van desde 0 en el centro (gris neutro) hasta 100 en los bordes (más saturado). Por su parte, el ángulo de tono h* se ubica en una circunferencia de 360° donde el valor 0° está definido por el rojo púrpura; 90°, por el color amarillo; 180°, por el color azul verdoso y finalmente; 270° con el color azul. A partir de los parámetros de color L*, a* y b*

también puede calcularse el índice de blanco (HW) (Zhu y col., 2008). Las ecuaciones correspondientes a C* y h* son las siguientes:

Croma métrica: $C^*_{ab} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ (1.6)

Ángulo de tono: $h_{ab} = \tan^{-1}(b^*/a^*)$ (1.7)

Figura 1-16. Espacio CIE L*a*b*.



1.12.3 Análisis sensorial de alimentos

La evaluación sensorial se compone de un conjunto de técnicas de medición de las respuestas humanas hacia los alimentos, reduciendo al mínimo los efectos potenciales de sesgo debido a la identidad de marcas u otra información que pueda influir sobre la percepción del consumidor. Tiene como objeto, tratar de aislar las propiedades sensoriales de los alimentos en sí mismos y proporcionar información importante y útil a desarrolladores de producto, científicos y gestores sobre las características sensoriales de sus productos.

Si bien los instrumentos son efectivos en muchos casos, no pueden medir

ni reemplazar la percepción sensorial. Por ejemplo, hay ingredientes y procesos que tienen un efecto sinérgico que no pueden medirse con un instrumento. En el momento que una porción de alimento se contempla, se huele y se introduce en la boca se desencadenan una serie de efectos que están relacionados entre sí y que dependen de la intensidad y calidad del estímulo que los provoca, de las características de los receptores sensoriales y de la atención y conocimientos básicos del individuo. El éxito depende de la proximidad lograda entre el estímulo y la respuesta dada por el individuo a la sensación percibida. Cuando una producción está bien definida, tanto en términos instrumentales como sensoriales, la calidad de un producto es más completa, tendiendo a los modernos conceptos de la calidad total (Espinosa Manfugás, 2007).

Cuando se utiliza a las personas como instrumento de medida, es necesario controlar todas las condiciones de las pruebas a realizar para evitar los errores causados por factores fisiológicos, psicológicos y culturales por parte del sujeto; factores ambientales que puedan alterar el juicio por parte del sujeto y factores inherentes al alimento (por ejemplo: intensidad del estímulo inferior a la sensibilidad del individuo). Cuando se habla de error no precisamente se habla de un juicio equivocado sino que se incluye a todos los factores antes mencionados. Para que el análisis sensorial sea considerado como una técnica de análisis se exigen otros requisitos (Lawless y Heymann, 2010):

- Los resultados deben solicitarse y expresarse de manera tal que las conclusiones extraídas de la experiencia sean homologables a las extraídas por otro laboratorio.
- Los resultados deben permitir calcular sus límites de validez y sensibilidad.

1.12.4 Jueces

Son los sujetos que llevan a cabo la rutina de evaluación sensorial, es decir, el instrumento de medida. Son seleccionados y entrenados o no, dependiendo del tipo de pruebas y producto a evaluar. El Comité de Evaluación Sensorial perteneciente a la Sociedad Americana para el Análisis de Materiales

(ASTM, 1968) los ha clasificado en tres subgrupos:

- *Panel entrenado:* son sujetos cuidadosamente seleccionados y entrenados en las propiedades sensoriales (virtudes y defectos) que han de evaluar en el alimento. Deben ser capaces de establecer la intensidad de un carácter sensorial, tanto como la apreciación global de un alimento. El entrenamiento asegura la utilización sistemática de la combinación de las percepciones sensoriales de los evaluadores, como guía analítica para determinar la calidad de los productos alimenticios (IRAM 20005-2, 1996). Poseen un lenguaje formal y en muchas ocasiones tienen conocimiento científico de las propiedades que miden. Dado el elevado conocimiento que poseen del producto y su entrenamiento, se utiliza un número escaso de ellos (no más de 10).

- *Panel semientrenado:* constituido por personas familiarizadas con los atributos del producto que van a evaluar. Este panel es capaz de discriminar diferencias, medir intensidad de atributos en escalas y evaluar globalmente al producto. Tienen un lenguaje menos formal que el panel entrenado. La variabilidad individual puede balancearse considerando un mayor número de panelistas (25 a 40 miembros).

- *Panel de consumidores*: no tienen ningún tipo de entrenamiento, se eligen al azar teniendo en cuenta que sean consumidores del producto que van a evaluar. Son ideales para evaluar la aceptabilidad de un producto pudiendo también evaluar la intensidad de atributos en escalas simples siguiendo determinadas consignas en la elaboración del formulario.

1.12.5 Selección del panel

No existen reglas fijas en cuanto a las pruebas y criterios de selección. Fundamentalmente dependerá del tipo de trabajo que se espera del panelista. En general, se reclutan tres veces más candidatos de los que se van a precisar. Esto se debe a la necesidad de tener personas suplentes y además porque los

participantes que son seleccionados para una prueba no necesariamente serán buenos para otra.

Las pruebas de selección utilizadas son generalmente similares a las que luego se van a utilizar como método de análisis, con el propósito de familiarizar al panelista con dichos ensayos.

Si se requiere un estudio de aceptabilidad de un producto por consumidores, no es necesario tener personas altamente entrenadas. Bastará con seleccionar aquellas con cierta aptitud para detectar los gustos básicos más exaltados en el alimento a analizar y entrenarlas mínimamente en las pruebas que irán a realizar.

Si se busca detectar algún componente extraño en el producto o, por ejemplo, realizar un perfil de sabor del mismo se necesita tener panelistas más entrenados, los cuales seguirán diferentes pruebas de selección secuenciales. Dichas pruebas aumentarán la habilidad para reconocer e identificar atributos sensoriales en sistemas complejos y la sensibilidad y memoria para brindar mediciones sensoriales precisas (IRAM, 20005-1, 1996).

1.12.6 Selección del sitio de la prueba

La localización del sitio de prueba tiene numerosos efectos sobre el resultado, no sólo por la localización geográfica, sino porque el lugar de prueba define muchos otros aspectos de la forma en que el producto es muestreado y percibido.

- Pruebas de laboratorio: realizadas en condiciones controladas en un laboratorio bajo la supervisión de un coordinador.
- Pruebas de locación central (puesto de prueba): realizadas en un punto de asistencia común a un grupo de personas guiadas por un coordinador (iglesias, clubes, campings, etc.)
- Pruebas domiciliarias: realizadas en el hogar en situación de consumo sin supervisión más que una indicación inicial para el llenado del formulario.

1.12.7 Sala de prueba

Los requisitos que debe reunir una sala de análisis sensorial están normalizados hasta en los mínimos aspectos (ISO 8589:1988). Asímismo, se debe evitar que los sujetos interactúen introduciendo errores de apreciación por distracción. Es por ello que se recurre al uso de cabinas o de sistemas de aislamiento o no interacción entre los evaluadores. Existen, sin embargo pruebas especiales descriptivas donde un grupo reducido de personas entrenadas evalúan y discuten en conjunto, en una mesa redonda los atributos de las muestras.

1.12.8 Clasificación de las pruebas de evaluación sensorial

Los métodos de medición sensorial comprenden una amplia gama de pruebas de evaluación. La elección de los mismos se basa en los objetivos del proyecto y en la disponibilidad de personas y material a utilizar. Stone y Sidel (1993) han clasificado los métodos más frecuentes que se utilizan en tres grandes categorías:

- *Pruebas discriminativas:* determinan si dos muestras son perceptiblemente diferentes.
- *Pruebas descriptivas:* describen detallada y objetivamente al producto en términos de sus atributos y/o defectos sensoriales. Permiten obtener una descripción completa del producto, ayuda a identificar ingredientes y variables de proceso, y/o determinar que atributos sensoriales son importantes para su aceptación. La intensidad con que se manifiesta cada atributo se expresa por un valor asignado a una escala de medida.
- *Pruebas afectivas*: el objetivo primario en este tipo de pruebas es evaluar la aceptabilidad global o preferencia de un producto. Las pruebas afectivas siguen, en general a estudios discriminativos y /o descriptivos y son previas a un estudio de mercado. Emplean consumidores del producto que se ha de evaluar.

A continuación se describirán brevemente los fundamentos de algunas pruebas sensoriales que se han utilizado en este estudio.

1.12.8.1 Pruebas discriminativas

- **Prueba de diferencia contra control**

Los objetivos de esta prueba consisten en determinar si existe diferencia entre una o más muestras y el control, y estimar el tamaño de dicha diferencia. Se presenta a los participantes una muestra control de referencia, identificada como tal, y una o varias muestras (una de las cuales puede ser un control camuflado), a ser comparadas con la referencia. El juez debe indicar el tamaño de dicha diferencia generalmente, en una escala de categorías desde "ninguna diferencia" a "diferencia muy grande*".*

Suele ser ventajoso agregar un control camuflado (consistente en una muestra igual al control, pero incluida entre las muestras a evaluar) para obtener una medida del efecto placebo.

Esta prueba es útil en situaciones en las cuales puede haber una diferencia detectable, pero el tamaño de esa diferencia es el que afecta la toma de una decisión, como por ejemplo, en estudios de vida útil o control de calidad de un producto (Lawless y Heymann, 2010).

1.12.8.2 Pruebas afectivas

- **Test de aceptabilidad**

El test de aceptabilidad más común es *la prueba hedónica.* La misma consiste en la evaluación de producto en una escala de categorías de agrado y desagrado por un determinado producto, la cual podrá ser balanceada entre dichas categorías o, desbalanceada hacia la zona de gusto o de disgusto. Se presenta una o varias muestras a los consumidores, en la que deberán evaluar la impresión global sobre una escala que puede ser de tipo estructurada, semiestructurada o no estructurada y volcar su juicio en una planilla. Estos ensayos son útiles para diagnosticar problemas imperceptibles en laboratorio antes de investigaciones de mercado más costosas y debido a que los tests se realizan con consumidores "blanco", hacia quienes está dirigido el producto, la

información que surge es sustentable y valorable en defensa de sus competidores. La escala hedónica de 9 puntos es muy utilizada dado que presenta una categoría central neutral y una escala marcada con adverbios desde por ejemplo, “me gusta extremadamente” hasta “me disgusta extremadamente” donde cada escalón representa cambios en un tono hedónico, lo cual lo hace muy adecuado para el análisis estadístico (Lawless y Heymann, 2010).

- **Test de campo**

El objetivo principal de esta prueba afectiva consiste en evaluar la respuesta personal (aceptabilidad / impresión o bien preferencia frente a competidores) de los consumidores de un determinado producto o servicio siguiendo un protocolo debidamente especificado en el formulario (Meilgaard y col., 2006).

A. Usos de los test campo con consumidores:

1. Determinar aceptabilidad por consumidores, sobre una base sensorial despojado de la definición conceptual del producto que acompaña a su envase y/o promoción.
2. Diagnosis de problemas imperceptibles en laboratorio antes de investigaciones de mercado más costosas.
3. Son mejor usados como paso final antes de un estudio de mercado o en supermercados.
4. Provee la dirección de una reformulación si ello fuera necesario.
5. Selección de múltiples formulas o de las más promisorias, sobre la base de un test camuflado.
6. Debido a que los tests se realizan con consumidores “blanco”, hacia quienes está dirigido el producto, la información que surge es sustentable y valorable en defensa de sus competidores.

B. Presentación de las muestras (número de productos a comparar)

Existen tres diseños principales:

- Los *tests paralelos* presentan dos productos simultáneamente. Se realizan más en locaciones centrales que en hogares. Bajo circunstancias controladas tiene buena sensibilidad pues las personas evalúan ambos productos. El análisis de datos se realiza por ANOVA. Las comparaciones son estadísticamente directas. Este tipo de test deben ser controlados y monitoreados por el analista.

- Los *tests de un producto (monádicos):* cada sujeto evalúa un producto. Economiza tiempo pero se requiere de gran cantidad de sujetos. Puede no ser práctico si el producto no es muy usado o si es difícil reclutar a las personas La comparación estadística entre productos requiere de comparación entre grupos. Existe una desventaja debido a la variabilidad individual. Además deben evitarse dado que el ser humano es mal evaluador de lo absoluto. Si compara con otros productos su potencial aumenta. Es mucho más seguro poner un producto de referencia de base. Ejemplos pueden ser fórmulas alternativas o muestras de la competencia.

- Los *tests monádicos secuenciales:* mejoran esta situación porque al presentar dos productos de forma secuencial, permite tener dos fuentes de variación: sujetos y producto. En algunas situaciones este tipo de tests es inaplicable. Cuando el proceso de evaluación se ve alterado severamente por el uso del primer producto (enjuague para el pelo, cremas, etc.).

C. Estructura del cuestionario

Cuando se diseña un cuestionario es útil hacer un diagrama de flujo de los tópicos a cubrir. La regla principal cuando se diseña un cuestionario es ir de lo más general a lo específico. Al principio se debe preguntar por la impresión global del producto. Para ello se recomienda utilizar una escala hedónica de 9 puntos balanceada. Inmediatamente después se formulan preguntas abiertas con un apropiado patrón de omisión de preguntas de acuerdo a lo contestado. El direccionamiento de preguntas orienta para las razones de gusto si la impresión global fue positiva o de disgusto si la impresión global fue negativa y en todo caso

si encuentra alguna característica positiva. Aunque las respuestas abiertas presentan desventajas, dan la oportunidad de conocer razones de gusto o disgusto con las propias palabras del encuestado. Luego, se investigan atributos más específicos a través de escalas de punto óptimo, de intensidad y de gusto (apariencia, gusto, textura, color, etc.). Finalmente, puede chequearse nuevamente la satisfacción global o algún otro índice de gusto y se continúa con una escala de preferencia (si es que se evalúa más de un producto secuencialmente). Lo importante es no preguntar primero por los atributos y luego por la impresión global pues los consumidores piensan en el producto como un todo (de forma integrada). Las preguntas sobre atributos individuales los convierte en más analíticos y trae fallas cuando se les pregunta en forma global. Además, es común que en la impresión global utilicen terminología empleada en las escalas de atributos particulares.

Sumada a las preguntas de selección de participantes, se puede incluir en el cuestionario algunas preguntas de información personal (edad, ingresos, composición familiar, residencia, ocupación). Este tipo de preguntas de carácter demográfico nunca debe realizarse al principio del cuestionario pues inhiben a la persona y la hace más insegura. Al final del cuestionario es lo más adecuado. Lo sentirá más natural.

1.12.8.3 Vida útil sensorial

La vida útil de un alimento representa aquel período de tiempo durante el cual el alimento se conserva apto para el consumo desde el punto de vista sanitario, manteniendo las características sensoriales, funcionales y nutricionales por encima de los límites de calidad previamente establecidos como aceptables.

De la definición de vida útil surge que lo primordial es el aspecto sanitario. Ningún fabricante puede tolerar que sus clientes se intoxiquen, ya sea por una proliferación microbiana elevada o por la presencia de un algún compuesto químico tóxico generado durante un almacenamiento demasiado prolongado. Para algunos alimentos también es importante el aspecto nutricional. Por ejemplo, en fórmulas para lactantes, la provisión de vitaminas y otros nutrientes esenciales no debe verse afectada por el deterioro de éstos durante el almacenamiento.

Pasadas las barreras sanitarias y nutricionales, la barrera restante depende en definitiva de las propiedades sensoriales del producto. Se puede discutir que es importante tener en cuenta los cambios físicos o químicos, pero éstos repercuten directamente sobre la calidad sensorial. Por ejemplo, durante el almacenamiento de un jugo de fruta se pueden producir reacciones químicas que generan productos de pardeamiento. Se buscarán mecanismos que retarden o bloqueen estas reacciones químicas, pero en definitiva lo que se quiere evitar es que aparezca un defecto sensorial que impacte negativamente al usuario (Hough, 2005)

El análisis de supervivencia comprende un conjunto de procedimientos estadísticos para analizar aquellos tipos de datos que incluyen el tiempo la comercialización de un alimento y el rechazo del alimento por parte de los consumidores. Con la finalidad de determinar la vida útil de los alimentos, y habida cuenta de que interesa conocer el tiempo en el cual el consumidor rechaza el producto, se utilizará la función de rechazo F(t), definida como la probabilidad de que un consumidor rechace un producto almacenado antes del tiempo t.

2. Objetivos

2 Objetivos

2.1 Hipótesis y objetivo general

Las frutas son vulnerables a la contaminación, supervivencia y desarrollo de microorganismos y/o sus metabolitos que pueden provocar ETA´s. En el caso de derivados frutales con procesamiento mínimo, si bien los beneficios en la salud asociados a su consumo regular están claramente establecidos, se ha demostrado que los mismos son responsables de una proporción creciente de brotes de ETA's en los últimos años. El riesgo se ve agravado por diversos factores tales como la ingesta sin ningún tratamiento previo, la ineficacia de los procesos de elaboración de subproductos para destruir los contaminantes, la ausencia de programas de prerrequisitos y HACCP, fallas en los sistemas de validación y verificación, el cambio en los sistemas de distribución de los productos y el tráfico internacional creciente (Wallace y col., 2010). Los estándares de inocuidad se han vuelto entonces, una preocupación común en la industria de alimentos, disminuyendo de forma progresiva el acceso a los mercados. Para enfrentar esta problemática, la industria trabaja en reducir, mediante la implementación correcta de los programas mencionados, la contaminación en la materia prima y durante el procesamiento o bien, utilizar tecnologías de procesamiento apropiadas para reducir la carga microbiana y/o inhibir su desarrollo. Dada la gran diversidad de productos de origen vegetal, dichas tecnologías deben ser adaptadas al producto/operación específicas para ser efectivas. La posibilidad de procesos de producción sin contaminación, aún en los países más desarrollados, no existe o es mínima. Por lo tanto, casi siempre, es necesario incluir un paso de descontaminación específico. Por otro lado, para satisfacer las tendencias modernas de consumo, la industria debe proveer productos de alta calidad organoléptica, nutricional y funcional con apariencia de "naturales" y por tanto estas operaciones enfrentarían objetivos contradictorios: por un lado una destrucción microbiana importante y por otro el mantenimiento de la alta calidad en los aspectos mencionados. Como ya se ha mencionado, en respuesta a esta demanda surge la utilización de tecnologías emergentes usadas de modo individual o bajo una estrategia de combinación.

La aplicación inteligente de combinaciones de factores de stress pretende alcanzar la inhibición e inactivación de diferentes tipos de microorganismos (bacterias, mohos y levaduras) mediante tratamientos menos severos y al mismo tiempo interferir la homeostasis microbiana activa de las células vegetativas y pasiva de las esporas utilizando un enfoque multifactorial donde los componentes actúen de forma sinérgica o al menos aditiva sobre la inhibición y/o inactivación microbiana.

La aplicación de LP en la preservación de jugos frutales resulta muy promisoria dado que algunos estudios han reflejado su efectividad como tecnología de descontaminación (Sauer y Moraru, 2009). Incluso, ciertas combinaciones de LP con otras tecnologías emergentes como PEF, UV-C y calor también han sido reportadas en la inactivación microbiana (Palgan y col., 2011; Muñoz y col., 2011, Marquenie y col., 2003). La combinación de LP y US podría mejorar la estabilidad microbiológica de los alimentos, dado que presentan diferentes mecanismos de inactivación

El objetivo general de este trabajo reside en evaluar cuantitativamente la eficiencia de la aplicación de LP en 2 modalidades, estanco y flujo continuo y su posible combinación con US o temperatura moderada para inhibir y/o inactivar microorganismos patógenos y deteriorativos de derivados frutales con miras a reducir la intensidad de los tratamientos convencionales de conservación y/o desarrollar tecnologías de procesamiento mínimo, con reducido impacto en la calidad sensorial y económicamente beneficiosas. El mismo se organizó en 4 partes, a saber:

Parte I. Tratamiento por LP en modo estanco (LP_e) de jugos frutales.

Parte II. Tratamiento por LP_e asistida por otras tecnologías de jugos frutales.

Parte III. Tratamiento por luz pulsada en flujo continuo (LP_c) de jugo de manzana.

Parte IV. Tratamiento de jugo de manzana por luz pulsada en flujo continuo (LP_c) en combinación con ultrasonido (US) y temperatura moderada.

Parte V. Efectividad del tratamiento de luz pulsada en flujo continuo (LP_c) en combinación con US y temperatura moderada. Estudios de calidad sensorial y organoléptica

2.2 Objetivos específicos

Parte I:

- Estudiar y optimizar algunas variables involucradas en la efectividad del tratamiento de preservación de jugos frutales por LP en sistema estanco (LP_e). Analizar la influencia de pH, °Brix, absorbancia en el rango comprendido entre 200-1100 nm, turbidez y tamaño de partícula de los jugos en la efectividad del tratamiento por LP.
- Analizar el impacto del tipo de jugo en la eficacia del proceso utilizando sistemas modelo y sistemas reales (jugos comerciales y naturales exprimidos) mediante estudios de reto microbiano.
- Modelar y validar la cinética de inactivación de los microorganismos inoculados en distintos jugos frutales y tratados con LP en sistema estanco y continuo a través de la utilización de la microbiología predictiva. Evaluar la efectividad del tratamiento a partir de los parámetros obtenidos según los distintos modelos.
- Analizar el estado fisiológico mediante la aplicación de la técnica de citometría de flujo y los daños estructurales por microscopía electrónica de transmisión de *Saccharomyces cerevisiae KE162*, tras la aplicación de LP_e en medio modelo y en jugo de manzana. Evaluar la habilidad de las células detectadas con daño sub-letal, en caso de que existieran, de recuperarse en medio rico.
- Evaluar la dinámica del crecimiento de microorganismos inoculados y de la flora nativa de los jugos naturales tratados con LP_e y almacenados durante el almacenamiento en refrigeración. Caracterizar la interacción (aditiva, sinérgica, antagónica) de la combinación de LP_e y la subsecuente refrigeración.

Parte II:

- Evaluar la efectividad de LP_e asistida por US y temperatura moderada, con el propósito de mejorar la inactivación de células vegetativas o esporas de microorganismos patógenos y deteriorativos característicos de los jugos de fruta, con el objeto de obtener un producto microbiológicamente estable.
- Caracterizar la interacción (aditiva, sinérgica o antagónica) de los factores emergentes aplicados e identificar situaciones sinérgicas y aditivas del enfoque multifactorial.
- Analizar el estado fisiológico mediante citometría de flujo y los daños estructurales por microscopía electrónica de transmisión de *S. cerevisiae* en jugo de manzana causados por la exposición a LP y/o su combinación con US y temperaturas moderadas, por citometría de flujo y microscopía electrónica de transmisión.
- Evaluar las modificaciones de las células vegetativas o esporas de microorganismos patógenos y deteriorativos tratados con LP_e y/o su combinación con US durante el almacenamiento refrigerado.
- Proponer algunos procesos combinados de preservación de jugos, en base a la integración de los resultados previos, seleccionando aquellos tiempos o temperaturas de procesamiento que impliquen menor deterioro en la calidad, y que simultáneamente garanticen seguridad microbiológica.

Parte III:

- Instalación, adaptación, puesta a punto y calibración del equipo de LP en la modalidad de flujo continuo (LP_C). Evaluar la efectividad del tratamiento simple en microorganismos de relevancia en jugo de manzana comercial y natural.

Parte IV:

- Evaluar la efectividad del tratamiento combinado US+LP_c en microorganismos de relevancia en jugo de manzana natural.
- Estudiar las modificaciones de la flora nativa

Parte V:

- Estudiar los aspectos sensoriales y de color producidos por la combinación de US+LP_c para el jugo de manzana natural.
- Estimar la vida útil del jugo de manzana natural procesado mediante el proceso combinado propuesto utilizando un panel de consumidores.

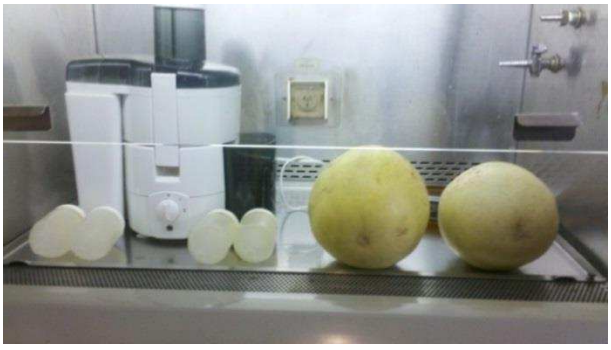
3. Materiales y Métodos

3 Materiales y Métodos

3.1 Materia prima

Se utilizaron jugos comerciales de manzana (CEPITA, Coca- Cola, Argentina; pH: 3,4 ± 0,2; 12,1 ± 0,6 ºBrix, jugo comercial de naranja (TROPICANA, PepsiCo Inc, Argentina; pH: 3,9 ± 0,3; 11,6 ± 0,8 ºBrix) y jugos naturales exprimidos de manzana (*Pyrus malus L,* var, Granny Smith; pH: 3,4 ± 0,2; 12,6 ± 0,1 ºBrix), naranja (*Citrus sinensis*, var. Valencia, pH: 4,3 ± 0,2; 10,1 ± 1,4 ºBrix), melón (*Cucumis melo*, var. rocío de miel; pH: 5,9 ± 0,3; 10,6 ± 0,3 ºBrix) y frutilla (*Fragaria ananassa,* var. Duch, pH: 3,8 ± 0,3; 8,8 ± 1,4 ºBrix). Sólo para los estudios del efecto de la contaminación inicial en la efectividad del procesamiento por luz pulsada, se empleó jugo comercial de manzana TROPICANA (PepsiCo, Argentina, pH 3,1 ± 0,1; 13,1 ± 0,1 ºBrix). Para la obtención de los jugos, las frutas se lavaron y luego se descontaminaron externamente sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio al 0,02 % por 3 minutos, se enjuagaron con agua destilada, se secaron con papel absorbente y finalmente se expusieron a la luz UV por 15 minutos en una cabina de seguridad biológica tipo II (Nuaire Inc., EEUU) (**Figura 3.1**). Asimismo, todos los componentes del extractor de jugos se sanitizaron con alcohol etílico y posterior exposición a la luz UV. Con el objeto de reducir la cantidad de pulpa, los jugos naturales una vez obtenidos se centrifugaron (Eppendorf, modelo 5804 R, Hamburgo, Alemania) a 1000 rpm, 2500 rpm, 5000 rpm y 6000 rpm, para los jugos de melón, frutilla, manzana y naranja, respectivamente. Por último los jugos se fraccionaron en frascos estériles a -18 ºC hasta su posterior utilización.

Figura 3.1. Utensilios para la preparación de jugo en cabina de seguridad biológica



3.2 Reactivos

- Extracto de levadura (Laboratorios Britania, Argentina)
- Ioduro de propidio, PI (Sigma, EEUU)
- Fluoresceína diacetato, FDA (Calbiochem, EEUU)
- Sodio fosfato dibásico anhidro (Na_2HPO_4) (Anedra, Argentina)
- Potasio fosfato monobásico anhidro (KH_2PO_4) (Biopack, Argentina)
- Cloruro de potasio (Anedra, Argentina)
- Glucosa (Britania, Argentina)
- Sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$) (Biopack, Argentina)
- Sulfato de magnesio ($MgSO_4.7H_2O$) (Biopack, Argentina)
- Cloruro de calcio ($CaCl_2.2H_2O$) (Parafarm, Argentina)
- Sulfato de manganeso ($MnSO_4.4H_20$) (Anedra, Argentina)
- Ácido málico ($C_4H_6O_4$) (Anedra, Argentina)
- Sulfato de zinc ($ZnSO_4.7H_2O$) (Biopack, Argentina)
- Cloruro de manganeso ($MnCl_2.4H_2O$) (Anedra, Argentina)
- Ácido bórico (H_3BO_3) (Biopack, Argentina)
- Cloruro de cobalto ($CoCl_2.6H_2O$) (Anedra, Argentina)
- Cloruro de cobre ($CuCl_2.2H_2O$) (Biopack, Argentina)
- Cloruro de níquel ($NiCl_2.6H_20$) (Biopack, Argentina)
- Molibdato de sodio (Na_2MoO_4) (Anedra, Argentina)

3.3 Medios de cultivo

- Agar Tripteína Soja (ATS-E) (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), composición (g/L): tripteína 15; peptona de soja 5; cloruro de sodio 5; agar 15; extracto de levadura 6; pH del medio preparado: 7,3 ± 0,2.
- Caldo Tripteína Soja (CTS-E) (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), composición (g/L): tripteína 17; peptona de soja 3; cloruro de sodio 5; fosfato dipotásico 2,5; glucosa 2,5; extracto de levadura 6; pH del medio preparado: 7,3 ± 0,2.

- Agua Peptona bufferada (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), composición (g/L): peptona 10; cloruro de sodio 5; fosfato disódico 3,5; fosfato monopotásico 1,5; pH del medio preparado: 7,2 ± 0,2.
- Agar de Recuento en Placa (APC) (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), composición (g/L): Tripteína 5; extracto de levadura 2,5; D-(+) glucosa 1; agar-agar 15; pH del medio preparado: 7,0 ± 0,2.
- Agar Extracto de Levadura-Glucosa-Cloramfenicol (YGC) (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), composición (g/L): extracto de levadura 5; D-(+) glucosa 20; cloramfenicol 0,1; agar-agar 15; pH del medio preparado: 6,6 ± 0,2.
- Caldo Sabouraud dextrosa (CSD) (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), composición (g/L): triptona 5; peptona de carne 5; glucosa 20; pH del medio preparado: 5,7 ± 0,2.
- Agar papa dextrosa (PDA) (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), composición (g/L): infusión de papa 200, glucosa, 20, agar-agar 15; pH del medio preparado: 5,6 ± 0,2.
- Agar *Alicyclobacillus acidoterrestris* (AAM), preparado con la siguiente composición (g/L): extracto de levadura 2, glucosa, 2, $(NH_4)_2SO_4$, 0,2, $MgSO_4.7H_2O$, 1, $CaCl_2.2H_2O$ 0,5, KH_2PO_4 1,2, $MnSO_4.4H_20$ 0,5, agar bacteriológico (Laboratorios Oxoid, Hampshire, Inglaterra) 30; pH del medio preparado: 4 ajustado con ácido málico.
- Caldo *Bacillus acidoterrestris* (Caldo BAM), preparado según Silva y Gibbs (2001) con la siguiente composición (g/L): $CaCl_2.7H_2O$ 0,25, $MgSO_4$ 0,5, $(NH_4)_2SO_4$ 0,2, extracto de levadura 2, glucosa 5, KH_2PO_4 3, $ZnSO_4.7H_2O$ 0,1, $MnCl_2.4H_2O$ 0,03, H_3BO_3 0,3, $CoCl_2.6H_2O$ 0,2, $CuCl_2.2H_2O$ 0,01, $NiCl_2.6H_20$ 0,02, Na_2HPO_4 0,3; pH del medio preparado:
- Agar *Bacillus acidoterrestris* (BAM), preparado según Silva y Gibbs (2001) con la siguiente composición (g/L): $CaCl_2.7H_2O$, 0,25, $MgSO_4$ 0,5, $(NH_4)_2SO_4$ 0,2, extracto de levadura 2, glucosa 5, KH_2PO_4 3, $ZnSO_4.7H_2O$ 0,1, $MnCl_2.4H_2O$ 0,03, H_3BO_3 0,3, $CoCl_2.6H_2O$ 0,2, $CuCl_2.2H_2O$ 0,01, $NiCl_2.6H_20$ 0,02, Na_2HPO_4 0,3, agar bacteriológico

(Laboratorios Oxoid, Hampshire, Inglaterra) 15; pH del medio preparado: 4.

3.4 Microorganismos

En los estudios de inactivación por LP en condiciones estancas (LP_e), se utilizaron inóculos simples de *Escherichia coli* ATCC 35218, *Listeria innocua* ATCC 33090*, Salmonella* Enteritidis MA44 y *Saccharomyces cerevisiae* KE 162. Mientras que para los estudios de inactivación por LP_e a diferentes temperaturas y para el tratamiento combinado US y LP_e ($US+LP_e$), se utilizaron inóculos de *S. cerevisiae* y esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* ATCC 49025. Por último, para los ensayos de LP en sistema continuo (LP_c) simple o en combinación con US ($US+LP_c$), se emplearon inóculos de las cepas mencionadas de *E. coli*, *L. innocua* y *S. cerevisiae.*

Para los estudios de daño celular por citometría y microscopía electrónica de transmisión (MET) se empleó, la cepa de *S. cerevisiae* KE162.

Todas las cepas fueron provistas por Medica-Tec SRL, Argentina. Las mismas se sembraron en estrías de ATS-E para *E. coli*, *L. innocua* y *S.* Enteritidis, y PDA para levaduras. Los tubos se incubaron a 37 ºC y 27 ºC, respectivamente por 24 hs, almacenándolos luego a 4 ºC para su posterior utilización. En el caso de *A. acidoterrestris*, el estriado se realizó en BAM y se incubó a 43 ºC por 48 horas previo a la esporulación.

3.5 Preparación de inóculos

Para cada experiencia, se prepararon los inóculos transfiriendo una ansada de cultivo fresco a un erlenmeyer conteniendo 20 mL de CTS-E o CSD. Los mismos se incubaron a 37 ºC o 27 ºC, respectivamente durante 24 horas, hasta alcanzar inóculos en fase estacionaria. Los mismos se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 20 mL de agua peptonada. En el caso de las esporas de *A. acidoterrestris*, el inóculo se obtuvo transfiriendo una ansada de cultivo fresco a un erlenmeyer conteniendo 20 mL caldo BAM y posterior incubación a 43 ºC por 24 h.

Para obtener esporas de *A. acidoterrestris*, se sembró con ansa el inóculo en botellas tipo Schott, conteniendo agar AAM y se lo incubó durante una semana a 43 ± 1 °C. La remoción de las esporas de las botellas, se realizó agregando 15 mL de agua estéril, y con rastrillo de vidrio de raspó cuidadosamente la superficie del agar. Todo el material celular desprendido se recogió en tubos falcon y se centrifugó a 2500 rpm durante 15 min a 4 ± 1 °C. El pellet resultante se resuspendió en solución de agua-etanol 50 % v/v con el fin de eliminar las células vegetativas y se incubó entre 30-60 min. Se volvió a centrifugar y se resuspendió el pellet en agua destilada. Se repitió el ciclo tres veces más y finalmente el material celular se resuspendió en agua destilada. Se almacenaron las esporas en tubos eppendorf a -18 °C hasta su posterior utilización (Silva y Gibbs, 2001).

3.6 Caracterización de los jugos

El pH de los jugos se determinó utilizando un pHmetro PerpHect pH/ISE modelo 310 (Orion Research Inc., Beverly, EEUU). Por otra parte, la concentración de sólidos solubles (°Brix) se midió utilizando un refractómetro PR-101 Palette (ATAGO Co. LTD, Japón). La turbidez de los sistemas se determinó mediante un turbidímetro (LaMotte, Maryland, EEUU) usando un patrón de formazina (100 NTU). El espectro de absorbancia de los jugos se midió en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso entre 200-1100 nm empleando un espectofotómetro UV-visible (Jasco V-630, Tokio, Japón) con el fin de determinar la transparencia de los jugos a la luz UV. Para ello, se midieron diluciones al 0,5 % $^{V}/_{V}$ de cada muestra. Las mediciones se tomaron por triplicado. Para estos estudios, se empelaron muestras de jugo sin inocular.

Se determinó el tamaño de partícula en el rango de 0,6 nm–6 µm por dispersión dinámica de luz (DDL) a 20 °C (Zetasizer Nano-Zs; Malvern, Worcestershire, UK) provisto de un láser de He-Ne (633 nm) y un correlacionador digital (Modelo ZEN3600). Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado y a un ángulo de dispersión fijo de 173 grados. En DDL, la muestra es iluminada con un rayo láser y la intensidad de la luz dispersada es dependiente del tamaño de partícula debido a las fluctuaciones en la

intensidad. La relación entre el tamaño de partícula y el coeficiente de difusión se define por la ecuación de Stokes–Einstein ($d(H)=(k.T)/(3.\pi.\eta.D)$) (Malvern Instruments, 2004), donde, $d(H)$: diámetro hidrodinámico (m); D: coeficiente de difusión traslacional ($m^2\ s^{-1}$); k: constante de Boltzmann ($1.38 \times 10^{-23}\ N\ m\ K^{-1}$); T: temperatura absoulta (K); η: viscosidad del solvente ($N\ s\ m^{-2}$).

La distribución de intensidad en tamaño se convirtió, usando la teoría de Mie (Malvern Instruments, 2004), en una distribución en volumen. El tamaño de partícula en el rango de 0,1 a 1000 µm se determinó por triplicado mediante dispersión estática de luz (DEL) en un equipo Mastersizer 2000 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido) equipado con una unidad de dispersión Hydro 2000MU (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). La velocidad de la bomba se seteó a 1800 rpm.

Para ambos rangos de medición, se empleó un valor de índice de refracción de los jugos de 1,35 y absortividad igual a 0,1.

Se realizó un análisis de la varianza multivariado (MANOVA) con el objeto de detectar diferencias en la absorbancia a 254 nm, la turbidez y el tamaño de partícula entre los distintos jugos empleados. En caso de detectar diferencias significativas, se aplicó el test de Hotelling corregido por Bonferroni.

3.7 Estudios de inactivación

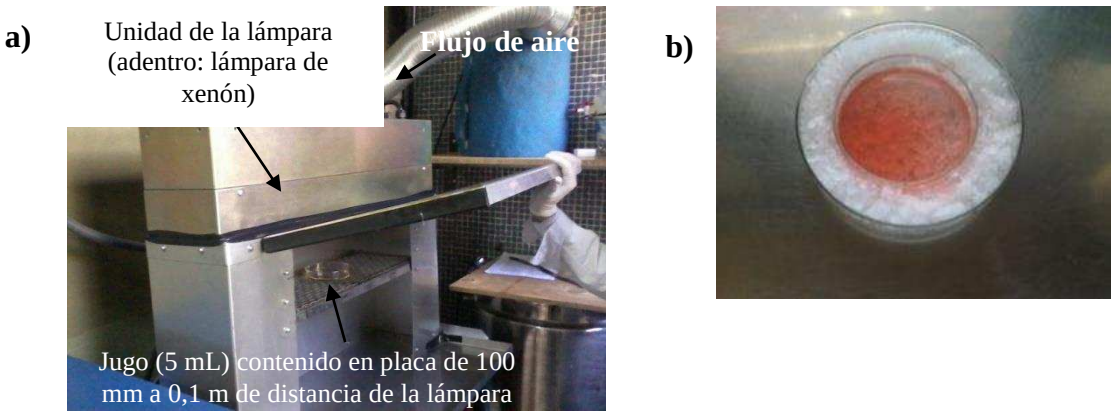
3.7.1 Tratamiento LP en sistema estanco

3.7.1.1 Descripción del equipo

Los tratamientos por LP se llevaron a cabo en un sistema RS-3000B Steripulse-XL (**Figura 3.2**) (Xenon Corporation, Woburn, MA, EEUU), que produce una radiación policromática en un rango de 200 a 1100 nm. El sistema consistió de un módulo controlador RC-747, una cámara de tratamiento que aloja una lámpara de xenón (no tóxica y libre de mercurio) y un sistema de refrigeración anexado a dicha lámpara que evita el sobrecalentamiento durante la operación. El sistema generó pulsos de luz de alta intensidad con una velocidad de 3 pulsos de 360 µs de duración por

segundo. Cada pulso entregó 1,27 J/cm^2 con una entrada de 3800 V a 1,9 cm de la lámpara.

Figura 3.2. a) Equipo de LP_e utilizado, b) Placa de 100 mm Petri conteniendo jugo frutal dentro de placa de 150 mm conteniendo hielo en escamas a modo de obtener una T_{LPf} de 12 ± 1 ℃.



3.7.1.2 Estudios de reto microbiano

Se añadieron 100 µL de inóculo (ver **Materiales y Métodos, apartado 3.5**) a 4,9 mL de jugos comerciales de manzana y naranja o naturales exprimidos de manzana, naranja, frutilla y melón, dentro de una placa de Petri de modo que la superficie de la misma quedase completamente cubierta y con un espesor de 1 x 10^{-3} m. La placa se alineó respecto a la lámpara a una distancia de 0,1 m como se muestra en la **Figura 3.2a**. Esta distancia fue elegida basándose en estudios preliminares (Gómez y col., 2011) dado que esta condición reunió las características de lograr un producto microbiológicamente estable y al mismo tiempo mantener características de calidad similares al producto fresco. Para evitar incrementos significativos en la temperatura del sistema, la muestra de jugo contenida en una placa de Petri de 100 mm se colocó en una placa de mayores dimensiones (150 mm) cubierta con hielo en escamas como muestra la **Figura 3.2b**. Consecuentemente, la temperatura del jugo disminuyó 2-3 ± 1 ℃, alcanzando una temperatura final (T_{LPf}) de 12 ± 1 ℃ luego del tratamiento con LP_e. Las muestras se trataron entre 0 y 60 s (0 a 71,64 J/cm^2)

Las experiencias se realizaron por triplicado para cada condición ensayada. En la **Figura 3.3** se muestra un esquema del procesamiento por LP_e. Las medidas de fluencia se llevaron a cabo con una cabeza piroeléctrica modelo ED500 (Gentec Electro-Optics, Québec, Canadá) conectada a un osciloscopio modelo TDS 2014 (Tektronix, Beaverton, EEUU), con una apertura de cubierta de 20,3 cm^2. La temperatura se monitoreó durante la irradiación empleando una termocupla tipo T conectada a un registrador de datos Digi-Sense model 69202-30 (Barnant Company Division, Barrington, EEUU). Las muestras inoculadas no tratadas fueron usadas como control.

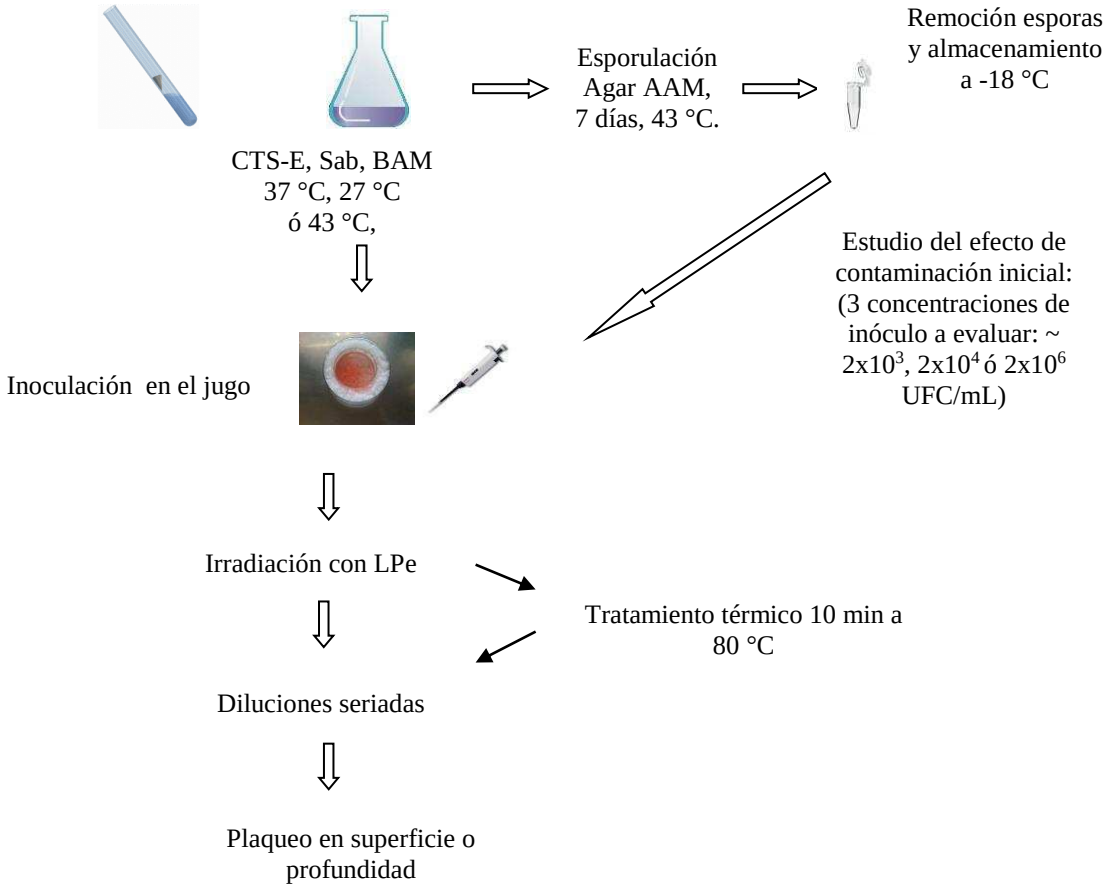
3.7.1.2.1 Efecto de la contaminación inicial de jugo de manzana en la efectividad del proceso

Con el objeto de evaluar la influencia de la contaminación inicial de los jugos en la efectividad del tratamiento por LP_e, se seleccionó la cepa de *A. acidoterrestris* por ser un microorganismo deteriorativo de jugos resistente a los tratamiento térmicos tradicionales. Se inoculó jugo de manzana comercial Tropicana con tres concentraciones iniciales diferentes de esporas de *A. acidoterrestris* (~ $2x10^3$, $2x10^4$ o $2x10^6$ UFC/mL) y se las trató según la metodología descripta en **Materiales y Métodos, sección 3.7.1.2** (**Figura 3.3**)**.**

3.7.2 Tratamiento de ultrasonido de alta intensidad

En el caso de la aplicación de US simple o la combinación con LP_e, el tratamiento ultrasónico se llevó a cabo en un recipiente doble camisa de 150 mL de capacidad (diámetro 6,3 cm; altura 7,6 cm) conectado a un baño termostático (HAAKE, modelo Rotovisco, RV12, Alemania), para alcanzar una temperatura (T_{US}) de 20, 30 o 44 ± 1 °C en el vaso, como se muestra en la **Figura 3.4**. Se colocaron noventa y cinco (95) mL de jugo de manzana comercial o natural exprimido en el vaso y se inició el proceso de sonicación.

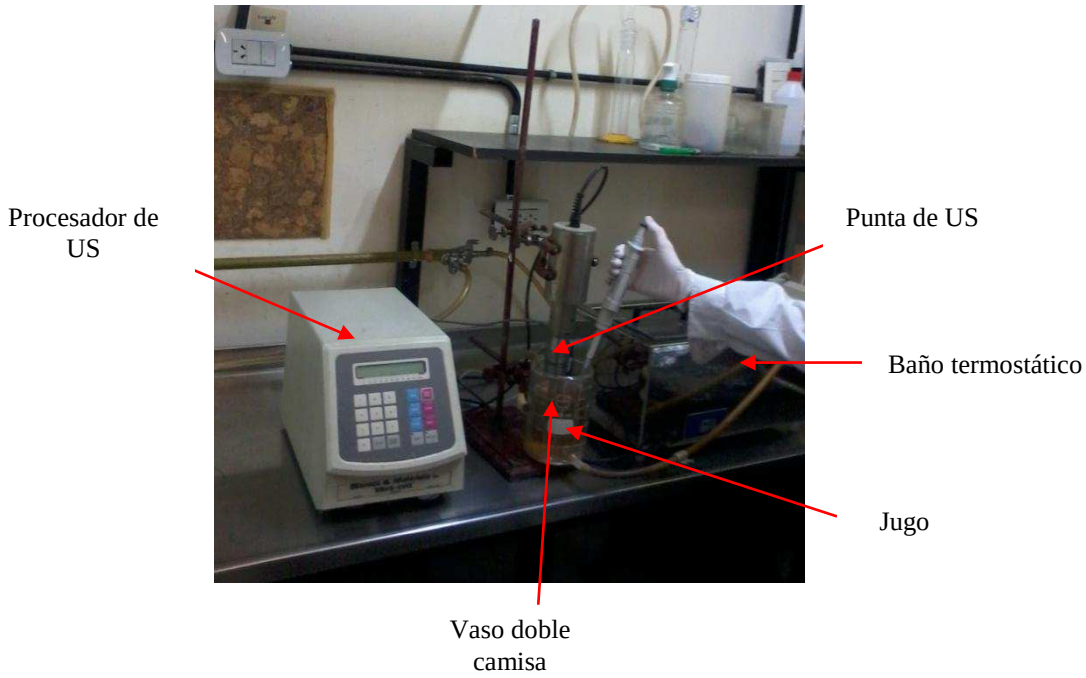
Figura 3.3 Esquema de las muestras procesadas con LP_e



Mientras que, para la combinación de US con LP_c, el tratamiento ultrasónico se llevó a cabo en un recipiente doble camisa de 600 mL de capacidad (diámetro interno 8 cm; altura 13 cm) y una temperatura (T_{US}) de 30 ± 1 °C. En cada experiencia, se colocaron 245 mL de jugo de manzana comercial o natural exprimido en el vaso y se luego se procedió a aplicar el US. En ambos casos, La temperatura del sistema aumentó debido a la cavitación, estabilizándose luego de aproximadamente 3 min, para luego mantenerse constante a lo largo de toda la experiencia, gracias a la recirculación de agua del baño termostático. A continuación, se añadieron 5 mL del inóculo (~ $2x10^6$ UFC/mL para levaduras o esporas), preparado según **Materiales y Métodos, apartado 3.5**. Debido al burbujeo generado por el proceso de cavitación, los sistemas siempre se mantuvieron agitados desde el comienzo de cada experiencia. Para los estudios cinéticos, 1 mL de muestra se tomaba a intervalos regulares de tiempo hasta los 10 o 30 min de tratamiento. Los tubos de dilución con agua peptonada permanecieron refrigerados hasta la posterior determinación de

microorganismos sobrevivientes. La temperatura de las muestras se monitoreó continuamente mediante una termocupla anexada al equipo de US. Las muestras inoculadas no tratadas fueron usadas como control. Las experiencias se evaluaron por triplicado para cada condición ensayada

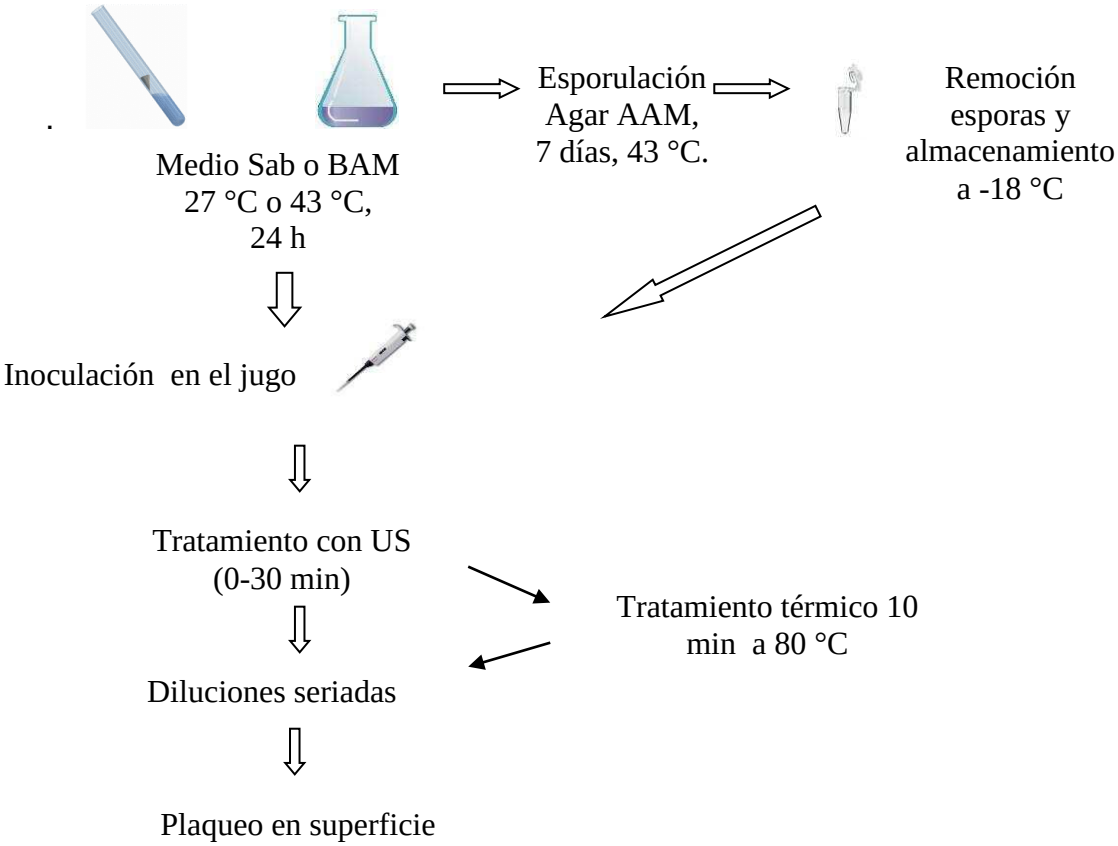
Figura 3.4 Equipo de US utilizado para la aplicación de los tratamientos.



El ultrasonido de alta intensidad y baja frecuencia (20 kHz, 600 watts, 95,2 μm (80 %) de amplitud de onda) (Vibracell®, Sonic Materials Inc., Chicago) se aplicó al medio a través de una punta de prueba de titanio de 13 mm de diámetro inmersa en el medio a una altura prefijada por investigaciones anteriores (Guerrero y col., 2001 y 2005). El equipo poseía una compensación automática de la amplitud para asegurar una medición uniforme de la misma al margen de las fluctuaciones del voltaje. La punta de prueba o sonda fue calibrada previamente siguiendo los pasos sugeridos por el proveedor del equipo.

En la **Figura 3.5** se muestra un esquema del procedimiento empleado para la aplicación del US. Los sistemas fueron sonicados durante 10 o 30 minutos e inmediatamente procesados por LP_e (US+LP_e) o no (US simple); o tratados durante 30 minutos seguidos de la irradiación con LP_c (US+LP_c).

Figura 3.5. Esquema del procesamiento de las muestras tratadas con US.



3.7.3 Estudios de reto microbiano en tratamiento LP_e en combinación con temperatura moderada

Se añadieron 100 µL de inóculo (preparados según lo explicado en **Materiales y Métodos, sección 3.5**) a 4,9 mL de jugo comercial de manzana y naranja, o natural exprimido de manzana, naranja, frutilla y melón dentro de una placa de Petri de modo que la superficie de la placa quedase completamente cubierta con muestra y con un espesor de 1 x 10^{-3} m. Se seleccionaron tres valores de temperatura inicial de los jugos (T_{LPi}): 2, 30 o 44 ± 1 ℃, de modo de obtener diferentes perfiles térmicos durante el procesamiento por LP. La placa se alineó respecto a la lámpara a una distancia de 0,1 m como se muestra en la **Figura 3.2a**. Se irradió entre 0 y 60 s (0 a 71,64 J/cm^2) a tres temperaturas finales (T_{LPf}) generadas debido al procesamiento por LP, cuyos valores finales dependieron de la matriz empleada. Para poder procesar el jugo por LP a la menor temperatura, la placa de Petri de 100 mm conteniendo la muestra se colocó en una placa de 150 mm

cubierta con hielo en escamas, tal como se describió en **Materiales y Métodos, apartado 3.7.1.2.** Las muestras inoculadas no tratadas fueron usadas como control. Las experiencias se evaluaron por triplicado para cada condición ensayada. En la **Figura 3.6** se detalla un esquema del procesamiento de la combinación de LP_e con temperaturas moderadas.

Las medidas de fluencia y los perfiles de temperatura se obtuvieron como se detalló en **Materiales y Métodos, apartado 3.7.1.3.**

3.7.4 Estudios de reto microbiano en tratamiento LP_e con pretratamiento US

Cinco (5) mL de jugo sonicado durante 10 o 30 min tal como se describió en **Materiales y Métodos, sección 3.7.2**, se sometió a tratamiento por LP_e durante tiempos comprendidos entre 2 y 60 s LP (T_{LPi}: 2 ± 1 °C, 30 ± 1 °C o 44 ± 1 °C) bajo las condiciones detalladas en **Materiales y Métodos, apartado 3.7.3.** Las experiencias se evaluaron por triplicado para cada condición ensayada. En la **Figura 3.7** se muestra un esquema del protocolo seguido para la aplicación de la combinación US+LP_e y temperaturas moderadas.

Se aplicó un ANOVA (**Apéndice, apartado 6.2**) de dos factores para evaluar la influencia del tiempo de tratamiento (US, LP_e y US+LP) y la temperatura. El nivel de significación se fijó a $p< 0,05$. Se verificaron los supuestos de homocedasticidad y normalidad. Se evaluaron los contrastes de interacción mediante el Test de Tukey. En la **Figura 3.7** se detalla un esquema del procesamiento de la combinación de LP_e con temperaturas moderadas y US.

Figura 3.6. Esquema del procesamiento del jugo con LP_e en combinación con temperatura moderada

Esporulación
Agar AAM,
7 días, 43 °C.

Remoción esporas
y almacenamiento
a -18 °C

Día 1

Medio Sab o BAM
27 °C o 43 °C,
24 h

Día 2
Incubación de jugo en refrigeración o baño termostático a T_{LPi} 2, 30 o 44 °C

Inoculación en el jugo

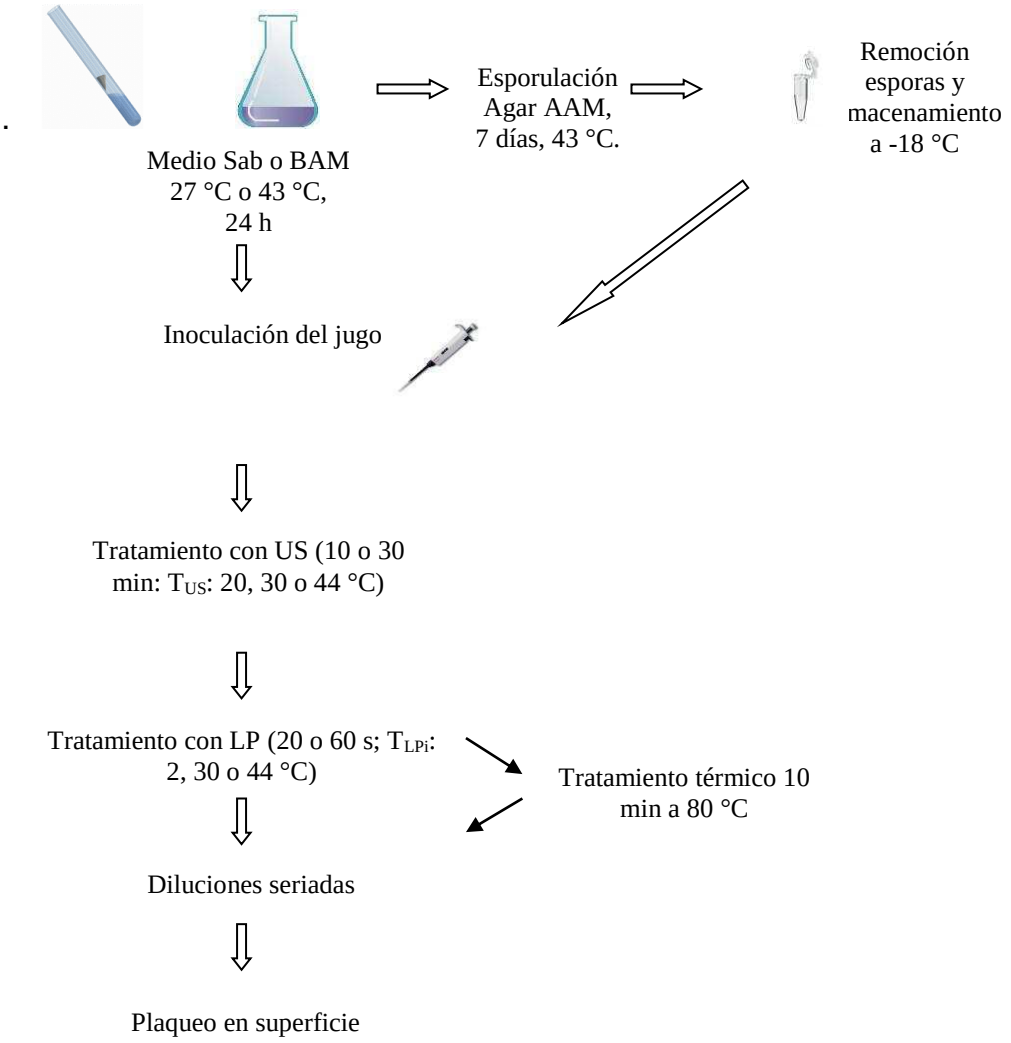
Tratamiento con LP (20 ó 60 s)

Tratamiento térmico 10 min a 80 °C

Diluciones seriadas

Plaqueo en superficie

Figura 3.7. Esquema del procesamiento del jugo con US+LP_e en combinación con temperatura moderada



3.7.5 LP en flujo continuo (LP_c)

Los tratamientos LP_c se llevaron a cabo en un equipo RS-3000B Steripulse-XL (Xenon Corporation, Wilmington, MA, EEUU) como el descripto en **Materiales y Métodos, apartado 3.7.1.2**, pero con algunas modificaciones para lograr un procesamiento continuo del jugo. En cada experiencia el jugo frutal (250 mL) se recirculó a 155 mL/min empleando una bomba peristáltica (CPX-400, Cole Parmer, Illinois, EE.UU.) por un sistema diseñado para tal fin el cual consistió de dos tubos de cuarzo transparentes a la luz (d.i. 0,001 m) localizados a 0,1 m de la lámpara (y ubicados en la zona donde la dosis emitida por la lámpara es constante) y conectados en serie por mangueras

flexibles autoclavables (Cole-Parmer, Masterflex, L/S 15, Illinois, EEUU) que descargaban a un vaso de 400 mL de capacidad. El vaso se colocó en un baño de hielo, mientras que los dos tubos de cuarzo (con una longitud total de exposición a la LP de 0,20 m cada una y cubiertas con papel aluminio en las zonas de no exposición) estaban insertos en un sistema de enfriamiento constituido por una unidad de aluminio sellada por la cual circulaba un refrigerante (etilenglicol, calidad industrial) para evitar incrementos en la temperatura del sistema debido al tratamiento con LP (**Figuras 3.8 y 3.9**). Las diferentes dosis de LP se obtuvieron alterando el número de pulsos aplicados (Gómez y col., 2011). Las experiencias se llevaron a cabo por triplicado.

Para cada tratamiento, 250 mL de jugo inoculado previamente sonicado o no, fue expuesto al tratamiento por LP_c (10 min, 0,15 J/cm^2). Como control, se emplearon muestras inoculadas sin tratamiento con LP_c. Las mediciones de temperatura del sistema en el tiempo y fluencia se realizaron tal como se describió en **Materiales y Métodos, apartado 3.7.1.3.**

Previo al uso del dispositivo de LP_c, la unidad fue completamente enjuagada con agua destilada estéril, mientras que una vez finalizados los tratamientos, se realizaba un lavado con una solución de hipoclorito de sodio al 5 %v/v durante 10 minutos, y un posterior pasaje de agua destilada.

Figura 3.8. Equipo de luz pulsada en sistema continuo para el procesamiento de jugo (a). Detalle de la cámara de esterilización (b). Detalle de los tubos de cuarzo (c).

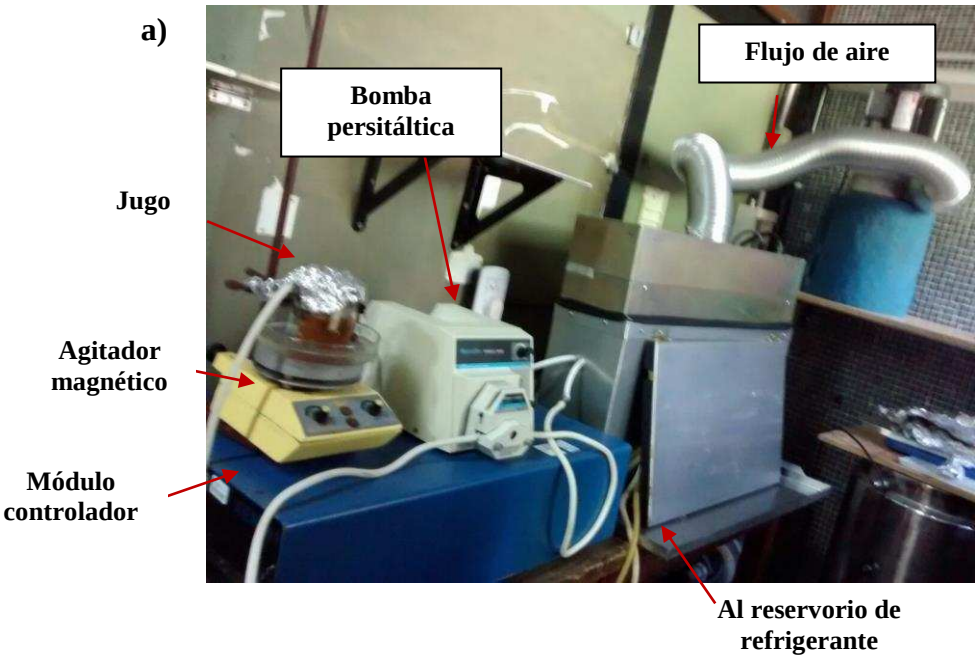
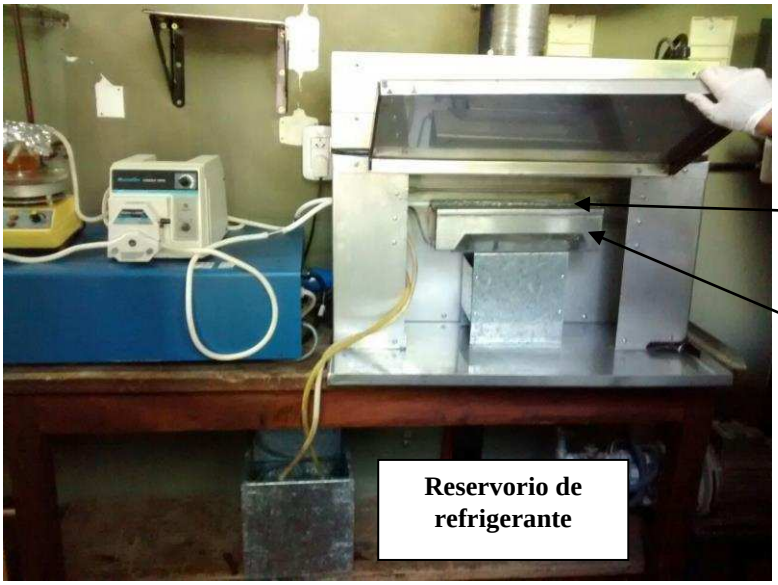


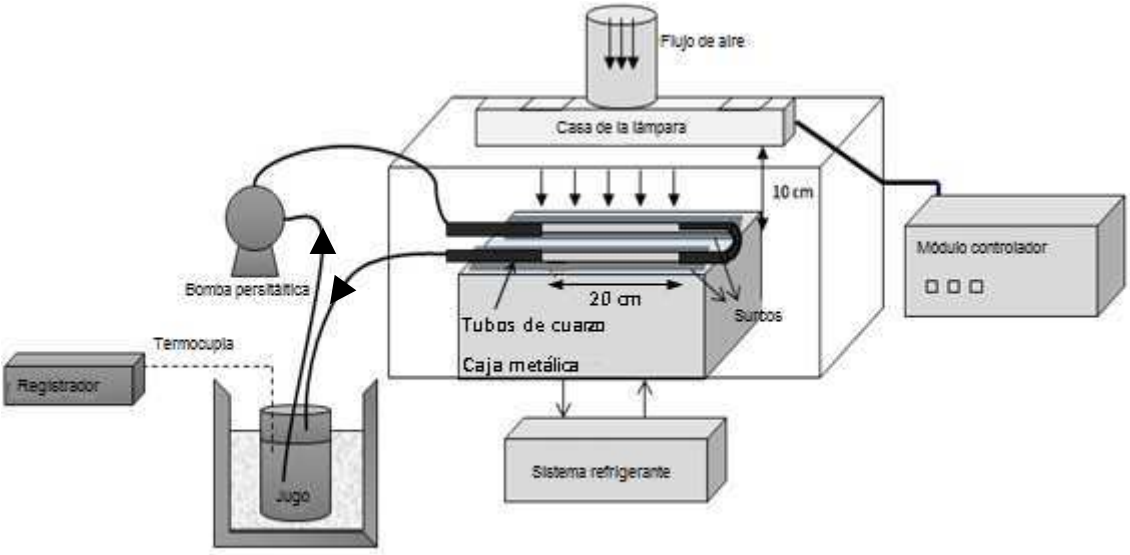
Figura 3.8. ***Continuación…***

b)



c)

Figura 3.9. Esquema del equipo de LP_c. La zona blanca señalizada en los tubos de cuarzo corresponde a la región expuesta a LP_c



3.7.5.2 Caracterización del procesamiento LP_c

Para las experiencias de LP en sistema continuo se utilizó como matriz de tratamiento jugo de manzana (ver **Materiales y Métodos, Apartado 3.1**). La velocidad media del flujo se calculó según la siguiente ecuación:

$$\upsilon = Fv/A \qquad (3.1)$$

Donde Fv el caudal de alimentación (*Fv* = 155 mL/min= 0,000155 m^3/min) y A, el área anular del reactor (m^2) calculado a partir de la **ecuación 3.2**:

$$A= \pi/4^* D_{ex}^2 - \pi/4^* D_{int}^2 \qquad (3.2)$$

igual a 0,00001178 m^2, siendo el diámetro externo (D_{ex})= 0,004 m y el interno (D_{int})= 0,001 m. Se calculó el número de Reynolds correspondiente para el jugo de manzana según:

$$\mathrm{Re} = \frac{\rho \upsilon D}{\mu} \qquad (3.3)$$

a partir de las propiedades físicas del jugo de manzana a 28 °C: ρ= densidad (1040 Kg/m^3) y μ=viscosidad (1,1 mPa.s) (Alvarado,1993) y de las variables de proceso, velocidad media del flujo (υ=0,093 m/s) y diámetro equivalente D_e = 0,015 m. El D_e fue obtenido a partir de la **ecuación 3.4**:

$$D_e= (D_e^2-D_o^2)/D_o= 0,15 \text{ m} \qquad (3.4)$$

El **valor de Reynolds** obtenido empleando la **ecuación 3.3** correspondió a 220 para el jugo de manzana.

El tiempo de residencia (τ) dentro de la cámara de irradiación del jugo correspondió a:

$$\tau = \frac{V_R}{Fv} = 0,02 \min = 0,12 s \qquad (3.5)$$

siendo V_R= volumen del reactor calculado a partir de la **ecuación 3.6.**

$$V_R = \pi * r^{2} * L = 0{,}000000314\ m^3 \qquad (3.6)$$

donde, r es el radio de los tubos y L la longitud total.

El número de pulsos (NP) recibidos por la muestra fue calculado según (Pataro y col., 2011):

$$NP = \tau \text{ x frecuencia pulsos} = 0{,}12\ s.\ 3\ Hz = 0{,}36 \qquad (3.7)$$

Y la dosis correspondiente al tiempo en que el jugo tardó en completar una pasada al sistema:

$$Dosis_{pasada} = \text{dosis/pulso x n° de pulsos} = 0{,}398 \times 0{,}36 = 0{,}14\ J/cm^2 \qquad (3.8)$$

Tomando en consideración de que el jugo tarda 2 minutos en completar uma pasada por el sistema; luego de 10 min de procesamiento, la dosis correspondió a :

$$Dosis = 0{,}14\ J/cm^2 \times 5 = 0{,}7\ J/cm^2 \qquad (3.9)$$

La energía específica total se obtuvo multiplicando La dosis por la relación entre el área y el volumen del reactor:

$$\text{Energía específica total} = 0{,}7\ J/cm^2 \times 0{,}00785\ cm^2 / 0{,}314\ mL \qquad (3.10)$$

En la **Tabla 3.1** se resumen las condiciones de LP_c empleadas.

3.8 Estimación de Energía eléctrica por orden

La energía eléctrica por orden (E_{EO}) es una figura de mérito que fue sugerida por Bolton y col. (2001) para comparar la eficiencia de procesos que involucran energía eléctrica. La misma es definida como la energía eléctrica en kilowatts hora (KWh) necesaria para degradar en un orden un contaminante *C*

Tabla 3.1. Condiciones del procesamiento de LP_c utilizadas

Condiciones LP_c	
Dosis por pulso [1]	0,398
Flujo	155 mL/min
t_r [2]	0,12 s
Frecuencia de los pulsos	3 Hz
Amplitud del pulso	360 µs
N° Reynolds	220
n [3]	1,8
Tiempo de tratamiento	10 min
Fluencia LP_c [4]	0,73 J/cm^2
Energía específica total de entrada	0,0175 J/mL
Número de ciclos	5
E_{EO}	1,8x10^3-4,1x10^3 kW.h/m^3/orden

[1] dosis correspondiente a 10 cm de la lámpara. [2] Tiempo de residencia teórico calculado a partir del volumen de los tubos de cuarzo (0,314 mL) y el flujo. [3] Número de pulsos calculado como el producto entre t_r, frecuencia de los pulsos (3 Hz) y el número de ciclos. [4] fluencia LP_c calculada como el producto entre la dosis por pulso y n.

en una unidad de volumen de medio contaminado. Bolton y col. (2001) ha sugerido 2 ecuaciones según se considere operaciones batch (**ecuación 3.11a**) o continuas (**ecuación 3.11b**):

$$E_{EO} = \frac{P*t*1000}{V*\log(\frac{Co}{C})} \qquad (3.11a)$$

$$E_{EO} = \frac{P}{F*\log(\frac{Co}{C})} \qquad (3.11b)$$

donde, *P* es la potencia de entrada (kW); *t*, el tiempo de tratamiento; *V*, el volumen de muestra a procesar en m^3; *F* es el caudal en m^3/h, y *Co* y *C*, las

concentraciones inicial y final de los microorganismos. Este parámetro fue estimado para los procesamientos LP_e, LP_c y US

3.9 Enumeración de la población sobreviviente

Para la enumeración de la fracción sobreviviente, se tomaron alícuotas de los sistemas tratados por LP y se diluyeron, en caso de ser necesario, en tubos de agua peptonada (0,1 % p/v). Se sembraron por duplicado en superficie con un plaqueador orbital (Autoplate 4000, Spiral Biotech, EEUU), en medios ATS-E o PDA y se incubaron a 37 °C o 27 °C para bacterias y levaduras, respectivamente, durante 24 o 48 h. En el caso de las esporas *A. acidoterrestris*, las mismas fueron sometidas a calentamiento a 80 ± 1 °C durante 10 min en un baño termostático, a modo de estimular la germinación de las esporas e inactivar las células vegetativas (Vercammen y col., 2012; Djas y col., 2011; Podolak y col., 2009). Posteriormente, diluciones apropiadas fueron sembradas en agar BAM e incubadas a 43 ºC durante 72 h (Silva y Gibbs, 2001).

La técnica de siembra en profundidad se utilizó en el caso de que los recuentos resultantes fueran bajos. El recuento de colonias se realizó con una grilla provista con el equipo en el caso de la siembra en superficie, y con un contador automático (COMECTA S.A., Barcelona, España) para la siembra en profundidad.

3.10 Representación gráfica de las curvas de supervivencia

Las curvas de supervivencia se generaron a partir de los datos experimentales, graficando la fracción sobreviviente como Log N/N_o (donde N es el número de UFC/mL a un tiempo dado y N_o el número inicial de UFC/mL) versus el tiempo de tratamiento (t). Adicionalmente, se obtuvo la dosis de reducción decimal (D_{10}) de la pendiente de la zona lineal de las curvas de inactivación graficadas como Log N/N_o versus la fluencia, a modo de comparar la sensibilidad de los distintos microorganismos evaluados a los tratamientos aplicados (Koutchma y Parisi, 2004).

3.11 Modelado matemático

Uno de los modelos para estudiar la cinética de inactivación de los diferentes microorganismos por LP fue el modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull (Peleg y col., 1998):

$$S(t) = log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -b.t^n \qquad (3.12)$$

donde S es la fracción de supervivientes; b y n son los parámetros de escala y de forma, respectivamente. Los valores de b y n luego fueron usados para generar las curvas de frecuencia de resistencias utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{d\phi}{dt_c} = b.n.t_c^{n-1}exp(-b.t_c^n) \qquad (3.13)$$

donde t_c es una medida de la resistencia o sensibilidad del microorganismo al tratamiento aplicado y $\frac{d\phi}{dt_c}$ es la distribución de tipo Weibull correspondiente a t_c,

Asimismo, se calcularon otros parámetros estadísticos de la distribución (moda, media, varianza, y coeficiente de sesgo) (Peleg y col., 1998) a partir de las siguientes ecuaciones:

$$t_{cm} = [(n-1)/nb]^{1/n} \qquad (3.14)$$

$$t_c = \{\Gamma[(n+1)/n]/b^{1/n}\} \qquad (3.15)$$

$$\sigma_{tc}^2 = \{\Gamma[(n+2)/n] - (\Gamma[(n+1)/n])^2\}/b^{2/n} \qquad (3.16)$$

$$\upsilon_1 = \frac{[\Gamma(n+3/n)/b^{3/n}]}{[\Gamma(n+2/n)/b^{2/n}]^{3/2}} \qquad (3.17)$$

donde Γ es la función gamma, La distribución moda, t_{cm}, representa el tiempo de tratamiento donde la mayoría de la población muere o es inactivada, es decir a la frecuencia máxima, La media, t_c , corresponde al tiempo medio de los

distintos tiempos de inactivación con su varianza, σ_{tc}^2. El coeficiente de sesgo, υ_1, representa el sesgo de la distribución y está relacionado con los miembros más resistentes de la población microbiana.

Las curvas de inactivación fueron también ajustadas por el modelo bifásico propuesto por Cerf (1977):

$$log_{10}(N)=log_{10}(No) + log_{10}(f * e^{-kmax_1 * t} + (1-f) * e^{-kmax_2 * t}) \quad (3.18)$$

donde, α es la proporción logarítmica entre la fracción de la población sensible *f* y la resistente (1-*f*); y k_{max1} y k_{max2} son las tasas de inactivación de las dos subpoblaciones respectivamente.

Una versión de 4 parámetros del modelo propuesto por Coroller y col. (2006) basado en dos distribuciones Weibullianas mixtas de resistencias bacterianas fue también aplicado:

$$log_{10}\left(\frac{N}{No}\right)=\frac{1}{1+10^{\alpha}}\left(10^{-\left(\frac{t}{\delta 1}\right)^p+\alpha} + 10^{-\left(\frac{t}{\delta 2}\right)^p}\right) \quad (3.19)$$

donde *p* es el parámetro de forma, *α* es la proporción logarítmica entre la fracción sensible *(f)* y la resistente (1-*f*), δ_1 y δ_2 son los tiempos para la primera reducción decimal de la subpoblación 1 y la subpoblación 2, respectivamente. Todos los parámetros del modelo se calcularon aplicando el procedimiento de regresión no lineal de Infostat 2009 (InfoStat Group, FCA-UNC, Córdoba, Argentina).

La validación interna de los modelos matemáticos utilizados se realizó calculando y analizando los siguientes parámetros estadísticos: la raíz cuadrada de los cuadrados medios del error (RMSE) (Alzamora y col., 2005a); el criterio de Akaike (AIC) (Akaike, 1973), el criterio Bayesiano Schwarz (BIC) (Quinn y Keough, 2002) y el coeficiente de determinación ajustado por los grados de libertad del modelo (R^2_{aj}). Las ecuaciones correspondientes se encuentran en el **Apéndice, apartado 6.3**.

Se aplicó un análisis de componentes principales (PCA, detallado en el **Apéndice**, **apartado 6.2.2**) a modo de ilustrar las relaciones entre los sistemas

tratados con LP y la absorbancia a 254 nm (A_{254nm}), la turbidez y las reducciones logarítmicas alcanzadas. Asimismo, se realizó un PCA para ilustrar las relaciones entre la concentración de esporas inicial y los parámetros obtenidos de los modelos. El coeficiente de correlación cofenética (*CCC*) se obtuvo como una medida de fidelidad de cuánto conserva el análisis las distancias euclideas originales entre los datos. Un adecuado análisis de PCA se corresponde con valores de *CCC* cercanos a 1,0.

3.11.1 Modelado matemático del estudio de la influencia de la contaminación inicial en la efectividad del tratamiento por LP_e

Con el propósito de estudiar el efecto de la contaminación inicial en la efectividad del procesamiento por LP_e, se evaluó la cinética de inactivación de esporas de *A. acidoterrestris* por LP_e en jugo de manzana comercial Tropicana utilizando distintas concentraciones de inóculo inicial, tal como se describió en **Materiales y Métodos, sección 3.7.1.2.1**. para ello, se aplicó el modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull y el modelo bifásico a los datos experimentales aplicando las **ecuaciones 3.12** y **3.18**, respectivamente de **Materiales y Métodos, sección 3.10**. Asimismo, se generaron las distribuciones de frecuencias de resistencias aplicando las **ecuaciones 3.13 a 3.17**.

Por otra parte, se aplicó un PCA a modo ilustrar la relación entre el tamaño de inóculo y los parámetros de los modelos de Weibull y bifásico.

Se estimó mediante regresión múltiple la ecuación de segundo orden que relaciona al tiempo de tratamiento (t) por LP_e con las reducciones logarítmicas de *A. acidoterrestris* alcanzadas (Log N/N_o) y la concentración inicial de inóculo en el jugo de manzana comercial Tropicana (C) mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR, detallado en el apéndice), utilizando el programa Statgraphics Plus para Windows 5.1® (Statistical Graphics Corp., Washington, EEUU).

3.12 Dinámica del crecimiento de poblaciones microbianas sobrevivientes durante el almacenamiento en refrigeración de jugos frutales tratados con LP_e.

3.12.1 Evolución de los microorganismos inoculados y tratados con LP_e y US+LP_e.

Para el caso de los sistemas tratados o no con LP_e (60 s; T_{LPi}: 2 ± 1 °C), según lo explicado en **Materiales y Métodos, apartado 3.7.1.2**, se analizó la evolución de la carga microbiana sobreviviente de *E. coli*, *S*. Enteritidis, *L. innocua* y *S. cerevisiae* inoculados en jugos comerciales de manzana y naranja, y en jugos naturales exprimidos de manzana, naranja, melón y frutilla durante el almacenamiento refrigerado (5 °C). Mientras que para los sistemas tratados o no (control) con US+LP_e (**Materiales y Métodos, apartado 3.7.4**), se estudió la evolución de *S. cerevisiae* y las esporas de *A. acidoterrestris* en el jugo comercial de manzana durante el almacenamiento refrigerado (5 °C). Las muestras fueron volcadas en frascos estériles de 10 mL de capacidad color caramelo y fueron inmediatamente almacenadas a 5 ± 1 ºC en oscuridad por 12 días. A cada tiempo de muestreo (cada 24-72 h), se realizó el recuento de microorganismos (por duplicado de muestra y triplicado de cada sistema) para las muestras control y tratadas. Cuando los tratamientos resultaron en un bajo recuento (menor a 10^3 UFC/mL), se plaquearon hasta 3-mL de jugo en profundidad. Los resultados se expresaron como log N/N_0 en función del tiempo de almacenamiento. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Se realizó un ANOVA de dos factores a modo de evaluar la influencia del jugo y la cepa la inactivación observada luego de 12 días de almacenamiento refrigerado. Se aplicó el Test de Tukey en el caso de hallar diferencias significativas.

.

3.12.2 Evolución de la flora nativa

Se estudió la evolución de la flora nativa de los jugos naturales exprimidos de manzana, naranja, melón y frutilla sometidos a 60 s de LP_e (T_{LPi}: 2 ± 1 °C)

durante el almacenamiento refrigerado. Por otra parte, se estudió la evolución de la flora nativa del jugo de manzana exprimido tratado mediante el procesamiento combinado US+LP_c. Para ello, se obtuvieron los jugos como se explicó en **Materiales y métodos, apartado 3.1**, pero con la variante de que el procedimiento se llevó a cabo en un ambiente no estéril y los utensilios utilizados no fueron sanitizados previamente. Asimismo, los jugos de manzana y naranja fueron tratados luego de 12 h de su obtención, de modo de promover el nivel de la microflora presente. Cuatro muestras independientes tratadas según la **Materiales y Métodos, apartado 3.7.1.2** fueron almacenadas en frascos de 20 mL color caramelo a 5 ± 1 °C por 10 días. Los ensayos se realizaron por duplicado y se analizaron dos replicados de cada condición. A intervalos de tiempos regulares (48-72 h) se analizó el recuento de:

- Microorganismos mesófilos aerobios: plaqueo en Agar APC e incubación a 37 °C por 72 h.
- Hongos y levaduras, plaqueo en Agar YGC e incubación a 25 °C durante 5 días.

Los resultados se graficaron como log N en función del tiempo de almacenamiento.

3.13 Evaluación del color en el almacenamiento

Con el objeto de determinar el efecto de los tratamientos de preservación sobre los jugos y los cambios deteriorativos que pudieran ocurrir durante el almacenamiento, se estudió la evolución del color del jugo de manzana comercial y natural control (sin tratamiento alguno), de las muestras procesadas por LP_c simple (10 min) y por US+LP_c.

Las mediciones colorimétricas se practicaron en un fotocolorímetro triestímulo Minolta CM-508-d (Minolta Corp., Japón) con esfera integradora, usando una apertura de 1,4 cm de diámetro. Se colocaron 3 mL de jugo en cubetas diseñadas especialmente con base de vidrio y paredes de PVC opaco de 2,5 cm de diámetro interno y 1 cm de altura. Se determinó la evolución del color durante el almacenamiento a 5±1 °C durante 12 días. Periódicamente se

tomaron muestras por duplicado de cada sistema y se colocaron 3 mL de muestra en las cubetas. La iluminación se realizó desde la base vidriada de una cubeta y se colocaron como fondo placas blancas y negras. Se obtuvieron los valores triestímulo: X, Y y Z (espacio CIE) y también las correspondientes transformaciones matemáticas: L*, a*, b* (espacio CIE Lab) de forma automática. Las experiencias de realizaron por duplicado y además de cada condición se registraron mediciones por duplicado. Los cálculos se efectuaron para el iluminante estándar C (luz diurna) y ángulo de observador estándar de 2°.

Por otra parte se calculó el "índice de browning" (BI, Gómez y col., 2011) y la opacidad (Op), según las **ecuaciones 3.20 y 3.22**, respectivamente. Si la opacidad es menor a 1, entonces L* (fondo blanco) es mayor a L* (fondo negro), indicando que la muestra es traslúcida.

$$BI = \frac{[100(x-0.31)]}{0.172} \quad (3.20)$$

donde,

$$x = \frac{X}{(X+Y+Z)} \quad (3.21)$$

$$Op = L^*_{(fondo\ negro)} / L^*_{(fondo\ blanco)} \quad (3.22)$$

Se analizó la evolución de la relación del BI dado a un dado tiempo de almacenamiento en relación a BI inicial (BI/BI_o) y la opacidad de los jugos en el tiempo. Se aplicó un Análisis multivariado de la varianza (MANOVA, ver detalle en el Apéndice) con el fin de detector diferencias en los valores de L*, a*, b*, BI/BI_o y opacidad de los jugos según los factores "tratamiento", "tiempo" y la interacción "tratamiento*tiempo". Se fijó el nivel de significación en $p< 0,05$. Se aplicó el Test de Hotelling corregido por Bonferroni en caso de detectar diferencias significativas.

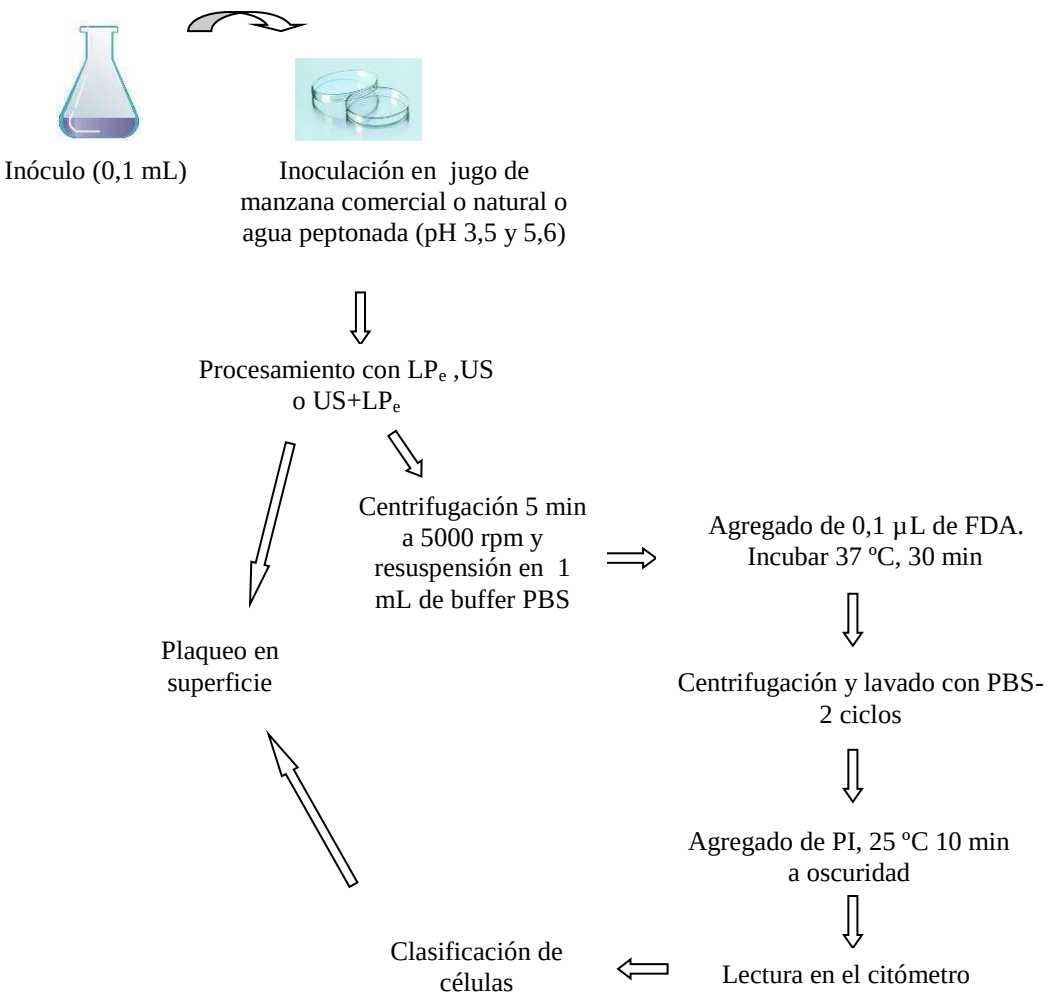
3.14 Estudio del daño celular por citometría de flujo

Se aplicó la técnica de citometría de flujo (CF) con el fin de observar diferentes aspectos del estado fisiológico tales como la actividad metabólica y la integridad de la membrana plasmática de *S. cerevisiae* inoculada en agua peptonada pH 3,5 y 5,6 y jugo comercial de manzana, y tratada durante 2-60 s LP_e (2,4 J/cm^2 a 71,6 J/cm^2; T_{LPi},: 2 ± 1 °C), según lo explicado en **Materiales y Métodos, apartado 3.7.1.3**. Asimismo se evaluaron mediante esta técnica los jugos de manzana comercial y natural inoculados con *S. cerevisiae* tratados o no, con US simple (10 y 30 min; T_{US}: 20 y 44 °C), LP_e simple (60 s; T_{LPi}: 2 y 44 °C) y con el tratamiento combinado US+LP_e, tal como se describió en **Materiales y Métodos, apartado 3.7.2, 3.7.3 y 3.7.4.** Las muestras se centrifugaron 5 min a 8000 rpm mL y suspendidas en 1 mL de buffer fosfato (PBS buffer, pH 7). Se aplicó una doble marcación sobre las muestras tratadas o no (~ 2x10^6 UFC/mL) con FDA (Calbiochem, Alemania) y PI (Sigma Aldrich, EE.UU.). Se emplearon como controles células no irradiadas y marcadas con FDA y células incubadas a 85 ± 1 °C por 15 min e inmediatamente marcadas con PI a modo de definir las regiones positivas y negativas del histograma. También se empleó un control de autofluorescencia con células no marcadas ni tratadas con LP. Las células control e irradiadas fueron incubadas con 0,1 µL FDA (5 mg/ml acetona) a 37 ± 1 °C durante 30 min, centrifugadas por duplicado (8000 rpm, 5 min) y suspendidas en 1 mL de buffer fosfato (buffer PBS, pH 7). A continuación se añadieron 0,5 µL de PI (1 mg/mL agua) y se incubó a temperatura ambiente 10 min en oscuridad. Las muestras se mantuvieron en hielo hasta su posterior determinación (máximo 1 h) (**Figura 3.10**). Las mediciones se llevaron a cabo en un citómetro BD FACSAria II (BD; Nueva Jersey, EE.UU.) (Servicio de citometría, FCEyN, UBA, Buenos Aires, Argentina). Se colectaron las señales de dispersión y fluorescencia como señales logarítmicas de cada célula individual al pasar por la zona del láser. La fluorescencia verde de las células marcadas con FDA se colectó por el canal FL1 (525 ± 15 nm), mientras que la fluorescencia roja de las células marcadas con PI se colectó por el canal FL2 (620 ± 15 nm). La concentración celular y la velocidad de flujo se ajustaron a modo de registrar 200 células por segundo, y se registraron 20,000 eventos en total por muestra. Las condiciones se

evaluaron por triplicado para cada dosis de LP. Se empleó el programa WinMDI 2.8® para el análisis de datos.

Durante las mediciones, se obtuvieron los gráficos de punto tamaño representando la dispersión frontal de la luz (FSC) versus los gráficos de punto representando la dispersión lateral de la luz (SSC), que permiten determinar las propiedades de fluorescencia de la población. Estos gráficos permiten diferenciar gráficamente la población de estudio y encerrarla según sus propiedades de fluorescencia.

Figura 3.10. Esquema del protocolo seguido para el análisis de citometría de flujo.



Además se estimó la actividad esterasa residual aplicando la **ecuación 3.23**, en la cual se estableció la actividad enzimática de la población tratada en relación a la actividad de las células sin tratar. Sólo las células marcadas con F

(cuadrante i, ver **Tabla 1.8, Introducción, apartado 1.11.2**) fueron consideradas en el cálculo. Por otra parte, para calcular la actividad esterasa total (EA_{total}) se aplicó la **ecuación 3.24**, que involucra la actividad esterasa de las poblaciones halladas en los cuadrantes 1 y 2.

$$\%EA = \left(\frac{\#1_T}{\#1_{Ctrl}}\right) x\ 100 \qquad (3.23)$$

$$\%EA_{total} = \left(\frac{\#1_T + \#2_T}{\#1_{Ctrl} + \#2_{Ctrl}}\right) x\ 100 \qquad (3.24)$$

donde, *EA* es la actividad enzimática residual luego de aplicado el tratamiento; $\#1_T$ y $\#2_T$ son los porcentajes de la población en los cuadrantes i y ii respectivamente luego de la aplicación de LP_e simple, US simple o su combinación; $\#1_{Ctrl}$ y $\#2_{Ctrl}$ son los porcentajes de las subpoblaciones en los cuadrantes i y ii previos a la exposición del tratamiento.

El incremento en las células permeabilizadas (incremento de PI) fue calculado como ($\log N_{0PI}$-$\log N_{LP}$) donde N_{0PI} es el número de células que no incorporaron PI (es decir, células que no presentaron fluorescencia roja) antes del tratamiento y N_{LP} es el número de células que no tomaron PI (cuadrante iv, ver **Tabla 1.8, Introducción, apartado 1.11.2**) luego del tratamiento.

En el caso del estudio por CF con LP_e simple en los sistemas modelo y jugo de manzana comercial, a la subpoblación del cuadrante ii (F^+PI^+), se le aplicó la técnica de clasificación de células o *cell sorting*, a modo de determinar si dicha fracción con doble marcación tenía la capacidad de formar colonias al sembrarlas en un medio rico. Por otra parte, se aplicó la técnica de clasificación de células con el objeto de analizar una posible recuperación de las células marcadas como F^-/PI^+ (cuadrante iv), a los sistemas de jugo de manzana comercial tratados 30 min US o 30 min US+LP_e (T_{LPi}: 2 ±1 °C o 44 ± 1 °C). En ambos casos, las células se sortearon a una velocidad de 2000 eventos/s hasta adquirir 100,000 eventos. Las alícuotas obtenidas fueron plaqueadas en

un medio rico no selectivo (SAB) e incubadas 72 h para analizar una posible recuperación. Los resultados se expresaron como log No/N.

3.15 Microscopía electrónica de transmisión

Se utilizó la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) para observar los daños en células microbianas expuestas a LP_e. Debido a la complejidad de la preparación de las muestras y su alto costo, se seleccionaron sólo algunas condiciones y a *S. cerevisiae* como microorganismo de referencia por su alta resistencia al tratamiento. Se evaluaron los sistemas de agua peptonada (pH 3,5) y jugo de manzana comercial (pH 3,5) inoculados con la levadura y tratados con LP_e (10 s, 40 s y 60 s; T_{LPi}: 2 ± 1 °C), según lo descripto en **Materiales y Métodos, apartado 3.7.1.2**. Asimismo, se evaluaron los daños de *S. cerevisiae* inoculado en jugo de manzana comercial y tratados con LP_e (20 s y 60 s; T_{PLi}: 44 ± 1 °C), 10 min US (T_{US}: 44 ± 1 °C) y 10 min US + 60 s LP_e (T_{LPi}: 44 ± 1 °C), de acuerdo al procedimiento detallado en el **apartado 3.7.2, 3.7.3 y 3.7.4**. Por último, se analizaron esporas de *A. acidoterrestris* tratadas con LP_e (60 s; T_{LPi}: 44 ± 1 °C) en jugo de manzana comercial, según lo descripto en el **apartado 3.7.3**. En cada experiencia, 1 mL de muestra tratada o no (control), se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante. El pellet resultante se resuspendió en 2 mL de solución de glutaraldehído al 2,5 % ($^{p}/_{v}$) en buffer fosfato 0,1 (pH 7,1) durante 2 h a 4 °C; lavado con buffer fosfato 0,1 M y fijado posteriormente con $KMnO_4$ (2 % $^{p}/_{v}$) en buffer fosfato 0,1 M por 17 h a 4 °C. Posteriormente, se realizó un lavado con agua destilada y deshidratación en alcohol con graduación ascendente (50%-70%-96%-100%) en acetona, y se embebió en Epon 812 (Shell Chemical Company, EE.UU.), durante 48 h (Bolondi y col., 1995). Los tacos se cortaron con ultramicrótomo (Sorvall MT2, EEUU) y fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron al microscopio (TEM Philips EM 301, Centro de Microscopías Avanzadas, FCEN, UBA, Buenos Aires, Argentina).El revelado de las micrografías se llevó a cabo en el Centro de Producción Documental (CePro, FCEN, UBA, Buenos Aires, Argentina).

3.16 Análisis sensorial

Se realizaron distintos estudios sensoriales con consumidores habituales de jugo de manzana con el objeto de evaluar el impacto de esta bebida tratada con LP. Para ello muestras de jugo de manzana exprimido y tratado con LP_c o la combinación US+LP_c, se sometieron a la evaluación de un grupo de consumidores según las siguientes pruebas:

- Test de diferencia contra control
- Test de campo
- Test de vida útil sensorial

las cuales se describirán en detalle adelante.

3.16.1 Área de prueba

Se seleccionó una habitación con luz natural, temperatura agradable y libre de posibles distracciones, que fue dividida en dos sectores: zona de análisis y zona de preparación de las muestras. Para que los juicios fuesen independientes, el sector de análisis fue dividido en seis cubículos blancos (**Figura 3.11**). Cada uno de ellos fue provisto de un vaso con agua para el enjuague de la boca entre las degustaciones en caso de ser necesario.

3.16.2 Jueces

Las diferentes pruebas se realizaron con consumidores frecuentes de jugo de manzana, reclutándose un número de jueces determinado según el tipo de prueba. Fueron invitados a participar de las sesiones estudiantes universitarios y personal de la universidad, cuyas edades oscilaban entre los 20 y los 45 años. Al finalizar la prueba se les otorgó una pequeña recompensa consistente en una golosina, en agradecimiento por su colaboración.

Figura 3.11. Sala de evaluación sensorial.

3.16.3 Test de diferencia contra control

Esta prueba discriminativa se implementó para verificar si los consumidores encontraban alguna diferencia entre las muestras sin tratamiento (control) y las muestras tratadas con LP_c y $US+LP_c$, así como también la magnitud de la misma.

Los jueces recibieron dos muestras presentadas de manera idéntica en todas sus propiedades y codificadas en claves de tres cifras y el control camuflado presentado también como muestra incógnita, acompañados por otro vaso identificado como control (C), como en ilustra en la **Figura 3.12**. En cada sesión, 15 mL de jugo se sirvieron en vasos plásticos de color rojo a una temperatura de consumo entre 8 y 10 °C. El orden de presentación de las muestras fue al azar así como también la distribución de muestras entre los sujetos. A continuación se detalla la distribución de muestras en la cabina:

ABC	**ACB**	**BAC**
BCA	**CAB**	**CBA**

Se les pidió a los consumidores que evaluaran la magnitud de la diferencia global entre cada muestra incógnita presentada y el control identificado como tal, y que lo marcaran en una escala numérica de categorías desde “ninguna” diferencia a “muy grande”, como se detalla en el **Formulario 1.** Además se pidió, en lo posible, describir la diferencia.

Se aplicó un ANOVA de dos factores (muestra y sujeto). Las diferencias entre los sujetos se estudiaron para analizar si los sujetos evaluaron como grupo. En aquellos casos en los cuales existieron diferencias significativas en los juicios emitidos por los sujetos, se calculó la mínima diferencia significativa de Fisher (MDS) que habría que superar para eliminar los juicios que se apartaban del resto.

Se aplicó el Test de Dunnet con el objeto de conocer cuánto difieren las muestras tratadas respecto del control sin tratar y si dicha diferencia es significativa.

Figura 3.12. Disposición de las muestras y material proporcionado a cada cubículo

3.16.4 Test de campo

Se realizó un test de campo con consumidores con el objeto de evaluar la impresión global respecto de algunas características del jugo de manzana exprimido. Para ello se siguió el protocolo propuesto por Lawless y Heymann (2010).

Dada la complejidad que la prueba representa para los consumidores por la extensión y características de la misma y considerando los resultados obtenidos en el test de diferencia contra control, se seleccionó el tratamiento US+LP_C. El **Formulario 2** esquematiza la prueba realizada.

En la prueba de impresión global (**Formulario 2, punto 1**) se empleó una escala hedónica de 9 puntos balanceada, con extremos desde “me disgusta extremadamente” a me gusta extremadamente”. Se realizaron dos preguntas abiertas direccionadas acerca del gusto o disgusto del producto, a contestar en una determinada secuencia, según el puntaje otorgado en la prueba de impresión global.

Luego se procedieron a evaluar en el mismo formulario atributos particulares en escalas cortas de aceptabilidad, punto justo y/o intensidad (Lawless y Heymann, 2010). Se incluyeron en el formulario otras dos preguntas relacionadas con la evaluación de características específicas del jugo (sabor a manzana y dulzor), las cuales se evaluaron a través de escalas de intensidad cortas de cinco puntos, con extremos “sin sabor a manzana” a “sabor a manzana muy intenso” y “no dulce” a “muy dulce”. El sabor ácido se evaluó a través de una escala de punto justo de cinco puntos a modo de determinar si este atributo se encontraba en adecuada intensidad (**Formulario 2, punto 2**).

Formulario N° 1

Evaluación de jugo de manzana

N° de bandeja …… Fecha: / /14

INSTRUCCIONES

Se le ha entregado una muestra control (C) y otras tres muestras de jugo de manzana para que las compare respecto del mismo en cuanto a su diferencia global. Las muestras están ordenadas al azar.

1. Probar primero el control (C).
2. Luego probar la muestra codificada.
3. Evaluar la magnitud de la diferencia global de la muestra respecto del control.
4. Marcar en la escala con una "X" la casilla que mejor exprese la diferencia de sensación percibida.
5. Repetir los pasos 1 a 4 con cada muestra. De ser necesario enjuagar la boca con agua antes de cada evaluación de un nuevo par control-muestra.
   Tenga en cuenta que algunas muestras pueden ser iguales al control.

La diferencia global de cada muestra respecto del control es:

Clave de la muestra:		**……..**	**……..**	**……**
Ninguna	1	☐	☐	☐
Ligera	2	☐	☐	☐
Moderada	3	☐	☐	☐
Grande	4	☐	☐	☐
Muy grande	5	☐	☐	☐

En caso de encontrar diferencia:

¿Puede describir la misma?

……

……

……

……

Formulario 2

Evaluación de una bebida de manzana

Código de muestra ☐

fecha: / /14

Instrucciones:

Pruebe una pequeña cantidad de la muestra recibida y confiando en su primera impresión responda:

1. Impresión global. Realice una marca en el casillero que mejor refleje su opinión

9	☐	Me gusta extremadamente
8	☐	Me gusta mucho
7	☐	Me gusta moderadamente
6	☐	Me gusta algo
5	☐	Ni me gusta ni me disgusta
4	☐	Me disgusta algo
3	☐	Me disgusta moderadamente
2	☐	Me disgusta mucho
1	☐	Me disgusta extremadamente

Si su respuesta es 5 o más, vaya a la pregunta **A** y luego a la pregunta **B**
Si su respuesta es 4 o menos, vaya a la pregunta **B** y luego a la pregunta **A**.

A. Diga qué le gustó del producto

……

……

Pruebe nuevamente e indique: ¿Existe algo más que quiera agregar?

……

B. Diga qué no le gusta del producto.

……

Pruebe nuevamente e indique: ¿Existe algo más que quiera agregar?

……

2. Las siguientes preguntas están relacionadas con la intensidad de algunas de las características del producto:

Sabor a manzana:

Sin sabor a manzana ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ Sabor a manzana muy intenso

Sabor dulce:

No dulce ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ Muy dulce

3. ¿Cuál es su opinión acerca del **sabor ácido** del producto?

☐ ☐ ☐ ☐ ☐

| | |

demasiado débil | adecuado | demasiado fuerte

Para la realización del test de campo, cada juez dispuso de una única muestra (codificada por tres números al azar). Todos los participantes recibieron la misma muestra con distinta codificación.

En primer lugar, se analizó la información brindada por los consumidores mediante la distribución de frecuencias de los puntajes asignados en la prueba de impresión global.

Dado que la distribución de frecuencias resultó bimodal, se llevó a cabo un análisis de conglomerados (método de agrupamiento promedio ponderado y distancia Euclidea) para vislumbrar la existencia de segmentación en la preferencia de los consumidores por el jugo de manzana procesado mediante US+LP$_c$. La bondad del ajuste global se midió por el coeficiente *CCC* (Lawless, 2013).

3.16.4.1 Segmentación

Se realizó un análisis jerárquico de conglomerados para la segmentación de consumidores en grupos homogéneos y al mismo tiempo diferente de los otros grupos a modo de analizar si la aceptabilidad del jugo de manzana procesado por US+LP_c, que tomando a la población como conjunto presentaba baja aceptabilidad, examinar si alguno de los grupos emergentes presenta un fuerte interés en el mismo (Lawless, 2013). Por lo tanto se aplicó el análisis jerárquico de conglomerados mediante el método del promedio ponderado y utilizando la distancia Euclidea (Lawless, 2013) a modo de minimizar la relación entre la varianza dentro del cluster y la varianza entre clusters. Un valor de *CCC* cercano a 1 indica buen ajuste, considerándose válidos aquellos clusters cuyo CCC fuera mayor a 0,8 (Lawless, 2013).

3.16.5 Test de vida útil sensorial

Se llevó a cabo este estudio con el fin de estimar el tiempo en el cual un dado porcentaje de los consumidores rechazarán el jugo de manzana natural tratado con US+LP_c y almacenado a 5±1 ºC. Las muestras tratadas con US+LP_c según lo explicado en **Materiales y Métodos, apartado 3.8**, fueron colocadas en frascos estériles de 500 mL de capacidad color caramelo y fueron inmediatamente almacenadas a 5 ± 1 ºC en oscuridad, asegurándose el llenado completo de recipiente. Luego de 0, 2, 4, 5, 6 y 7 días de almacenamiento, las muestras se almacenaron en vasos descartables de color rojo conteniendo 15 mL de muestra y se guardaron a -80 ºC hasta su posterior determinación. El límite de 7 días se estableció según los resultados obtenidos de la flora nativa (**Resultados y Discusión, apartado 4.4.2**) que aseguran calidad microbiológica durante todo el período de tiempo analizado para los ensayos de vida útil sensorial. Sólo fueron evaluadas las muestras tratadas debido a la gran cantidad de participantes y la gran cantidad de muestras necesarias para llevar a cabo este estudio. Se seleccionaron intervalos de tiempo de muestreo iguales dado que no se observó un aumento considerable de la flora nativa durante los primeros 7 días de

almacenamiento. Se reclutaron 53 consumidores frecuentes de jugo de manzana. Las muestras fueron presentadas al azar y para cada muestra probada se les solicitaba a los consumidores que contestaran esta pregunta: "¿Usted consumiría este producto?. ¿Sí o no?" (**Formulario 3**). Mediante el análisis de supervivencia se determinó la función de rechazo como la probabilidad de que un consumidor rechace el jugo de manzana antes de un dado tiempo (función de rechazo), mediante la distribución de Weibull que se define como:

$$F(t) = 1 - exp\left(-exp\left(\frac{\ln(t)-\mu}{\sigma}\right)\right) \qquad (3.25)$$

Formulario 3

Evaluación de una bebida de jugo de manzana verde

Bandeja n°:

INSTRUCCIONES

Pruebe las muestras de jugo de izquierda a derecha y responda para cada una: **¿Usted normalmente consumiría este producto? ¿ Sí o no?.** De ser necesario enjuagar la boca con agua antes de la evaluación de una nueva muestra.

Clave de la muestra

☐ ……. ☐ ……. ☐ ……... ☐ ……. ☐ ……. ☐ …….

donde μ y σ son los parámetros del modelo. El modelo que provee de un menor valor de likelihood es el de mejor ajusta los datos experimentales. La función likelihood es una expresión matemática que describe la probabilidad conjunta de obtener los datos realmente observados en el estudio como una función de los parámetros desconocidos del modelo considerado (Hough, 2005).

A partir de los parámetros obtenidos del modelo con mejor ajuste, se representó el porcentaje de rechazo con el tiempo de almacenamiento. Por

otra parte, se obtuvieron los percentiles de la distribución de la vida útil con sus intervalos de confianza asociados. El percentil del 50 % indica cuántos días se puede almacenar un alimento para que menos del 50 % de los consumidores rechace el producto.

4. Resultados y Discusión

4 Resultados y Discusión

Parte I

El propósito de esta sección es estudiar y optimizar las variables involucradas en la efectividad del tratamiento por LP en sistema estanco en la preservación de diversos jugos frutales, así como evaluar la efectividad del tratamiento a partir del modelado de las cinéticas de inactivación de los microorganismos inoculados en los distintos jugos tratados con LP. Por otra parte, se evaluará la dinámica del crecimiento de microorganismos inoculados y de la flora nativa de los jugos tratados con LP y almacenados durante el almacenamiento en refrigeración. Por último, se analizará el estado fisiológico mediante la aplicación de la técnica de citometría de flujo y los daños estructurales por microscopía electrónica de transmisión de un microorganismo resistente al tratamiento como *S. cerevisiae.*

4.1 Determinación de la dosis por LP_e

Con el propósito de determinar la dosis por pulso emitida por el equipo de LP_e, se utilizó un osciloscopio siguiendo el procedimiento descripto en **Materiales y Métodos, apartado 3.7.1.2.** Se obtuvo un valor de dosis correspondiente a 0,398±0,001 J/cm^2 por pulso a 10 cm de distancia respecto de la lámpara en el punto central del estante y a 10 cm de este punto hacia los extremos izquierdo y derecho. En la **Tabla 4.1.0** se muestran los valores de dosis correspondientes a los distintos tiempos de exposición a LP_e obtenidos a partir del múltiplo de la dosis por pulso a 10 cm respecto y el número de pulsos por segundo (**Materiales y Métodos, apartado 3.7.1.1)**.

Tabla 4.1.0 Valores de dosis correspondientes a los distintos tiempos de exposición a LP_e a 10 cm de distancia de la lámpara

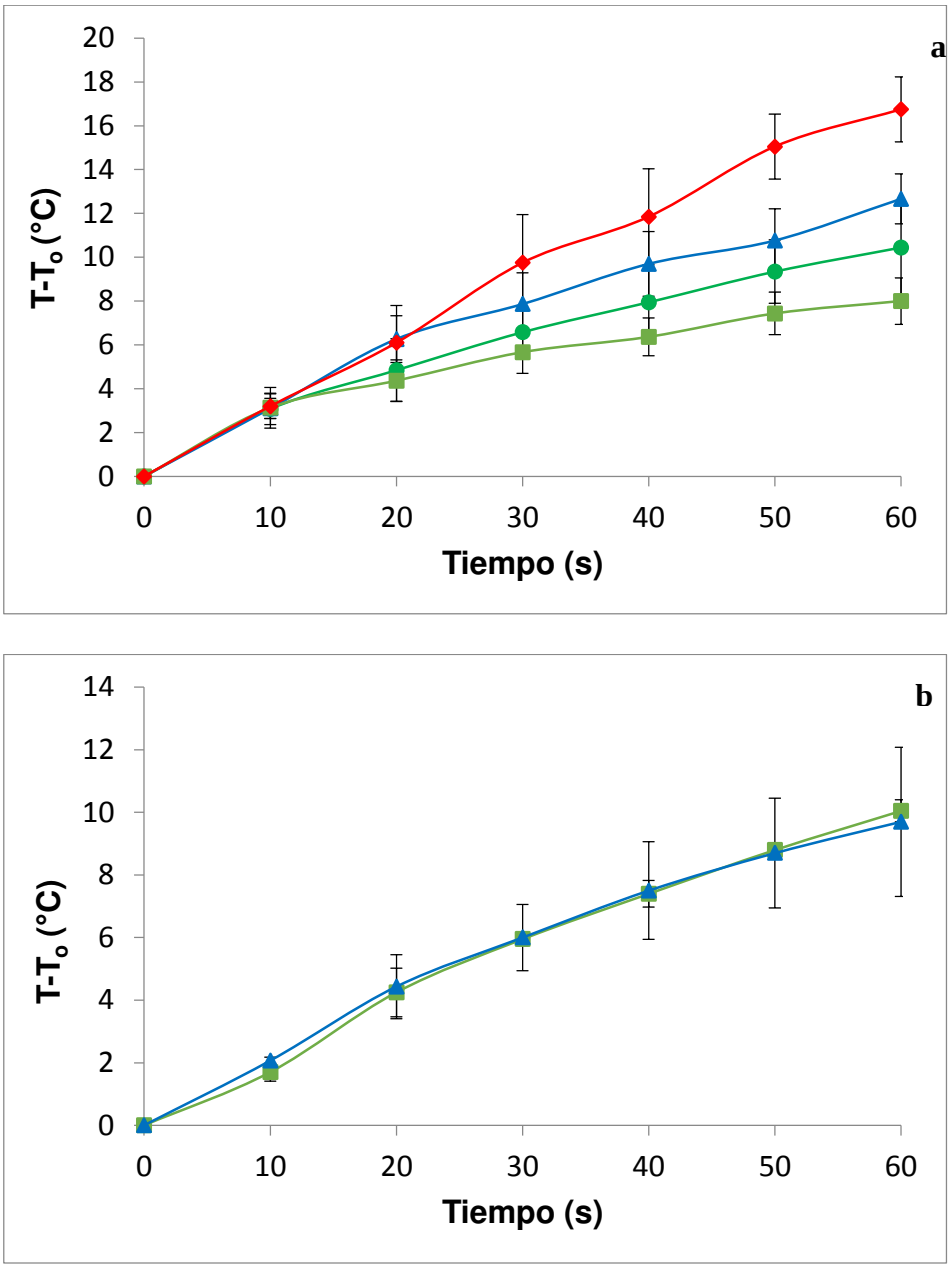
Tiempo (s)	Fluencia (J/cm^2)
0	0,00
2	2,39
3	3,58
4	4,78
5	5,97
8	9,55
10	11,94
20	23,88
40	47,76
60	71,60

4.2 Efectividad del tratamiento por LP_e de jugos frutales

4.2.1 Perfil de temperatura

La **Figura 4.1.1.a** muestra la evolución de la temperatura durante el tratamiento con LP_e de las muestras de jugo natural. La temperatura de los jugos se incrementó con el tiempo de tratamiento. Pero, gracias al sistema adoptado de refrigeración de los mismos (muestra pre-refrigerada (5 – 7 ℃) y posteriormente posteriormente colocada dentro de una placa de Petri cubierta con hielo en escamas, T_{LPei}: ~ 2 ± 1 ℃), la temperatura no superó los 20 ℃ en ningún caso. El rango de incremento térmico fue 7,4 - 16,8 ℃, dependiendo del tipo de jugo. El jugo de frutilla presentó el mayor incremento (16,7 ℃) y el de naranja el menor (10,0 ℃). Los jugos de manzana y melón exhibieron un incremento similar (12,6 ℃ y 10,5 ℃, respectivamente). Los perfiles de temperatura de los jugos comerciales se muestran en la **Figura 4.1.1.b**. El incremento correspondiente fue de ~10,0 ℃ para ambos jugos.

Figura 4.1.1. Perfil de temperatura de jugos naturales (a) y comerciales (b) de manzana (▲), melón (●), naranja (■) y frutilla (♦) refrigerados con hielo en escamas y tratados con LP_e a 10 cm de distancia de la lámpara.



4.2.2 Caracterización de los jugos frutales por absorbancia, turbidez y tamaño de partícula

La **Figura 4.1.2** muestra el espectro de absorbancia correspondiente a los jugos sin tratar obtenidos tal como se describe en **Materiales y Métodos,**

apartado 3.6. La absorbancia de los jugos comerciales (**Figura 4.1.2a**) y naturales (**Figura 4.1.2b**) fue determinada en el rango comprendido entre los 200 y los 1100 nm, de modo de poder determinar la dependencia de la eficacia del tratamiento con LP_e y la longitud de onda. Todos los jugos absorbieron principalmente en la región UV, siendo despreciable la absorción en la región visible e infrarroja (**Figura 4.1.2a,b**). En la **Figura 4.1.3** se ilustra un detalle del espectro de absorbancia de los jugos en el rango de 200 a 300 nm. El jugo de frutilla exhibió la mayor absorbancia en la región UV, seguido por los jugos de naranja (que presentó un pico en los 263 nm), melón y manzana (**Figura 4.1.3b**). Los jugos comerciales de naranja y manzana presentaron espectros similares a los correspondientes a los jugos naturales (**Figura 4.1.3a)**. La mayor absorbancia del jugo de frutilla podría explicar el mayor incremento de temperatura observado para dicho jugo (**Figura 4.1.1a**).

Para que la inactivación por LP_e ocurra, debe producirse el contacto entre los fotones y los microorganismos blanco. Es por ello que el proceso de desinfección se ve perjudicado ante la presencia de cuerpos que absorben luz y que se hallen presentes

Figura 4.1.2. Espectros de absorbancia de jugos sin tratamiento LP_e, a) jugos comerciales de naranja y manzana Cepita y b) naturales exprimidos de manzana (—), melón (—), naranja (—) y frutilla (—)

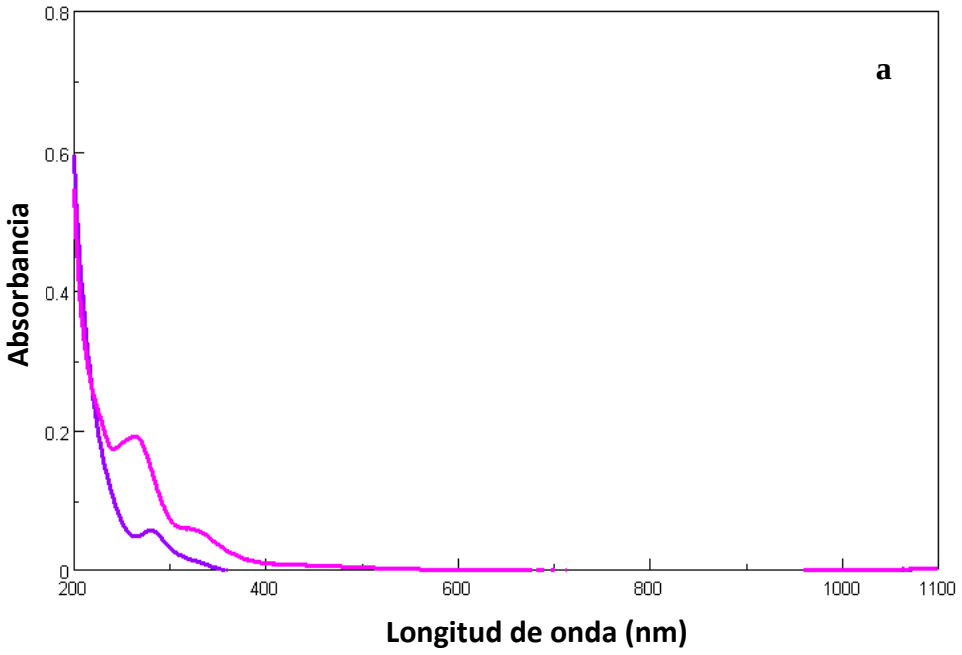
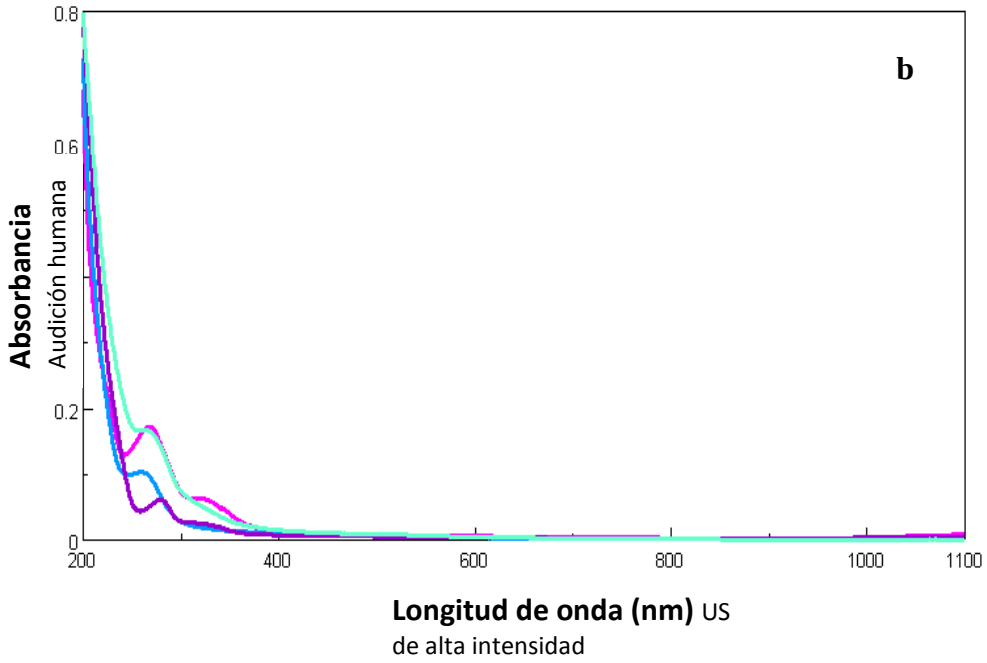


Figura 4.1.2. ***Continuación…***



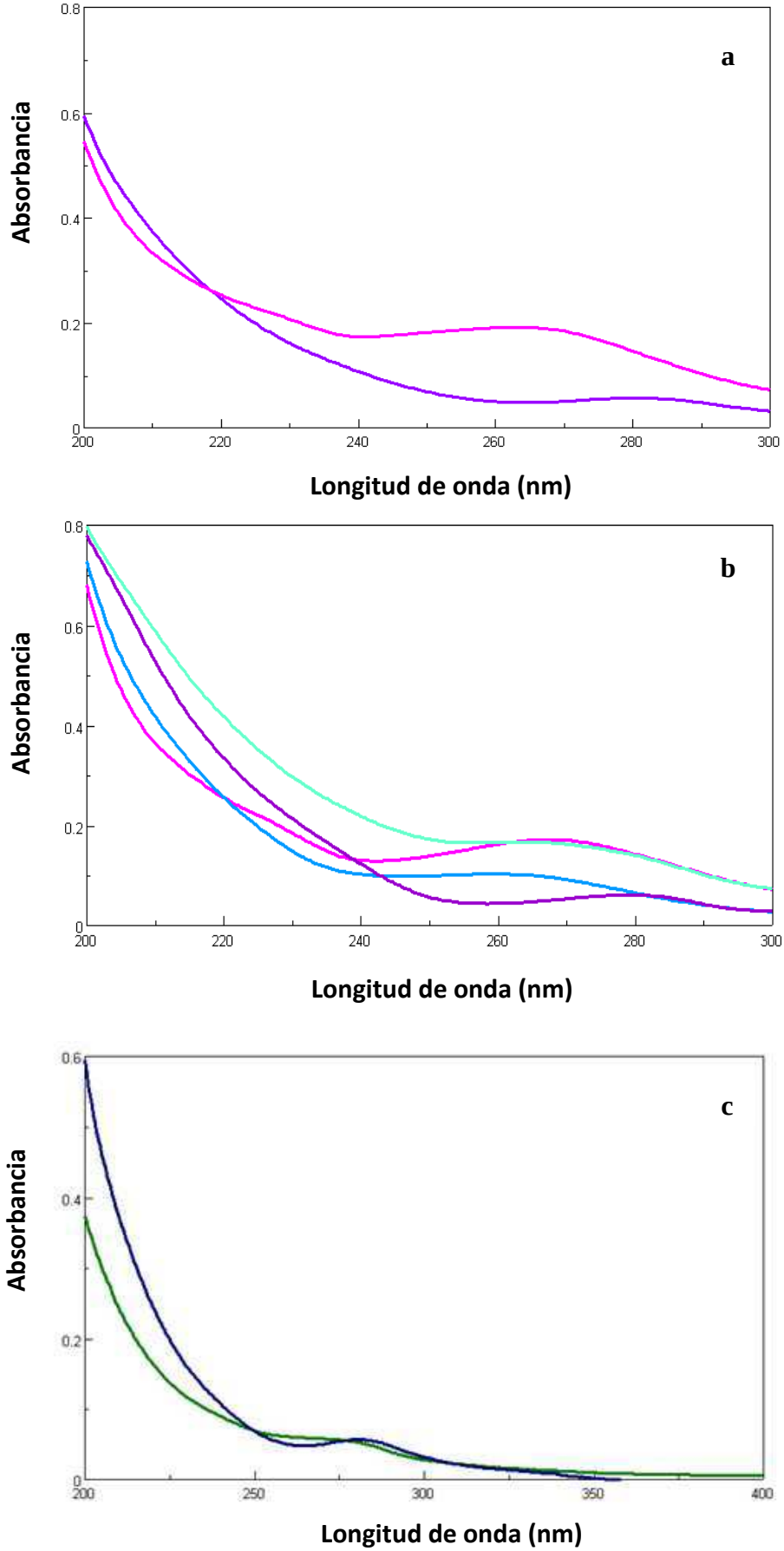
entre la fuente de luz y los microorganismos (Gómez-López y col., 2007). Wang y col. (2005) reportaron que la máxima inactivación de *E. coli* luego del tratamiento con LP_e, se alcanzó a los 270 nm (0,43 log/mJ/cm^2), mientras que a longitudes de onda superiores a los 300 nm no se observó inactivación. Estos autores sugirieron que la absorción UV de las pirimidinas del ADN induciría la formación de dímeros covalentes que inhibirían la replicación celular, lo cual constituye la principal causa de inactivación microbiana por luz UV. Woodling y Moraru (2007) observaron que si bien todo el rango UV contribuyó a la inactivación de *L. innocua*, el efecto de la luz UV-B y UV-C fue más importante que el efecto de la luz UV-A.

De aquí y en adelante, a los fines prácticos la referencia de jugo de manzana comercial se referirá siempre al jugo comercial marca Cepita.

En la **Tabla 4.1.1** se muestra la absorbancia a 254 nm, turbidez y tamaño de partícula de los jugos comerciales y naturales obtenidos según lo descripto en **Materiales y Métodos, apartado 3.6**.

Respecto a los jugos naturales, el jugo de melón presentó la mayor turbidez, seguido por los jugos de naranja, manzana y frutilla. La turbidez es una medida de la cantidad de partículas en una solución.

Figura 4.1.3. Detalle del espectro de absorbancia de jugos sin tratar con LP_e a) comerciales de naranja y manzana Cepita, naturales exprimidos (b) de manzana (—), melón (—), naranja (—) y frutilla (—), c) comerciales de manzana Tropicana (—) y Cepita (—).



La turbidez es una propiedad óptica resultante de la dispersión de la luz cuando atraviesa una muestra líquida (Davies-Colley y Smith, 2001). Por lo tanto, sistemas con alta turbidez, presentarán menor transmisión de luz UV disminuyendo la eficiencia del proceso de pasteurización (Koutchma y col., 2009). Además, para que ocurra la inactivación, debe producirse el contacto entre los fotones y las células blanco. Por lo tanto, la presencia de partículas que absorban en la región UV, lo cual se ve reflejado en el valor de absortividad de los jugos, sería perjudicial para la eficiencia del proceso de desinfección (Gómez-López y col., 2007). En consecuencia, sistemas con alta turbidez y A_{254} nm, exhibirán menor inactivación mediante LP_e.

Tabla 4.1.1. Valores de absorbancia a 254 nm ($A_{254\ nm}$), tamaño de partícula y turbidez de los jugos comerciales y naturales exprimidos.

Jugo		*$A_{254\ nm}$*	*Turbidez (NTU)*	*Tamaño de partícula (nm)*	*ds*[1]
Comercial	manzana	0,0485±0,0359	1,18±0,06	1	f
	naranja	0,1572±0,0057	1028,75±3,50	724	c
Natural	manzana	0,1078±0,0076	45,68±2,16	712	e
	naranja	0,4482±0,0321	137,75±14,20	677700	b
	frutilla	0,5644±0,0093	4,17±0,73	712	d
	melón	0,1249±0,0202	166,50±6,95	478630	a

[1] Diferencias significativas, ds, indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) según el test de Hotelling corregido por Bonferroni correspondiente al MANOVA, (±) Error estándar de cada parámetro calculado a partir de 3 réplicas para cada condición.

Las distribuciones de tamaño de partícula de los jugos resultaron multimodales y se muestra en la **Figura 4.1.4**. Para los jugos de frutilla y manzana natural, se obtuvieron distribuciones de 59 a 6439 nm y 21 a 6439 nm, respectivamente, con picos en 712 y 5560 nm. En el caso de manzana, se obtuvo un pico adicional a 51 nm. El jugo de naranja presentó una distribución de tamaño de partícula considerablemente mayor, con dos picos a 1 y 678 µm. Betoret y col. (2009) reportaron tamaños de partícula similares para jugo natural centrifugado de naranja (var. Salustiana, pH: 3,5; 12,7 ºBrix) con un pico a 552,4 µm, mientras que Corredig y col. (2001) observaron una distribución con un pico a 1000 nm en jugo comercial de naranja (pH: 4,0; 12 º Brix). Otras variables como el pH y ºBrix, no parecieron jugar un rol importante

en la inactivación por LP_e, dado que el jugo de frutilla mostró menores valores de estos parámetros que el jugo de naranja; pero presentó una inactivación similar (**Figura 4.1.4B**). En concordancia con estos resultados, Murakami y col. (2006) y Koutchma y col. (2004) mostraron que soluciones que diferían en el contenido de sólidos solubles (°Brix) no variaban en cuanto a la tasa de inactivación por luz UV en modo continuo.

Figura 4.1.4. Distribuciones de tamaño de partícula de jugos comerciales de manzana (a, —) y naranja (b, —); y naturales de manzana (c, —), frutilla (c, —) naranja (d, —) y melón (e, —). Desvío estándar (I).

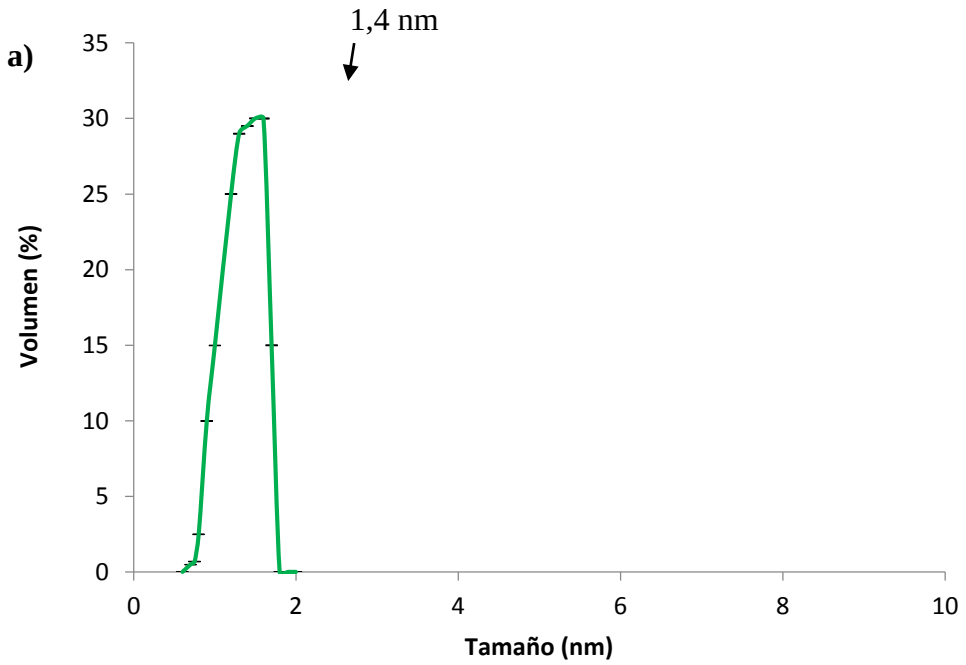
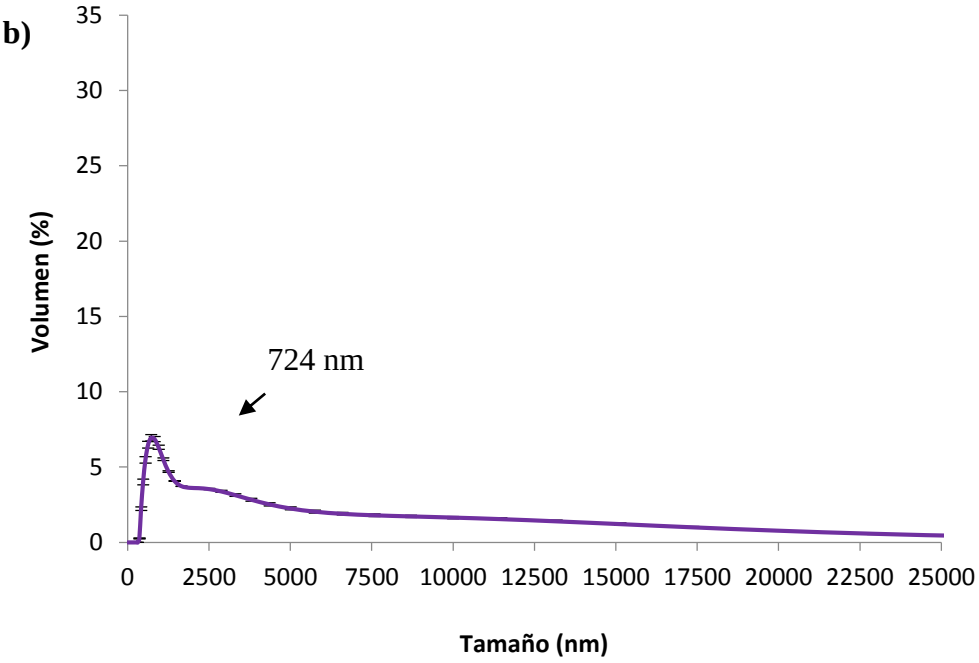
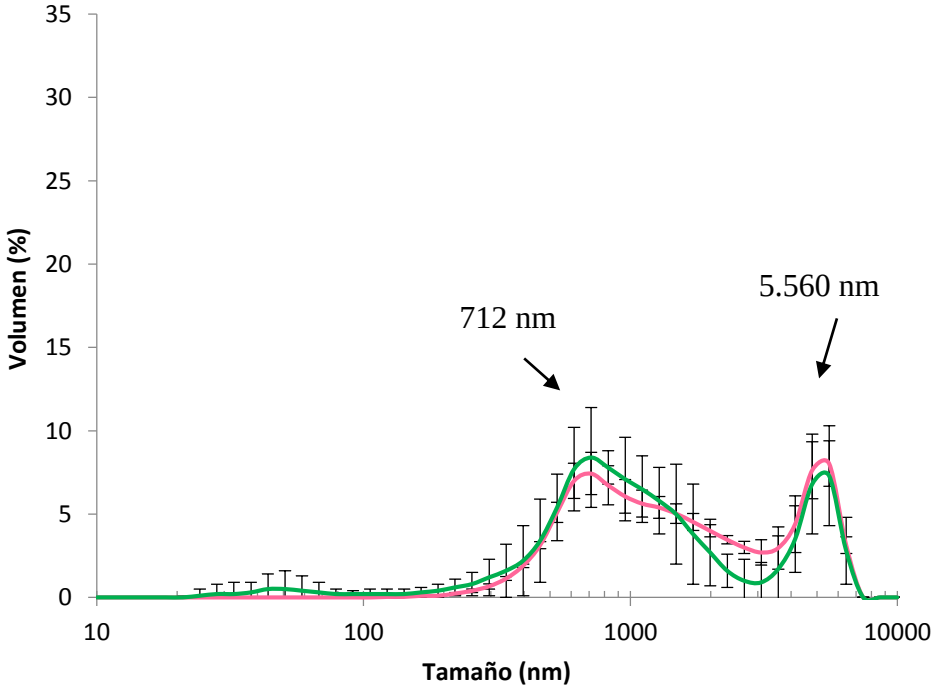


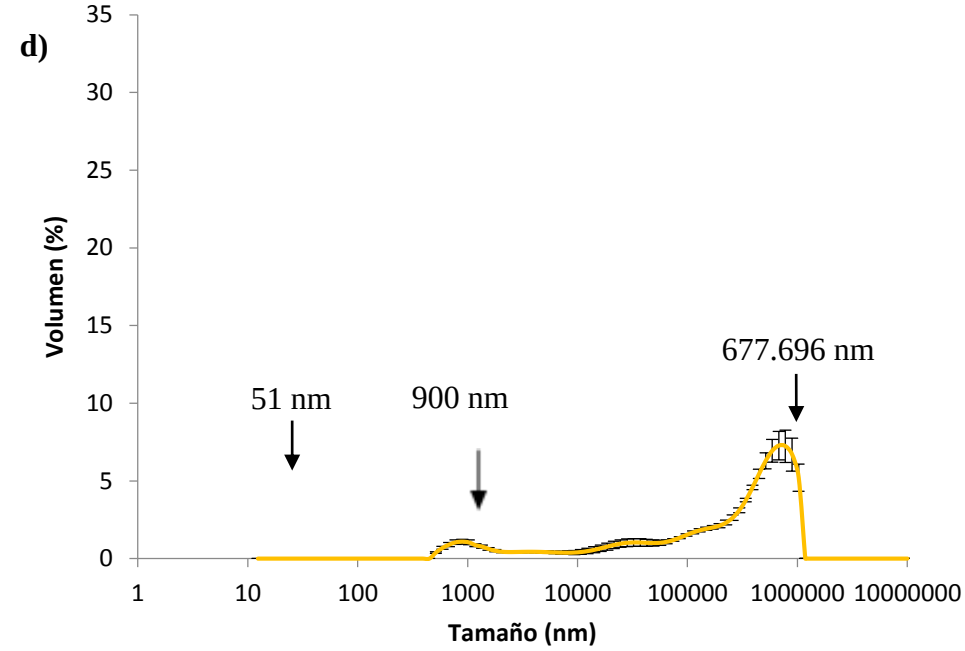
Figura 4.1.4. ***Continuación…***

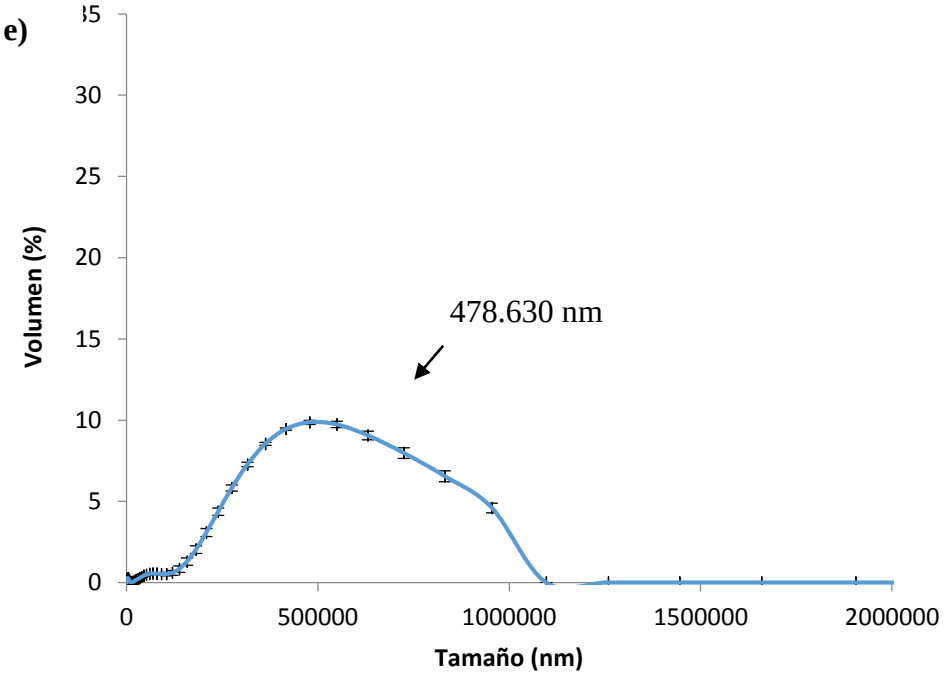
b)



c)







4.2.3 Estudios de reto microbiano

En la **Figura 4.1.5** se muestran las curvas de inactivación de *E. coli, S. cerevisiae, L. innocua* y *S.* Enteritidis tratados con LP_e durante 60 s, tal como se describió en **Materiales y Métodos, apartado 3.7.1.2** en jugo comerciales de

manzana y naranja, y naturales de manzana, naranja, frutilla y melón. En general, las curvas de inactivación exhibieron una marcada concavidad hacia arriba, alcanzando entre 0,6 y 6,2 ciclos de reducción logarítmica en el caso de los jugos comerciales y (**Figura 4.1.5A**) y entre 0,3 y 6,9 reducciones logarítmicas para los jugos naturales (**Figura 4.1.5B**) luego de 60 s (71,6 J/cm^2) de tratamiento. Se calculó la E_{EO} correspondiente al tratamiento por LP_e aplicando la **ecuación 3.11a** como se describió en **Materiales y Métodos, apartado 3.8,** obteniéndose un valor de 6,2.10^6-3,8.10^7 kW.h/m^3/orden.

Todas las curvas de inactivación estuvieron caracterizadas por una reducción de las poblaciones microbianas más pronunciada durante los primeros 10 s de tratamiento (fluencia $\leq$ 12 J/cm^2) y luego, el número de supervivientes disminuyó más lentamente con el tiempo de tratamiento (**Figura 4.1.5**).

Excepcionalmente, las curvas resultaron sigmoideas en los casos de *S. cerevisae* inoculada en jugo comercial de manzana y jugo natural de melón (**Figura 4.1.5a,b**). Los cambios en la forma de la curva de inactivación pueden estar asociados a diferentes sensibilidades dentro de la población al tratamiento por LP_e, incluso a la existencia de subpoblaciones con diferente resistencia a dicho factor de estrés para los microorganismos ensayados. La concavidad hacia arriba, que indica que el proceso se vuelve menos efectivo a altas dosis, condujo a la presencia de cola en varias de las curvas de inactivación. La existencia de cola puede atribuirse, entre otras causas, a la existencia de miembros de la población resistentes al tratamiento y/o alta absorbancia de las muestras en la región UV (**Figura 4.1.3**), dado que la presencia de sólidos suspendidos perjudica el proceso de desinfección. La concavidad haca arriba y la presencia de cola sugieren la necesidad de utilizar LP en una estrategia combinada de preservación con otros factores de stress tradicionales y/o emergentes, con el propósito de obtener mayor reducción en la población microbiana, además de optimizar la aplicación de LP_e evitando el sobretratamiento.

Pataro y col. (2011) también reportaron la presencia de cola en las curvas de inactivación de *E. coli* y *L. innocua* en jugo de naranja pero no en manzana, tratados con LP_e. No se observó la presencia de hombro en ninguna

de las curvas de inactivación en concordancia con otros autores (Choi y col., 2010; Izquier y Gómez-López, 2011; Gómez y col., 2011).

Para todos los microorganismos investigados, se obtuvo mayor inactivación en los jugos comerciales de manzana y naranja (**Figura 4.1.5a**) respecto a los jugos exprimidos (**Figura 4.1.5b**), siendo el tratamiento con LP_e más efectivo en el jugo de manzana. El tratamiento por LP_e careció de efectividad en los jugos de frutilla y naranja exprimido dado que se alcanzó menos de 1 ciclo de reducción para todos los microorganismos estudiados. Estos resultados sugieren que el grado de inactivación estuvo limitado a la absorción de luz en el rango UV, dado que estos dos jugos presentaron alta absorbancia entre las longitudes de onda comprendidas entre los 200 y los 400 nm (**Figura 4.1.2a,b**). Estos resultados están de acuerdo con los reportados por otros autores, quienes observaron que la inactivación por LP_e fue menor en sistemas con alta absorción en la región UV (Sauer y Moraru, 2009; Koutchma y Parisi, 2004). Otras variables como el pH y los °Brix no parecieron afectar la tasa de inactivación, dado que tratamientos en jugos poco ácidos (jugo de melón) exhibieron la mayor tasa de inactivación, mientras que el contenido de sólidos del jugo de frutilla resultó el más bajo y al mismo tiempo presentó la menor inactivación.

En concordancia con estos resultados, Sauer y Moraru (2009) reportaron que el tratamiento por LP_e en soluciones modelo con baja absorbancia en la región UV y altos valores de pH fue más efectivo que en jugo y sidra de manzana. Chaine y col. (2012) también sugirieron que la menor inactivación observada en jarabe de azúcar respecto al agua destilada puede atribuirse a diferencias en la transmisión de luz en la región UV. Murakami y col. (2006) y Koutchma y col. (2004) mostraron que soluciones con diferente grado de sólidos solubles (°Brix) no afectaron la tasa de inactivación durante el tratamiento con UV continuo. Por otra parte, Koutchma y col. (2004) reportaron que la presencia de partículas en suspensión que incrementan la turbidez del sistema, puede impactar de manera negativa en la eficiencia de la desinfección debido a una absorbancia adicional, dispersión o bloqueo de la luz UV. Las diferentes respuestas de los microorganismos a la LP_e no pueden deberse solo a diferencias en la susceptibilidad a la región UV, sino a todo el espectro. Sauer

y Moraru (2009) obtuvieron 2,5 y 2,7 reducciones logarítmicas para *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* O157:H7 respectivamente, en sidra de manzana comercial tratada con LP_e (13 J/cm^2) en condiciones estáticas. En este estudio se obtuvo una inactivación similar para jugo de manzana comercial inoculado con *E. coli* (2,9 reducciones logarítmicas; 12 J/cm^2; 10 s). Palgan y col. (2011) reportaron 5 reducciones logarítmicas en jugo de manzana comercial y 1 reducción en jugo de naranja al aplicar LP_e (28 J/cm^2) a *E. coli* K12 DSM 1607 en condiciones estáticas. En este trabajo, 20 s de exposición a LP_e (24 J/cm^2) provocó una inactivación similar de *E. coli* en jugo comercial de naranja, aunque un poco menor en jugo de manzana (3,5 reducciones logarítmicas).

Figura 4.1.5. Curvas de inactivación de *E. coli* (i), *L. innocua* (ii), S. Enteriditis (iii) y *S. cerevisiae* (iv) en jugos de manzana (▲); melón (●); naranja (■) y frutilla (♦) tratados con LP_e. (a) jugos comerciales; (b) jugos naturales exprimidos. Desvío estándar (I).

a)

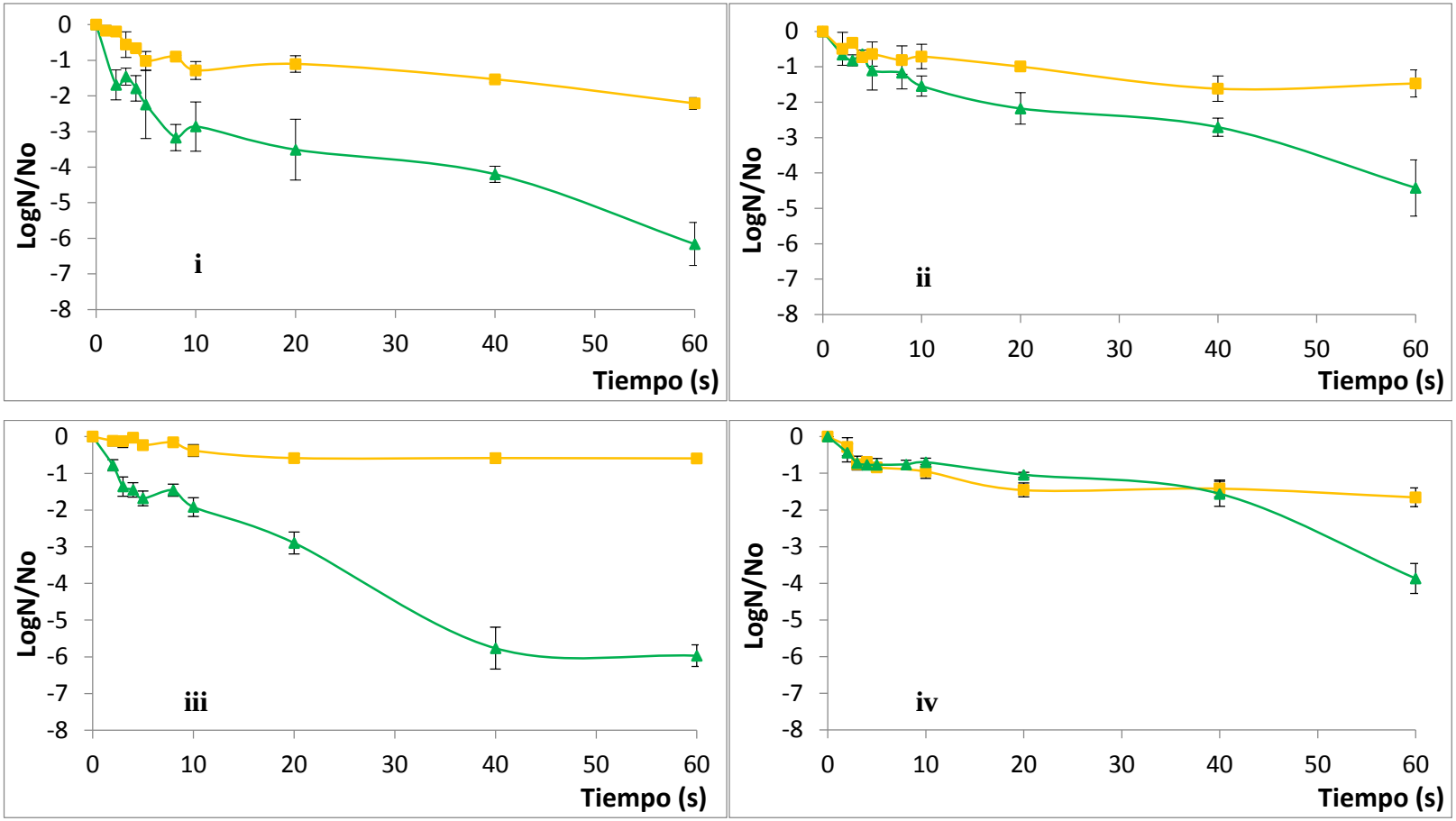
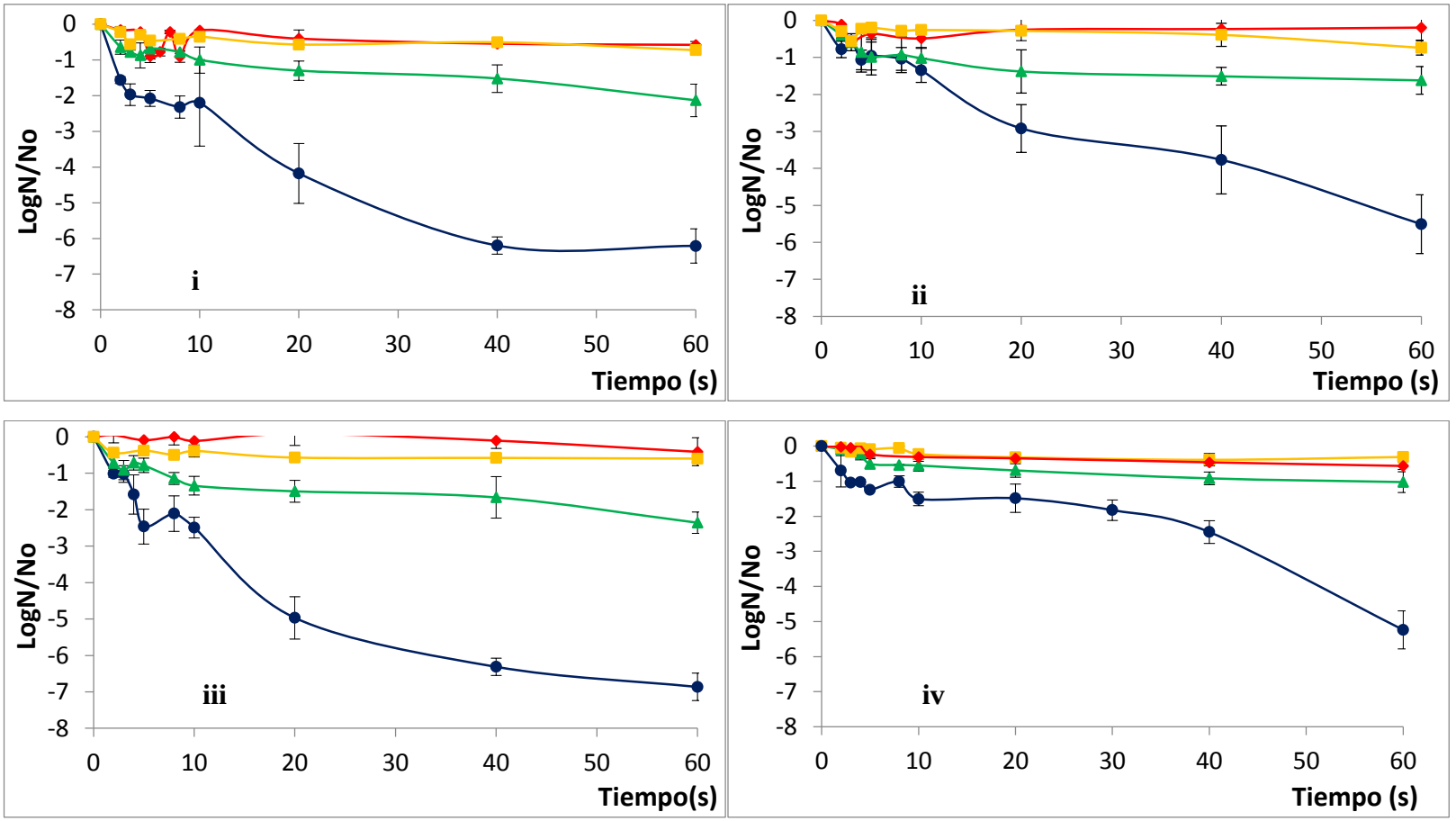


Figura 4.1.5. ***Continuación…***

b)



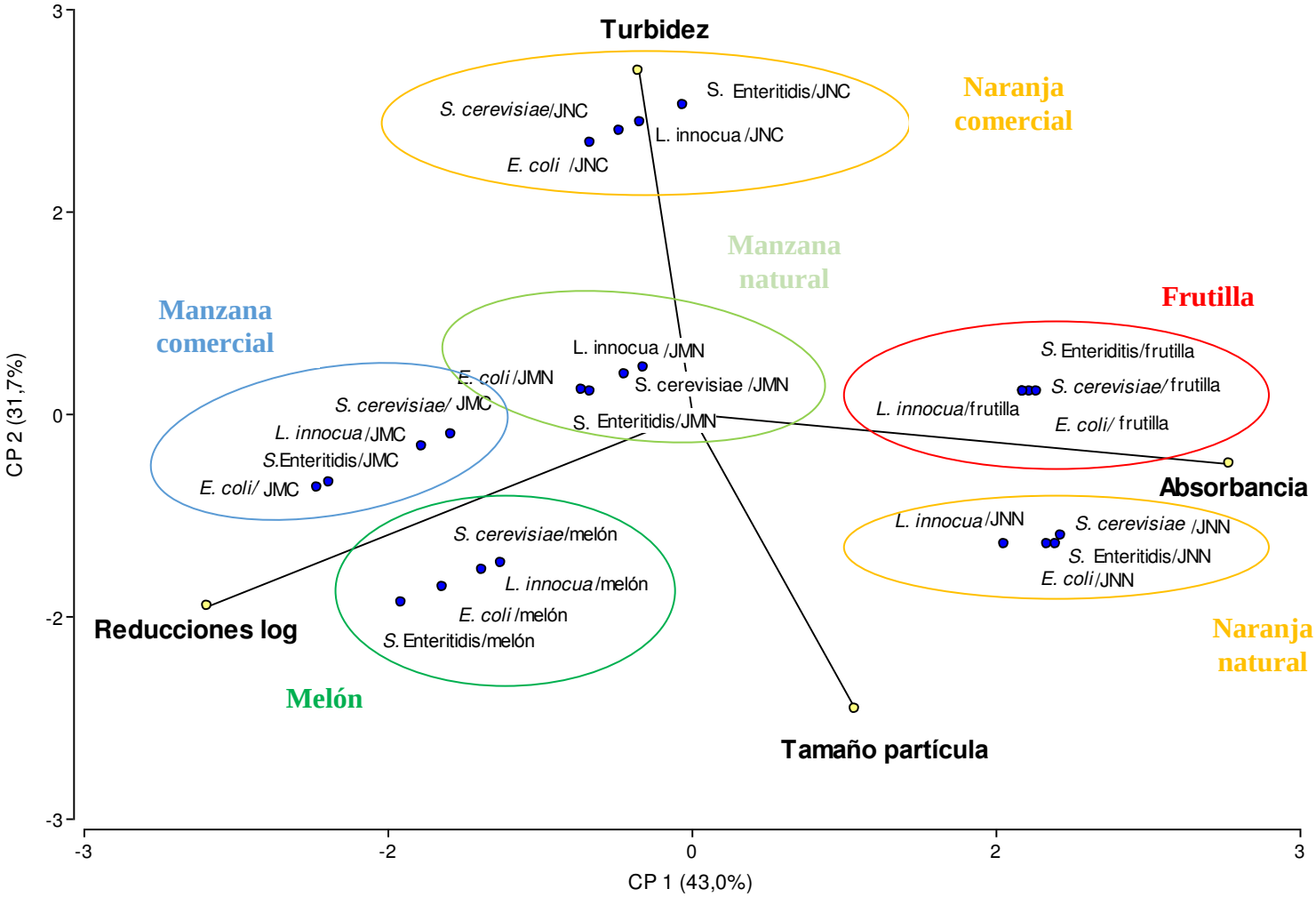
Complementariamente, se realizó un análisis PCA a modo de analizar las relaciones espaciales entre los parámetros $A_{254\ nm}$, turbidez y tamaño de partícula de los jugos y las reducciones logarítmicas obtenidas luego del tratamiento por LP_e. La tabla resultante y el gráfico bidimensional se ilustran en la **Tabla 4.1.2** y la **Figura 4.1.6,** respectivamente. EL *CCC* obtenido fue 0,94, indicando que se alcanzó una reducción adecuada con el análisis. El tratamiento de LP_e en los jugos de manzana comercial y de melón resultó el más efectivo, seguidos por los jugos de manzana natural y naranja comercial, y por últimos los jugos de frutilla y naranja naturales. A mayor inactivación, los jugos estuvieron caracterizados por menores valores de $A_{254\ nm}$. Mientras que las variables restantes (turbidez y tamaño de partícula) no presentaron una relación directa con las reducciones logarítmicas alcanzadas.

Tabla 4.1.2. Autovalores y correlaciones de las CP con las variables originales correspondientes al análisis de PCA de los parámetros de los jugos y las reducciones logarítmicas de con *E. coli*, *L. innocua*, *S. cerevisiae* o *S.* Enteritidis obtenidas luego del tratamiento por LP_e. En verde se resalta el número de CP retenidas y la proporción de la variabilidad acumulada por dichas CP. En azul y rojo se resaltan las variables de mayor peso que presentan correlación negativa y positiva, respectivamente.

Autovalores			
CP	**Valor**	**Proporción**	**Proporción acumulada**
1	3,22	0,43	0,43
2	1,02	0,32	0,75
3	0,91	0,21	0,96
4	0,66	0,04	1,00
CCC		0,943	

Correlaciones con las variables originales		
	CP1	**CP2**
Reducciones logarítmicas	-0,85	-0,44
Turbidez	-0,09	0,78
Absorbancia	0,95	-0,11
Tamaño de partícula	0,29	-0,67

Figura 4.1.6. Gráfico bidimensional correspondiente al PCA determinado para los parámetros de los jugos A $_{254\ nm}$, turbidez y tamaño de partícula con las reducciones logarítmicas de *E. coli*, *S. cerevisiae*, *L. innocua* y *S.* Enteritidis en jugos comerciales de manzana (JMC) y naranja (JNC) y naturales de melón, frutilla, manzana (JMN) y naranja (JNN)



4.2.3.1 Modelado matemático de la respuesta microbiana

Con el propósito de profundizar en el análisis de las curvas de inactivación entre los diferentes microorganismos y matrices estudiados, se aplicaron modelos matemáticos de predicción. Dado que la mayoría de las curvas de inactivación presentaron desviaciones significativas de la linealidad, se consideró apropiado aplicar regresión no lineal, teniendo en cuenta todas las partes de la curva de inactivación. Además, dentro de los modelos matemáticos no lineales se seleccionaron aquellos segregados que consideran comportamientos individuales dentro de una población microbiana permitiendo distinguir subpoblaciones. Se seleccionaron los siguientes modelos matemáticos: distribución de frecuencias tipo Weibull, bifásico y Coroller, los cuales fueron descriptos en detalle en **Materiales y Métodos, apartado 3.10,** aplicándose las **ecuaciones 3.13** a **3.19** de dicha sección. Cabe destacar que no fueron modelados los datos obtenidos de la inactivación de jugos naturales de naranja y frutilla de todos los microorganismos y de *S.* Enteritidis en jugo comercial de naranja dado que fue muy escasa la inactivación obtenida en estos casos.

La **Figura 4.1.7** presenta las curvas de inactivación de *E. coli*, *L. innocua*, *S.* Enteriditis y *S. cerevisiae* en jugos de manzana, melón, naranja y frutilla predichas por el modelo de Weibull (**ecuación 3.12**), el modelo bifásico (**ecuación 3.18**) y una versión modificada del modelo propuesto por Coroller y col. (2006) (**ecuación 3.19**) a los respectivos datos experimentales. La **Tabla 4.1.3** muestra los parámetros estimados a partir del ajuste de los tres modelos a los datos experimentales. En particular, en la **Tabla 4.1.4** se muestran los estadísticos asociados a la distribución de Weibull calculados a partir de las **ecuaciones 3.13** a **3.17** descriptas en **Materiales y Métodos, apartado 3.10** y en la **Figura 4.1.8** las distribuciones de frecuencias de resistencias correspondientes a los microorganismos inoculados en los distintos jugos. A modo de comparar la bondad del ajuste de los tres

Figura 4.1.7. Curvas de inactivación y ajuste por los modelos de Weibull (----), bifásico (.....) y Coroller modificado (—) para *E. coli* (i), *L. innocua* (ii), S. Enteriditis (iii) y *S. cerevisiae* (iv) en jugos de manzana (▲); melón (●); naranja (■) y frutilla (♦) tratados con LP_e. Valor experimental (punto); predicción (línea), (a) jugos comerciales; (b) jugos naturales exprimidos. Desvío estándar (I).

a)

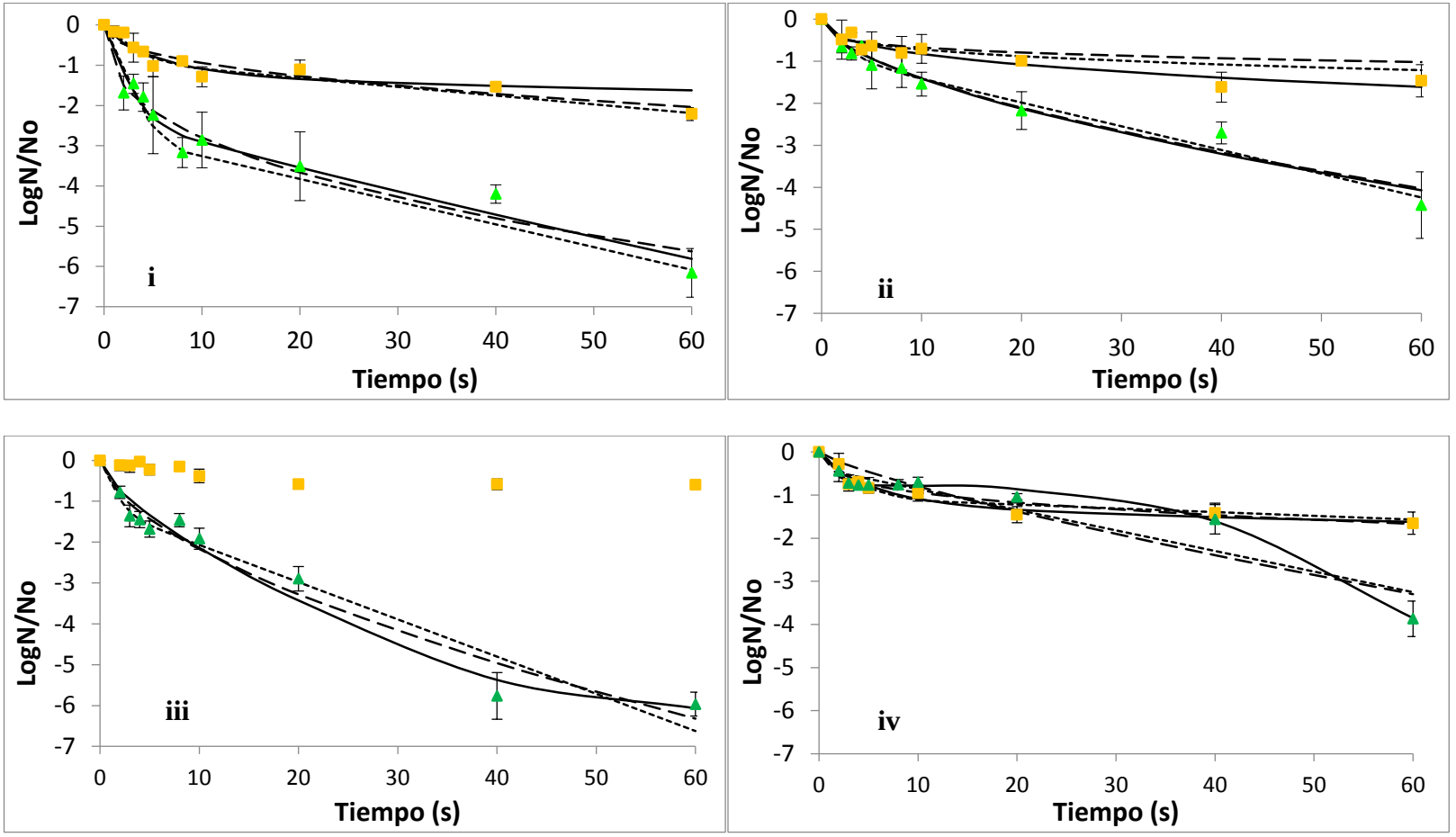


Figura 4.1.7. ***Continuación…***

b)

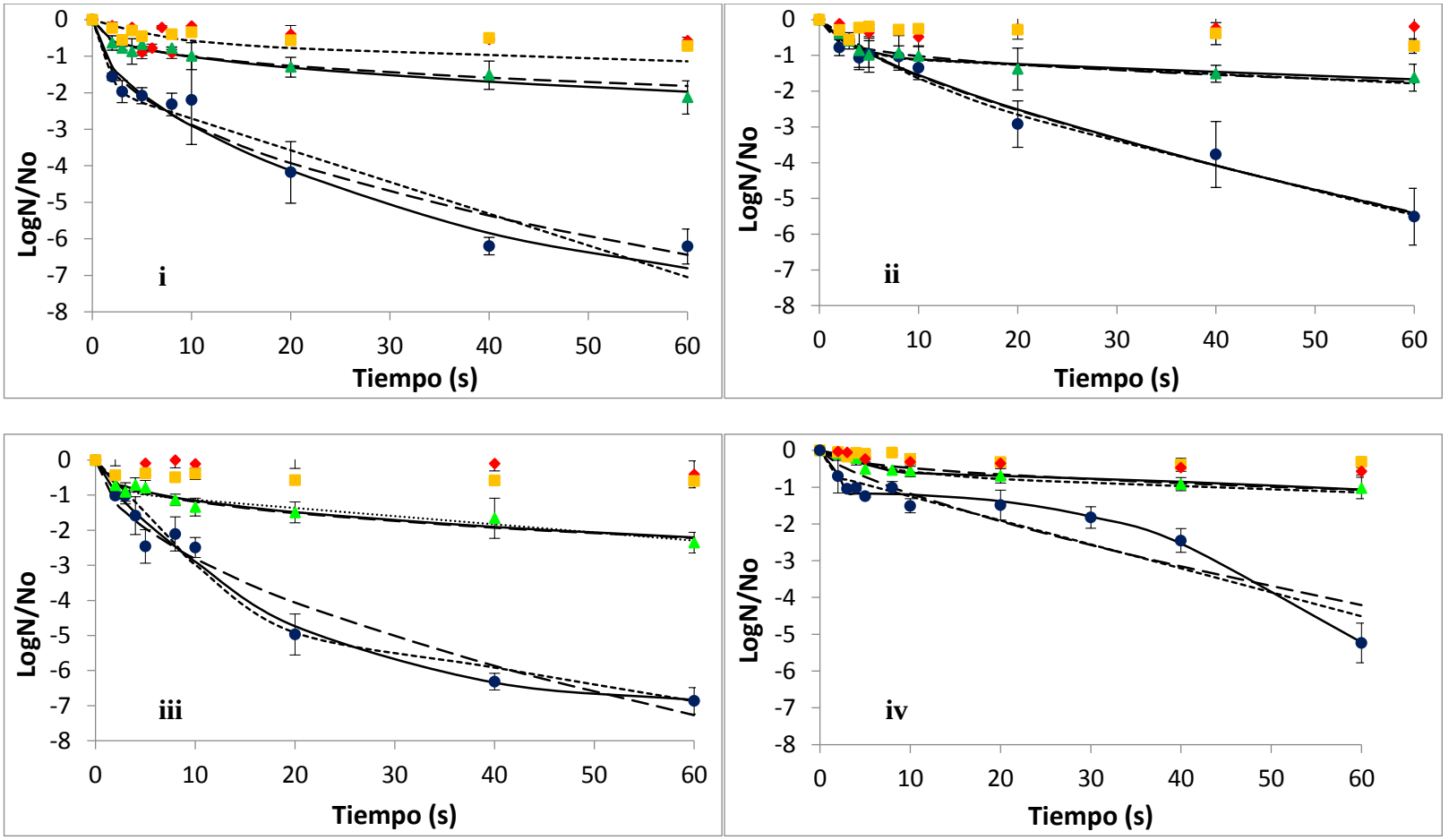


Tabla 4.1.3. Parámetros estimados correspondientes a los modelos de Weibull, bifásico y Coroller modificado representando a las curvas de inactivación de *E. coli*, *S. cerevisiae, L. innocua* y *S.* Enteritidis en jugos naturales y comerciales tratados con LP_e durante 60 s.

Jugo / Microorganismo		***Weibull***		***Bifásico***			***Coroller***			
		b (s^{-n})	***n*** (-)	***f*** (-)	***kmax₁*** (1/s)	***kmax₂*** (1/s)	***α*** (-)	***δ₁*** (s)	***p*** (-)	***δ₂*** (s)
		(s^{-n})	(-)	(-)	(1/s)	(1/s)	(-)	(s)	(-)	(s)
Manzana comercial Cepita	*E. coli*	$1,14^{***}$ (0,17)	$0,39^{***}$ (0,04)	$0,995^{***}$ (0,00)	$1,25^{***}$ (0,19)	$0,14^{***}$ (0,02)	$2,15^{**}$ (0,61)	$1,64^{**}$ (1,64)	$0,88^{**}$ (0,88)	$13,70^{ns}$ (13,73)
	S. cerevisiae	$0,13^{ns}$ (0,08)	$0,79^{***}$ (0,16)	$0,585^{***}$ (0,15)	$2,42^{ns}$ (29,05)	$0,11^{***}$ (0,01)	$0,69^{***}$ (0,04)	$2,33^{***}$ (0,18)	$3,22^{***}$ (0,27)	$42,30^{***}$ (1,25)
	L. innocua	$0,36^{***}$ (0,06)	$0,59^{***}$ (0,05)	$0,855^{***}$ (0,06)	$0,77^{**}$ (0,28)	$0,13^{***}$ (0,01)	$1,92^{ns}$ (++)	$5,55^{*}$ (++)	$0,59^{ns}$ (0,27)	$5,55^{ns}$ (++)
	S. Enteritidis	$0,55^{***}$ (0,11)	$0,60^{***}$ (0,05)	$0,927^{***}$ (0,05)	$1,28^{ns}$ (0,74)	$0,21^{***}$ (0,02)	$0,67^{*}$ (0,39)	$2,40^{*}$ (0,76)	$2,52^{***}$ (0,16)	$39,46^{**}$ (3,3)
Naranja comercial	*E. coli*	$0,35^{***}$ (0,07)	$0,43^{***}$ (0,06)	$0,868^{***}$ (0,05)	$0,60^{***}$ (0,14)	$0,05^{***}$ (0,01)	$4,87^{ns}$ (++)	$11,01^{ns}$ (++)	$0,43^{ns}$ (0,87)	$17,30^{ns}$ (++)
	S. cerevisiae	$0,45^{***}$ (0,07)	$0,32^{***}$ (0,05)	$0,910^{***}$ (0,03)	$0,53^{***}$ (0,02)	$0,02^{**}$ (0,01)	$1,13^{*}$ (0,46)	$5,60^{*}$ (2,33)	$0,66^{*}$ (0,31)	$195,20^{ns}$ (++)
	L. innocua	$0,37^{***}$ (0,07)	$0,29^{**}$ (0,06)	$0,792^{**}$ (0,06)	$0,61^{**}$ (0,28)	$0,04^{***}$ (0,01)	$0,36^{ns}$ (18)	$8,79^{ns}$ (++)	$0,43^{ns}$ (0,98)	$42,16^{ns}$ (++)

Tabla 4.1.3. ***Continuación…***

Jugo / Microorganismo		*Weibull*		*Bifásico*				*Coroller*		
		b (s^{-n})	***n*** (-)	***f*** (-)	***kmax*$_1$** (1/s)	***kmax*$_2$** (1/s)	***α*** (-)	***δ*$_1$** (s)	***p*** (-)	***δ*$_2$** (s)
Melón										
	S. cerevisiae	$0,23^{*}$ (0,12)	$0,71^{***}$ (0,14)	$0,749^{***}$ (0,15)	$2,92^{ns}$ (57,1)	$0,15^{***}$ (0,14)	$1,14^{***}$ (0,08)	$2,17^{***}$ (0,23)	$2,68^{***}$ (0,27)	$35,60^{***}$ (1,91)
	L. innocua	$0,32^{***}$ (0,06)	$0,69^{***}$ (0,05)	$0,947^{***}$ (0,07)	$0,43^{***}$ (0,43)	$0,16^{***}$ (0,03)	$0,91^{ns}$ (++)	$5,37^{ns}$ (++)	$0,70^{*}$ (0,33)	$5,37^{ns}$ (++)
	S. Enteritidis	$0,83^{***}$ (0,15)	$0,53^{***}$ (0,04)	$0,999^{**}$ (0,00)	$0,69^{***}$ (0,08)	$0,11^{**}$ (0,04)	$4,94^{***}$ (1,93)	$2,28^{***}$ (0,52)	$0,72^{***}$ (0,1)	$24,70^{ns}$ (39)
Manzana exprimido	*E. coli*	$0,44^{***}$ (0,05)	$0,37^{***}$ (0,04)	$0,798^{***}$ (0,03)	$1,5^{*}$ (0,72)	$0,05^{**}$ (0,00)	$1,34^{ns}$ (++)	$9,55^{ns}$ (++)	$0,37^{ns}$ (0,45)	$9,55^{ns}$ (++)
	S. cerevisiae	$0,17^{***}$ (0,04)	$0,45^{***}$ (0,06)	$0,765^{***}$ (0,07)	$0,24^{***}$ (0,06)	$0,02^{**}$ (0,01)	$0,48^{***}$ (0,09)	$6,85^{***}$ (1,27)	$1,51^{***}$ (0,41)	$100,4^{***}$ (22,04)
	L. innocua	$0,51^{***}$ (0,06)	$0,30^{***}$ (0,04)	$0,901^{***}$ (0,02)	$0,63^{***}$ (0,09)	$0,03^{***}$ (0,01)	$0,95^{***}$ (0,13)	$3,75^{***}$ (0,65)	$0,92^{***}$ (0,31)	$92,1^{***}$ (28)
	S. Enteritidis	$0,53^{***}$ (0,06)	$0,35^{***}$ (0,04)	$0,875^{***}$ (0,05)	$0,97^{***}$ (0,09)	$0,05^{***}$ (0,04)	$1,24^{ns}$ (++)	$6,63^{ns}$ (++)	$0,36^{ns}$ (0,45)	$6,64^{ns}$ (++)

(valor) error estándar de cada parámetro , ^{ns} no significativo;*** significativo al 0,1%; ** significativo al 1%; * significativo al 5%, (++) error estándar mayor a 50.

Tabla 4.1.4 Estadísticos asociados al modelo de Weibull[a,b] correspondientes a las curvas de inactivación de *E. coli*, *S. cerevisiae*, *L. innocua* y *S.* Enteritidis en jugos frutales tratados 60 s con LP_e.

Jugo/microorganismo		$\overline{t_c}$ (*s*)	σ^2_{tc} (s^2)	v_1 (-)
Manzana comercial Cepita	*E. coli*	2,6	70	11,5
	S. cerevisiae	15,1	374	2,8
	L. innocua	8,7	244	4,4
	S. Enteriditis	4,1	51	4,3
Naranja comercial	*E. coli*	31,6	+++	8,9
	S. cerevisiae	85,3	+++	21,7
	L. innocua	333,8	+++	31,3
Melón	*E. coli*	2,3	33	7,1
	S. cerevisiae	9,9	203	3,2
	L. innocua	6,7	99	3,4
	S. Enteriditis	2,6	28	5,4
Manzana exprimido	*E. coli*	38,5	+++	13,4
	S. cerevisiae	127,2	+++	7,8
	L. innocua	87,4	+++	27,5
	S. Enteriditis	30,9	+++	16,0

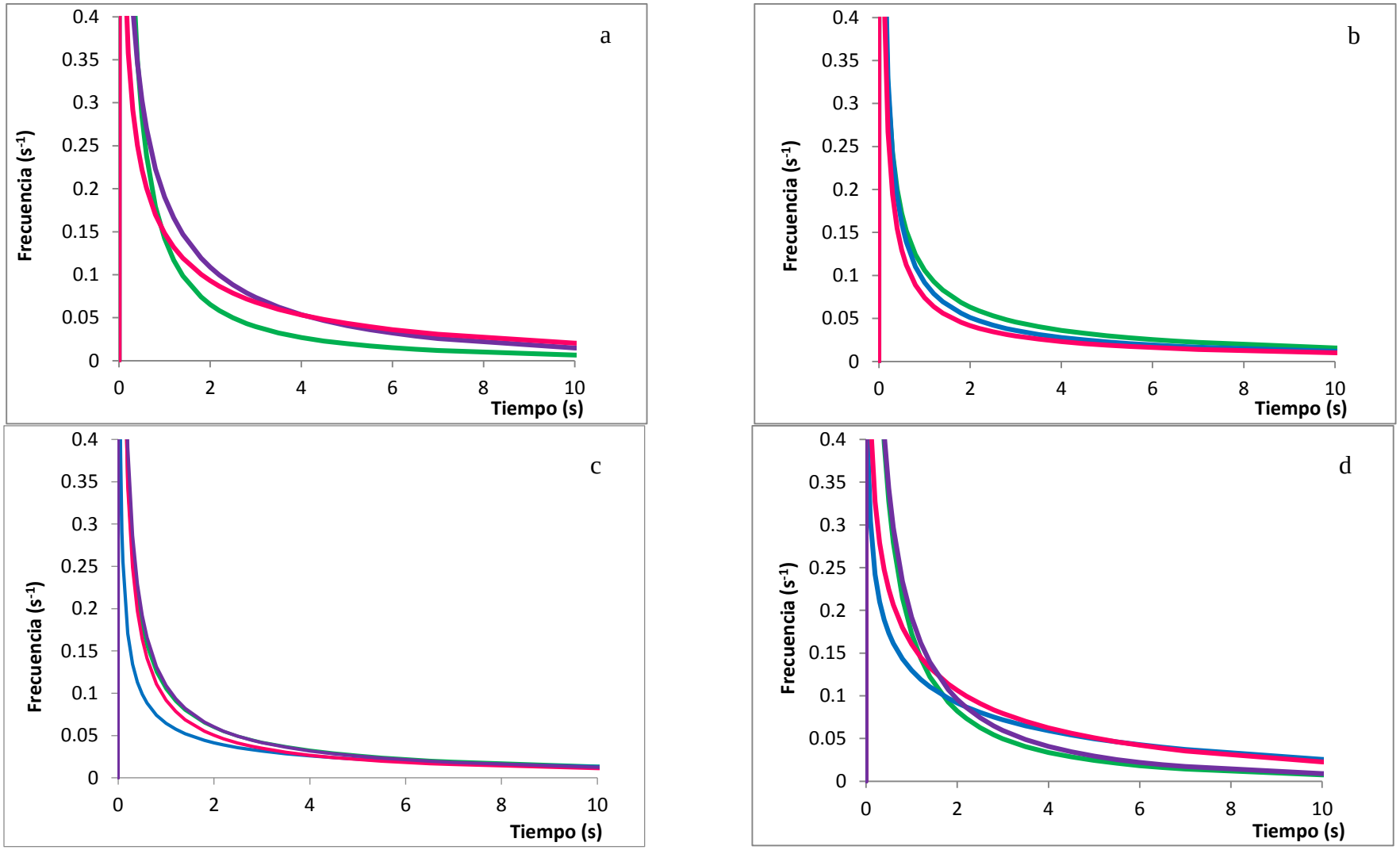
[a] Estadísticos del modelo de Weibull, $\overline{t_c}$ media de la distribución, σ^2_{tc} varianza, v_1 coeficiente de sesgo.[b] +++ Valor del estadístico mayor que 1000

Tabla 4.1.4. Valores de los índices de ajuste RSME, AIC y BIC[a] para las curvas de inactivación de los microorganismos ensayados en los jugos frutales tratados con LP_e.

Jugo	***Microorganismo***	***RMSE***			***AIC***			***BIC***		
		Weibull	*Coroller*	*Bifásico*	*Weibull*	*Coroller*	*Bifásico*	*Weibull*	*Coroller*	*Bifásico*
Manzana comercial	*E. coli*	0,41	0,39	**0,37**	-6,19	-5,37	**-8,72**	-5,80	-4,16	**-7,81**
	S. cerevisiae	0,45	**0,08**	0,31	-6,64	**-36,24**	-12,31	-6,04	**-35,03**	-11,41
	L. innocua	0,25	0,28	**0,23**	**-31,49**	-11,84	-18,21	**-30,89**	-10.63	-17,31
	S. Enteritidis	0,41	**0,21**	0,46	-8,34	**-17,64**	-4,21	-7,33	**-16,43**	-3,21
Naranja comercial	*E. coli*	0,22	0,24	**0,14**	-24,95	-18,18	**-34,15**	-24,15	-16,59	**-33,25**
	S. cerevisiae	0,16	**0,14**	0,17	-23,36	-21,03	**-23,44**	**-22,97**	-20,24	-22,85
	L. innocua	**0,15**	0,16	0,17	**-28,07**	-23,00	-24,25	**-27,46**	-21,79	-23,34
Melón	*E. coli*	0,45	**0,44**	0,60	**-16,74**	-6,39	2,67	**-15,94**	-5,17	3,26
	S. cerevisiae	0,60	**0,16**	0,51	-2,39	**-27,27**	-4,12	-1,6	**-25,68**	-2,93
	L. innocua	**0,26**	0,30	0,31	**-17,62**	-10,75	-12,36	**-17,02**	-9,54	-11,45
	S. Enteritidis	0,50	**0,12**	0,49	**-7,16**	-5,55	-2,86	**-6,76**	-4,34	-1,95
Manzana exprimida	*E. coli*	0,13	0,15	**0,10**	-31,49	-24,47	**-34,15**	-30,88	-23,26	**-33,25**
	S. cerevisiae	0,11	**0,08**	**0,08**	-35,32	-38,08	**-39,88**	-34,72	-36,87	**-39,98**
	L. innocua	0,13	0,11	**0,10**	-31,49	-30,73	**-34,26**	-30,89	-29,52	**-33,25**
	S. Enteritidis	**0,15**	0,16	0,17	**-28,78**	-23,17	-24,10	**-28,12**	-21,96	-23,2

[a] Los valores de RSME; AIC o BIC resaltados en negrita representa el mejor (mínimo) valor de la fila para la comparación de los modelos

Figura. 4.1.8 Distribuciones de frecuencia de resistencias según el modelo de Weibull para *E. coli* (—), *S. cerevisiae* (—), *S.* Enteritidis (—) y *L. innocua* (—) en jugos comerciales de manzana (a) y naranja (b) y naturales de manzana (c) y melón (d) tratadas con LP_e (60 s).



El modelo de Weibull resultó apropiado para representar los datos experimentales de inactivación, excepto en el caso de *S. cerevisiae* en jugo de manzana comercial (**Figura 4.1.6a, IV**) y jugo de melón (**Figura 4.1.6b, IV**) en donde los parámetros calculados del modelo resultaron no significativos. El modelo bifásico lineal (**Materiales y Métodos, ecuación 3.18**) fue apropiado para representar los datos de inactivación ya que se obtuvieron altos valores de coeficiente de determinación ajustado por grados de libertad, R^2_{aj}, que se encontraron comprendidos en un rango de 88,6 % y 99,7 % y bajos valores de RMSE (**Tabla 4.1.5**). El parámetro *f* descripto en la **ecuación 3.18** representa la fracción de la población sensible a la LP_e luego de aplicado el tratamiento. Esta fracción estuvo comprendida para *E. coli,* entre 0,798 (jugo de manzana natural) y 0,995 (jugo manzana comercial); para *S. cerevisiae*, entre 0,585 (jugo manzana comercial) y 0,910 (jugo naranja comercial); para *L. innocua,* entre 0,792 (jugo naranja comercial) y 0,947 (jugo melón) y para *S.* Enteritidis, entre 0,875 (jugo manzana natural) y 0,999 (jugo de melón) (**Tabla 4.1.3**). El tratamiento en jugo comercial de manzana inoculado con *S. cerevisiae* presentó el menor valor de *f* (*f* = 0,585, **Tabla 4.1.3**), hecho que indicaría la existencia de una importante subpoblación resistente a LP_e en comparación con los otros microorganismos y jugos evaluados. En contraste, *S.* Enteritidis en jugo de melón y *E. coli* en jugo comercial de manzana exhibieron los valores más altos del parámetro *f* (0,999 y 0,995, respectivamente) lo que muestra la presencia de una gran proporción sensible. El parámetro cinético $kmax_1$ resultó siempre significativamente mayor al parámetro $kmax_2$, indicando una alta tasa de inactivación durante los primeros 10 s de tratamiento (**Tabla 4.1.3**). Por ejemplo, *S. cerevisiae* mostró bajos valores de $kmax_2$ en jugo comercial de naranja y natural de manzana, sugiriendo la presencia de cola (es decir, población refractaria a LP_e). Por lo tanto, en estos casos, el tratamiento por LP_e luego de 10 s no contribuyó en mejorar la inactivación.

El modelo propuesto por Coroller y col. (2006) descripto en la **ecuación 3.19** no representó adecuadamente todas las curvas de inactivación. Respecto de la mayoría de las curvas de inactivación, el parámetro α, que representa la relación logarítmica entre la fracción de la población sensible (*f*) y la más resistente (*1-f*), resultó cercana o mayor a 1, indicando que la mayoría de la población resultó ser la

sensible, inactivándose durante los primeros segundos de tratamiento. El tiempo para la primera reducción decimal de dicha subpoblación sensible (δ_1) varió entre los 1,24 s (*E. coli*; jugo de melón) y 11,01 s (*E. coli,* jugo comercial de naranja) (**Tabla 4.1.3**). El parámetro correspondiente al tiempo para la primera reducción decimal de la subpoblación más resistente (δ_2) no resultó significativo en varios casos. El δ_2 varió considerablemente entre los sistemas y los microorganismos evaluados (5,37-195,20 s) (**Tabla 4.1.3**). Los casos en los cuales se obtuvieron altos valores de δ_2 (mayores a 60 s), implicarían que este modelo basado en la existencia de dos subpoblaciones, no caracterizó adecuadamente la inactivación por LP en el periodo de tiempo analizado. Estos resultados están en concordancia con los valores muy bajos de $kmax_2$ obtenidos a partir del ajuste por el modelo bifásico (por ejemplo, en el caso de *E. coli*/jugo de; *S. cerevisiae*/jugo de naranja comercial; *S. cerevisiae*/jugo de manzana natural y *L. innocua*/jugo de manzana natural; **Tabla 4.1.3**). La mayoría de las curvas de superviviencia obtenidas presentaron un notorio segundo periodo de desaceleración linear o no linear. El modelo de doble Weibull no ajustó adecuadamente este tipo de curvas; sin embargo, sí ajustó aquellas curvas que presentaron forma sigmoidea o un primer decaimiento seguido de un plateu, (por ejemplo las curvas de inactivación correspondientes a *S. cerevisiae* en jugo de manzana comercial y jugo de melón (**Figura 4.1.7 y Tabla 4.1.3**).

4.2.3.1.1 Análisis comparativo de los modelos matemáticos de predicción utilizados

A modo de evaluar la bondad de ajuste de los distintos modelos aplicados, se compararon los valores de RSME, AIC y BIC calculados tal como se describió en **Apéndice, apartado 6.3**.

Los modelos de Coroller y bifásico presentaron bondad de ajuste similar en base al análisis de los valores del estadístico RMSE. El modelo bifásico mostró mejor desempeño con 7 bajos valores de RSME de 15 evaluados, seguido por el modelo de Coroller con 6 bajos valores. En particular, para los sistemas de jugo de melón, se hallaron diferencias en el valor de RMSE a favor del modelo de Coroller (**Tabla 4.1.4**). Sin embargo, este modelo tuvo pobre rendimiento predictivo en la

mayoría de los casos, de acuerdo a los valores de los estadísticos AIC y BIC, que tienen en cuenta tanto el ajuste como la parsimonia (Coroller y col., 2006). Es probable, que este modelo resultase en sobreajuste y que los criterios de AIC y BIC penalicen el número de parámetros ejerciendo un balance entre el ajuste del modelo y su parsimonia. Sólo en tres casos, hubo amplias diferencias en los criterios de AIC y BIC a favor del modelo de Coroller (**Tabla 4.1.4**), correspondiéndose a las curvas de inactivación de *S. cerevisiae* en jugo de melón y jugo de manzana comercial y a *S.* Enteritidis en jugo de manzana comercial, que presentaron forma sigmoidea.

El análisis de los valores de AIC y BIC determinó en general, que los modelos de Weibull y bifásico presentaron mejor ajuste a los datos experimentales de inactivación por LP_e, menos parámetros o ambas cosas simultáneamente.

4.2.3.1.2 Análisis de componentes principales para los parámetros de los modelos.

El análisis PCA aplicado a las curvas de inactivación obtenidas luego del tratamiento con LP_e, permitió observar las relaciones espaciales entre los parámetros estimados a partir de los modelos de Weibull y bifásico. El modelo de Coroller no fue incluido en este análisis dado que ajustó adecuadamente muy pocos datos experimentales. Las representaciones bidimensionales resultantes del análisis PCA (bi-plot) se muestran en la **Figura 4.1.9**. El *CCC* obtenido fue 0,93, lo que indica que se alcanzó una adecuada reducción con el análisis (**Tabla 4.1.6**).

Sólo se retuvieron las dos primeras componentes principales (CP_1 y CP_2), las cuales explicaron el 53,7 % y el 17,0 % de la varianza, respectivamente; es decir un más del 70% del total de la variabilidad de los datos (**Tabla 4.1.6**). La CP_1 separó la media, la varianza y el sesgo, que presentaron asociación positiva, del parámetro $kmax_2$ (asociado negativamente). Por otra parte, la CP_2 se asoció de manera positiva con $kmax_1$. El tratamiento con LP_e en jugo de manzana comercial inoculado con bacterias Gram-negativas (*S.* Enteritidis y *E. coli*) resultó el más efectivo ya que estuvo asociado con una alta fracción de la subpoblación sensible (α) e incluso la fracción más resistente mostró una alta tasa de inactivación ($kmax_2$). En conformidad con estos resultados, se obtuvieron bajos valores de media (*tc*), varianza y sesgo. *L. innocua* en esta matriz exhibió la menor sensibilidad al

tratamiento ya que presentó menores valores de los parámetros del modelo bifásico y mayores valores para los parámetros del modelo weibulliano que las bacterias Gram-negativas.

El tratamiento de LP_e en melón también resultó muy efectivo ya que se obtuvieron altos valores de α y $kmax_2$; y baja media, sesgo y varianza. Nuevamente, *S.* Enteritidis resultó más sensible que *L. innocua* ya que presentó mayores valores de α y $kmax_2$. En jugo de manzana exprimido, se obtuvo una gran heterogeneidad en la respuesta: las bacterias Gram-negativas resultaron más sensibles a LP_e, siendo más importante la asociación de *E. coli* con $kmax_1$. *S. cerevisiae* en esta matriz fue la cepa más resistente ya que exhibió menor tasa de ($kmax_1$) que *L. innocua*. En jugo de naranja comercial, *E. coli* resultó nuevamente la cepa más sensible dado que presentó menores valores de los parámetros weibullianos, mientras que *L. innocua* fue la más resistente.

Tabla 4.1.6. Autovalores y correlaciones de las CP con las variables originales correspondientes al análisis de PCA de los parámetros obtenidos del ajuste de las curvas de inactivación de los parámetros de las curvas de inactivación obtenidas luego del tratamiento por LP_e, ensayados e inoculados con *E. coli*, *L. innocua*, *S. cerevisiae* o *S.* Enteritidis. En verde se resalta el número de CP retenidas y la proporción de la variabilidad acumulada por dichas CP. En azul y rojo se resaltan las variables de mayor peso que presentan correlación negativa y positiva, respectivamente.

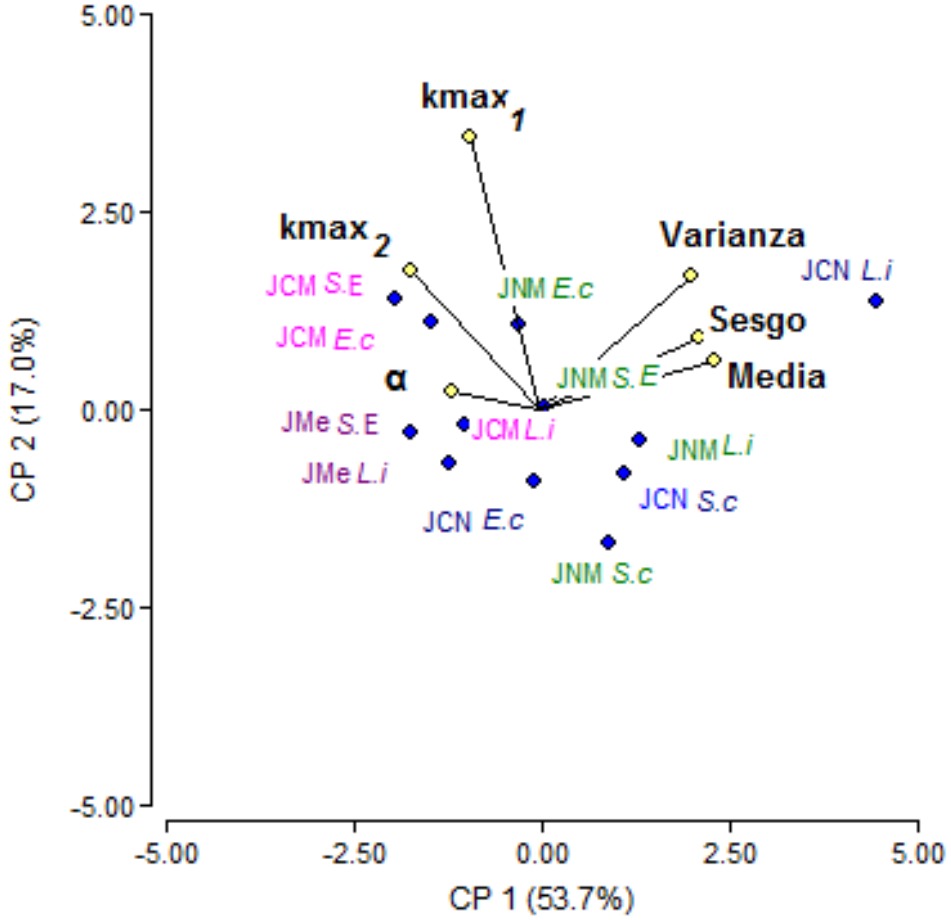
a

Autovalores			
CP	**Valor**	**Proporción**	**Proporción Acumulada**
1	3,22	0,54	0,54
2	1,02	0,17	0,71
3	0,91	0,15	0,86
4	0,66	0,11	0,97
5	0,16	0,03	1,00
CCC		0,926	

b

Correlaciones con las variables originales		
Variables	**CP_1**	**CP_2**
Media	0,53	0,14
$kmax_1$	-0,22	0,79
$kmax_2$	-0,40	0,40
Varianza	0,45	0,39
Sesgo	0,48	0,21
α	-0,28	0,05

Figura 4.1.9 Bi-plot del análisis de componentes principales (PCA) correspondiente a los parámetros de las curvas de inactivación obtenidas luego del tratamiento por LP_e, en jugo comercial (JCM) y natural (JNM) de manzana, jugo comercial de naranja (JCN) y jugo natural de melón (JMe), inoculados con *E. coli* (*E.c*), *L. innocua* (*L.i*), *S. cerevisiae* (*S.c*) o *S.* Enteritidis (*S.*E).



La **Figura 4.1.10** presenta distintos instrumentos gráficos de validación interna de los modelos elegidos, lo cuales permiten verificar la adecuación de los mismos, tal como se describe en el **Apéndice, sección 6.4**. A modo de ilustración se muestran sólo algunas de las condiciones evaluadas. El análisis de la gráfica de los valores observados en función de los valores predichos por el modelo mostró en todos los casos una distribución cercana a la línea diagonal, hecho que indica que los valores predichos resultaron muy parecidos a aquellos obtenidos experimentalmente. En los gráficos de los residuales en función de los valores predichos se observa, en general para todas las condiciones, una distribución de los residuales uniforme y horizontal en torno de los valores predichos, hecho que indica homocedasticidad. En ningún caso se observó forma de cono o herradura.

Figura 4.1.10. Ejemplos de validación interna para los modelos de Weibull y bifásico que representan las reducciones logarítmicas de *E. coli* en jugo de manzana natural sometido a LP_e durante 60 s (71,4 J/cm^2). a) Valores observados vs valores predichos por el modelo propuesto. b) Residuales vs valores predichos por el modelo propuesto.

Modelo de Weibull

a)

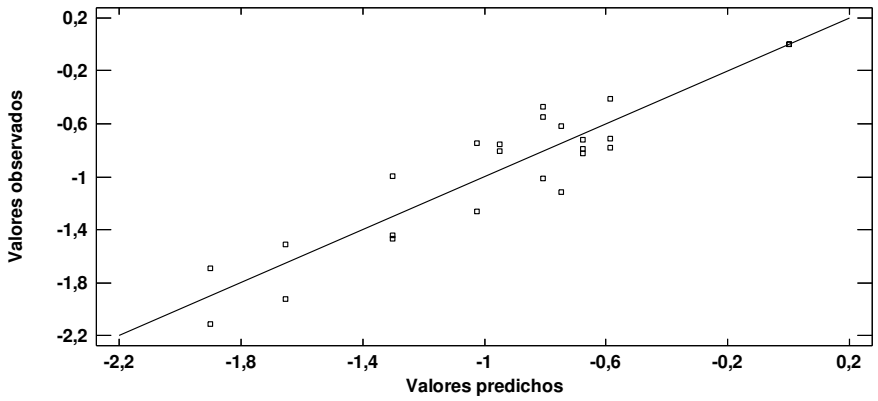
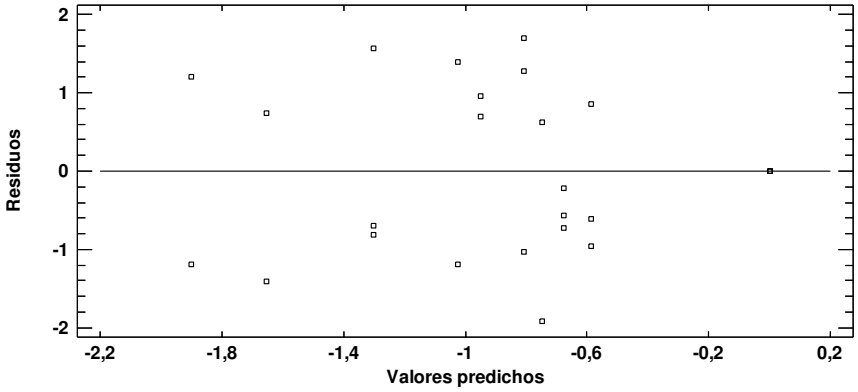


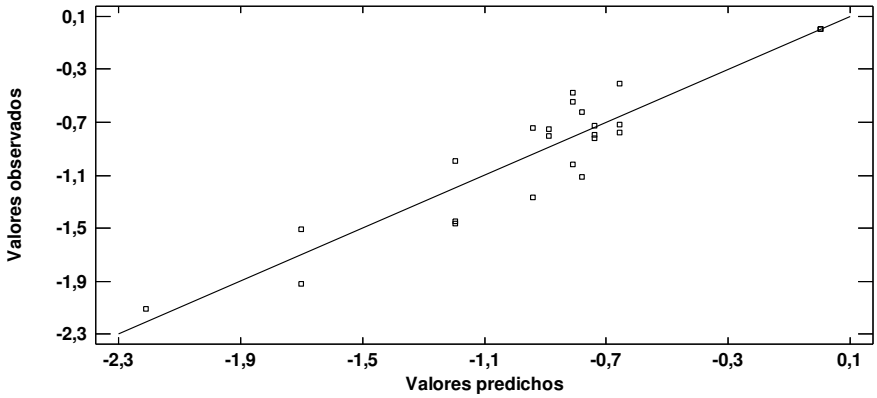
Figura 4.1.10. ***Continuación …***

b)

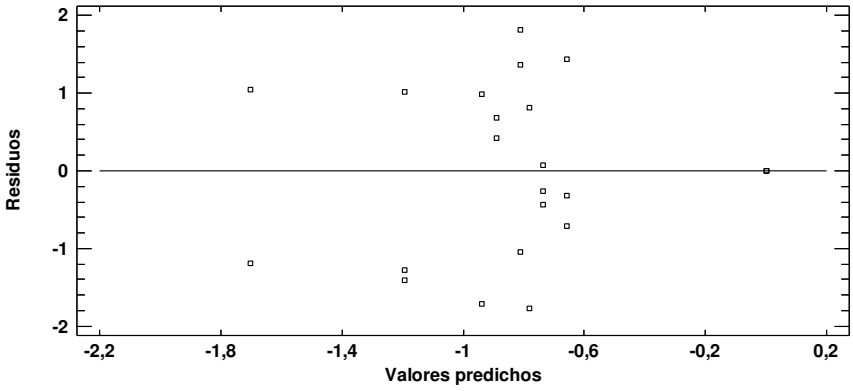


Modelo bifásico

a)



b)



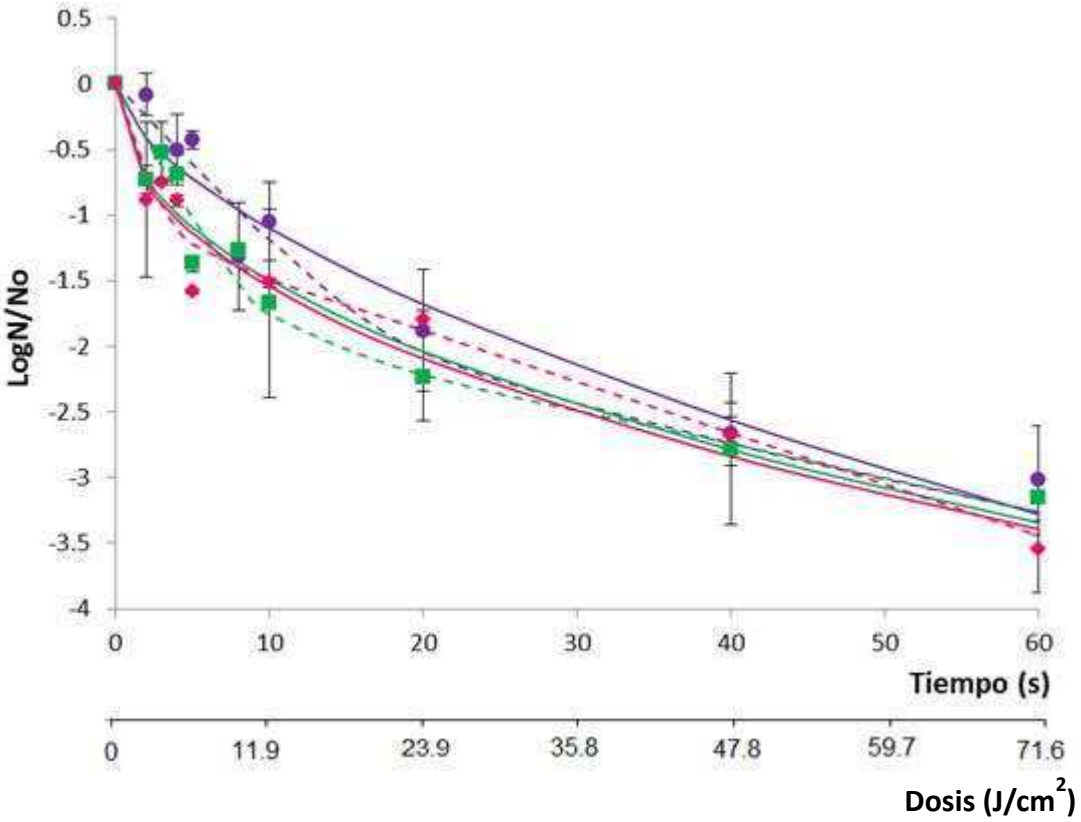
4.2.3.1.3 Utilización de esporas de A. acidoterrestris para determinar la influencia de la contaminación inicial del jugo de manzana en la efectividad del tratamiento por LP_e

Con el propósito de evaluar la influencia de la contaminación inicial del jugo de manzana en la efectividad del tratamiento por LP_e, se evaluaron tres concentraciones diferentes de inóculo inicial de un microorganismo deteriorativo relevante en la contaminación de jugos como *A. acidoterrestris*. El estudio de inactivación de esta bacteria es de suma importancia dado que no es eliminada por los tratamientos térmicos convencionales. La **Figura 4.1.11** muestra la inactivación y el ajuste por los modelos de Weibull y bifásico de las esporas de *A. acidoterrestris*, con distinta concentración inicial, en jugo de manzana comercial tratado con LP_e. Las curvas presentaron una marcada concavidad hacia arriba, con una importante caída durante los primeros 5-10 s de tratamiento, seguidos de una menor tasa de inactivación. Luego de 60 s de procesamiento se alcanzaron entre 3,0 y 3,5 reducciones logarítmicas según la concentración ensayada. En ningún caso se observó presencia de hombro inicial. El modelo weibulliano ajustó adecuadamente los datos experimentales con valores del coeficiente de determinación, R_{aj}^2, en el rango de 94 a 95% y niveles de significación para el estadístico Fisher muy altos ($\alpha < 0{,}001$) (**Tabla 4.1.7**).

En concordancia con estos resultados, Chaine y col. (2012) reportó una reducción de 4 ciclos log de esporas de *A. acidoterrestris* tratadas con LP en flujo continuo (1,5 J/cm^2) en jarabe de azúcar (65 °Brix). Los datos de las curvas de inactivación fueron modelados aplicando la forma acumulativa de la distribución de frecuencia de resistencias de Weibull (Peleg y col., 1998) y el modelo bifásico propuesto por Cerf (1977) los cuales fueron descriptos en detalle en **Materiales y Métodos, apartado 3.10**. (**Figura 4.1.11**).

Los valores de los parámetros b y n fueron utilizados para obtener las distribuciones de frecuencia de resistencias correspondientes a los distintos microorganismos estudiados (**Figura 4.1.12**).

Figura 4.1.11. Curvas de inactivación (punto) y ajuste por los modelos de Weibull (línea continua) y bifásico (línea punteada) correspondientes a esporas de *A. acidoterrestris* en jugo de manzana comercial, tratados por LP_e durante 60 s (dosis máxima 71,64 J/cm^2). Concentración inicial: 10^3(♦), 10^4 (■) y 10^6 (●)



Todas las distribuciones carecieron de moda, con bajos valores de media y presentaron importantes sesgos a la derecha y cola escasamente marcada hasta los primeros 10 s de tratamiento. Se encontró que las distribuciones de frecuencias resultaron similares para las tres concentraciones de inóculo, e incluso se superpusieron completamente en el caso de los inóculos bajo (10^3) y medio (10^4) (**Figura 4.1.11**, **Tabla 4.1.8**).

Tabla 4.1.7. Parámetros estimados de los modelos de Weibull y bifásico y valores de RMSE, AIC y BIC para estimar la inactivación de esporas de *A. acidoterrestris* por LP_e durante 60 s (71,64 J/cm^2) en jugo de manzana comercial.

	Weibull					***Bifásico***					
Tamaño inóculo	***b*** ***(s^{-n})***	***n*** ***(-)***	***RMSE***	***AIC***	***BIC***	***f*** ***(-)***	***$kmax_1$*** ***(1/s)***	***$kmax_2$*** ***(1/s)***	***RMSE***	***AIC***	***BIC***
10^6	0,27** (0,07)	0,60*** (0,07)	0,24	4,62	5,27	0,98*** (0,03)	0,29*** (0,04)	0,06** (0,02)	**0,20**	**0,17**	**0,96**
10^4	0,53*** (0,08)	0,45*** (0,04)	**0,22**	**2,00**	**2,91**	0,98*** (0,02)	0,50*** (0,07)	0,06** (0,02)	0,22	2,09	3,30
10^3	0,56*** (0,09)	0,44*** (0,05)	0,24	3,28	3,87	0,92*** (0,03)	0,92** (0,24)	0,09*** (0,01)	**0,20**	**1,65**	**2,44**

(valor) error estándar;*** significativo al 0,1 %; ** significativo al 1 %. Los valores en negrita de RSME, AIC o BIC representan el mejor valor de la fila para la comparación de modelos.

Figura 4.1.12. Distribuciones de frecuencias de resistencias según el modelo de Weibull para esporas de *A. acidoterrestris* en jugo de manzana tratado con 60 s LP_e (dosis máxima 71,64 J/cm^2). Concentración de inóculo 10^3 (- - -), 10^4 (—) y 10^6 (—).

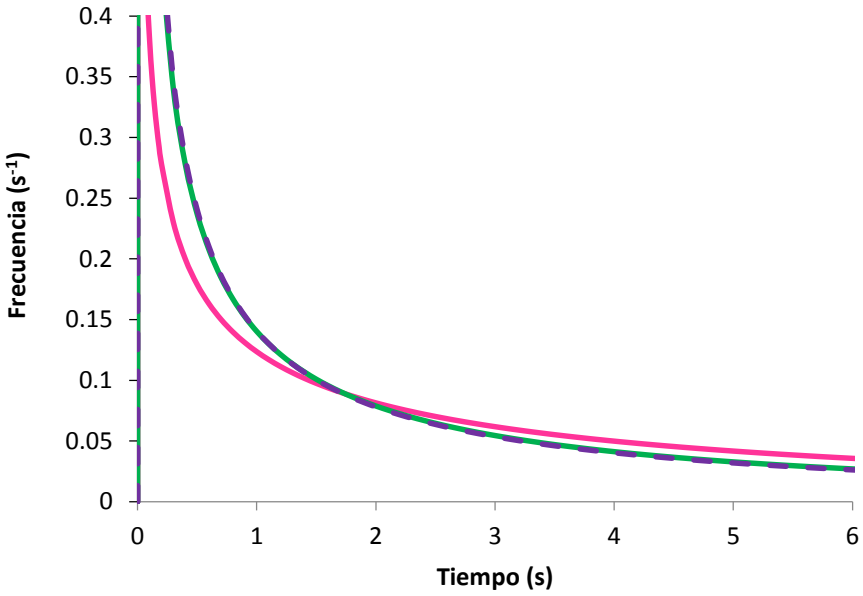


Tabla 4.1.8. Parámetros estadísticos asociados al modelo de Weibull correspondientes a la inactivación de esporas de *A. acidoterrestris* en jugo de manzana tratado con LP_e durante 60 s (dosis máxima 71,64 J/cm^2).

Tamaño inóculo	***t_{cm} (s)***	***t_c (s)***	***varianza (s^2)***	***sesgo (-)***
10^6	–	13,34	549,99	4,26
10^4	–	10,16	701,32	7,83
10^3	–	9,75	690,90	8,28

El modelo bifásico ajustó adecuadamente los datos experimentales de todas las curvas de inactivación con valores de coeficiente de determinación, R_{aj}^2, en el rango de 95 a 96 % y bajos valores de raíz cuadrada de cuadrados medios, RMSE. Según este modelo, las curvas de inactivación presentaron una tasa de inactivación muy pronunciada en los primeros 5 -15 s de tratamiento seguido por una segunda porción de la curva con menor tasa de inactivación. Esto se pone de manifiesto al

analizar los altos valores de *f* obtenidos para los tres tamaños de inóculo (**Tabla 4.1.7**) los cuales indican que la mayor proporción de la población corresponde a la subpoblación sensible al tratamiento por LP. Por otra parte, la menor concentración de inóculo ensayada, presentó una considerable tasa de inactivación correspondiente a la subpoblación más sensible (k_{max_1}), respecto a los demás tamaños de inóculo.

Los modelos de Weibull y bifásico presentaron igual bondad de ajuste por presentar similares valores de RMSE. Sin embargo, el modelo bifásico, presentó menores valores de AIC y BIC en dos de tres casos analizados. Dichos criterios, evalúan el ajuste y la parsimonia del modelo de manera conjunta (Coroller y col., 2006). El buen ajuste del modelo bifásico, a pesar de tener más parámetros que modelo de Weibull, apoya la existencia de dos subpoblaciones que difieren en su resistencia al tratamiento por LP.

La **Figura 4.1.13** muestra el gráfico en dos dimensiones del PCA obtenido entre los parámetros de los modelos y el tamaño de inóculo. El parámetro *CCC* resultó igual a 1, lo cual asegura una adecuada reducción de la información con este análisis. La componente principal 1 (CP 1), la cual explicó el 80,5 % de la varianza, estuvo asociada a positivamente a k_{max_1} y al sesgo, y negativamente a la media. La CP 2, explicó el 19,5 % restante de la varianza, y mostró asociación positiva con k_{max_2} y negativa con f y la varianza. El análisis mostró que el tamaño de inóculo de 10^3 estuvo asociado a mayor tasa de inactivación de la subpoblación más sensible (k_{max_1}) y menor valor de media de la distribución de Weibull y mayor sesgo; seguido por el tamaño 10^4 y por último 10^6. Esto se asociaría al "efecto sombra" donde los microorganismos de las capas superiores no permiten que la luz actúe sobre aquellos que se encuentran en las capas inferiores (Gómez-López y col., 2007).

El análisis de regresión múltiple indicó que el término Log N/N_o fue el de mayor importancia, seguido por el término cuadrático $(\text{Log } N/N_o)^2$ y por último la concentración $(\text{Log } C)^2$ (**Tabla 4.1.9**). La ecuación del modelo ajustado resultó:

$$t_{LPe} = 0,45 + 8,59 \times \text{Log } N/N_o + 0,16 \times \text{Log } C^2 + 7,88 \times \text{Log } N/N_o^2 - 0,24 \times \text{Log } C * \text{Log } N/N_o \quad (4.1)$$

Figura 4.1.13. Gráfico bidimensional correspondiente al análisis de componentes principales (PCA) de la asociación entre los parámetros de los modelos de Weibull y bifásico y la concentración de inóculo.

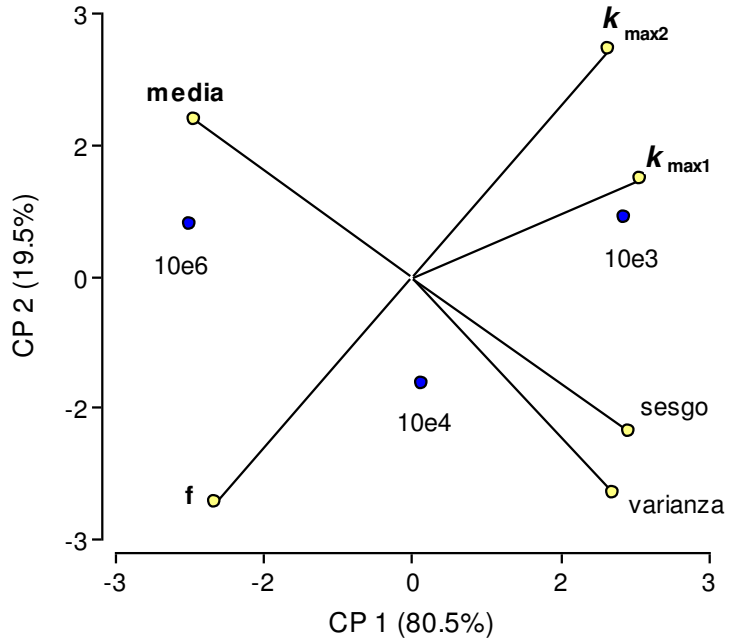


Tabla 4.1.9. Estimadores de los parámetros del modelo de regresión múltiple para predecir el tiempo de tratamiento por LP_e requerido para lograr determinado grado de inactivación de las esporas de *A. acidotrerrestris* en jugo de manzana y la concentración de esporas.

Parámetro	GL	Estimador	t	p
Constante	1	0,45	0,153076	0,8800
Log N/N_o	1	8,59	2,28466	0,0340
$(Log\ C)^2$	1	0,16	1,49063	0,1525
$(Log\ N/N_o)^2$	1	7,88	9,10979	0,0000
Log CxLog N/N_o	1	-0,24	-0,423187	0,6769

GL: Grados de libertad; t: estadístico de student; p: significación

La **Tabla 4.1.10** muestra que el término lineal y cuadráticos $(Log\ N/N_o)^2$ y $(Log\ C)^2$ tiene peso sobre el tiempo de LP_e, pero el productos cruzado LogC*LogN/N_o resultó no significativo.

Tabla 4.1.10. Análisis de la varianza mostrando la significación de los términos lineales, cuadráticos y de en la inactivación de esporas de *A. acidoterrestris* tratadas por LP_e.

Fuente	SC	GL	CM	F
Modelo	6976,5	4		
Log N/N_o	6062,2	1	6062,2	636,94****
$(Log\ C)^2$	122,7	1	122,7	12,89****
$(Log\ N/N_o)^2$	789,9	1	789,8	82,99****
Log C*Log N/N_o	1,7	1	1,7	0,18ns
Residual	180,8	19	9,5	
TOTAL	7157,3	23		
R^2_{aj}		97,0		

GL: Grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios; F: estadístico de Fisher; **** significativo al 0,01%; ns, no significativo

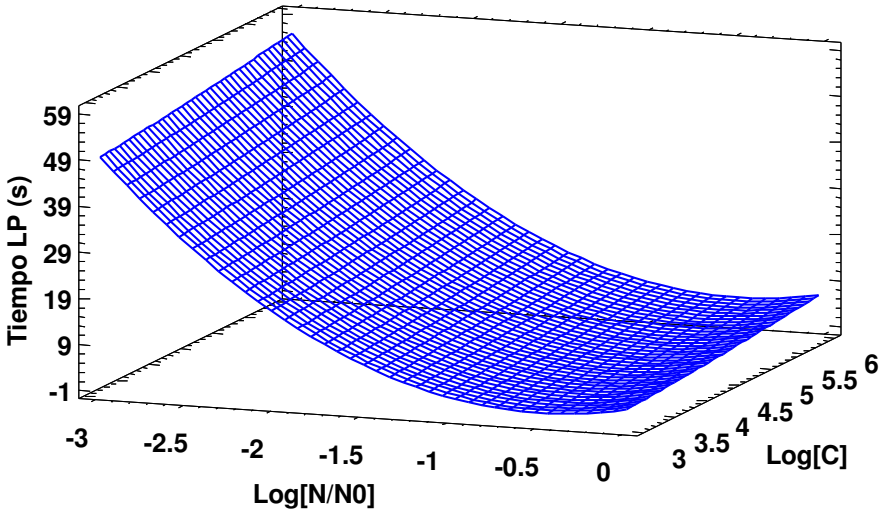
La **Figura 4.1.14** muestra la superficie de respuesta y el grafico de contorno correspondientes a las esporas de *A. acidoterrestris* en jugo de manzana, la cual ilustra la relación entre el tiempo de tratamiento por LP_e requerido para lograr una dada inactivación (o reducciones logarítmicas) y la concentración inicial de inóculo en el jugo de manzana. Como se observa en la **Figura 4.1.14a**, si bien a menor concentración de inóculo (Log C), menor es el tiempo requerido para lograr una dada inactivación de esporas de *A. acidoterrestris*; el factor Log N/N_o resultó el parámetro de mayor peso en la predicción del tiempo de procesamiento de jugo de manzana por LP_e. Asimismo, la curvatura de la superficie obtenida evidencia el peso de los términos cuadráticos en la definición de la ecuación predictiva (**Tablas 4.1.9** y **4.1.10**). En la **Figura 4.1.14b**, se muestra el gráfico de contorno correspondiente a los distintos tiempos de procesamiento por LP_e requeridos para obtener una dada reducción de las esporas de *A. acidoterrestris* en jugo de manzana, según el tamaño de inóculo. Puede observarse la menor influencia de la concentración inicial de inóculo, dado que, para una dada reducción logarítmica de la población, este parámetro influye levemente en el tiempo de tratamiento por LP_e requerido. En sentido inverso, puede verse que para una determinada concentración de inóculo el tiempo de tratamiento por LP_e se incrementa con la reducción requerida, con una tasa de cambio mayor cuanto mayor es el requerimiento de reducción. Además se

observa que, si se requiere 1 ciclo logarítmico de reducción, se precisarán no más de 6 s de tratamiento LP_e, independientemente de la concentración inicial de esporas; pero si se requiere de una reducción en la población de esporas de *A. acidoterrestris* de entre 1,1 y 3 ciclos logarítmicos, se precisarán tiempos de tratamiento LP_e mayores a 6 s y menores a 60 s, incrementándose dicho valor con el incremento en ambas variables, concentración de inóculo, Log C y reducción logarítmica, Log N/N_o. En particular, la mayor dependencia del tamaño de inóculo con la concentración, se observa cuando se requieren bajos valores de reducción logarítmica. Por ejemplo, para alcanzar una reducción de 1,4 ciclos logarítmicos se precisan menos de 6 s de tratamiento si la concentración de inóculo es de 1.10^3, pero para concentraciones más altas se requieren entre 6 y 12 s de procesamiento; en cambio, para alcanzar 2,9 reducciones logarítmicas se requieren 42-48 s para las concentraciones 1.10^3 y 1.10^4 y 48-54 s para 1.10^6. Es decir, que a mayores reducciones requeridas, la dependencia con el tamaño de inóculo se hace notoria sólo para la alta concentración de inóculo.

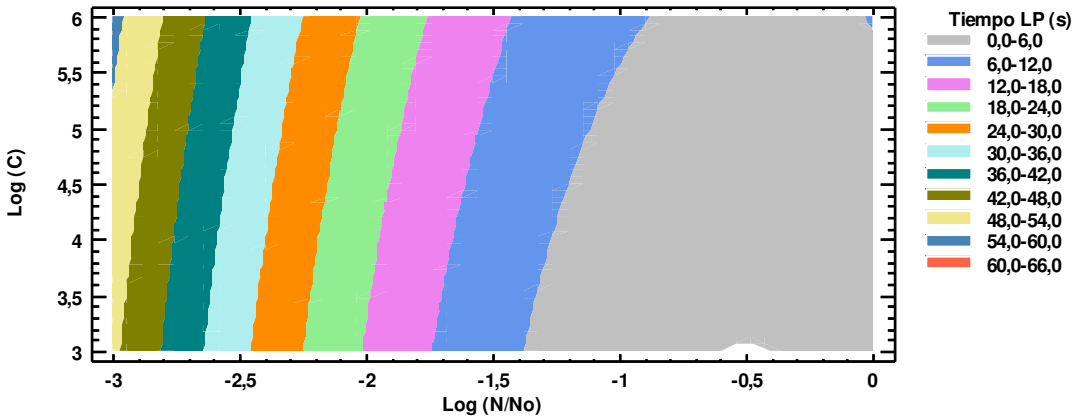
En concordancia con estos resultados, Gómez-López y col., (2005) estudiaron la inactivación de *L. monocytogenes* inoculada en agar nutritivo y tratado por LP (sistema estanco, 50 flashes LP a 8,4 cm distancia respecto de la lámpara) a distintos niveles de contaminación inicial (1.10^5-1.10^8). Estos autores reportaron que la eficiencia de la descontaminación por LP disminuye al aumentar el nivel de contaminación inicial. A altas concentraciones, los microorganismos de las capas superiores lograrían inactivarse, mientras que ejercerían una sombra sobre los restantes impidiéndoles el acceso de la luz.

Figura 4.1.14. Superficie de respuesta (a) y contorno (b) correspondiente del efecto de la concentración de inóculo (Log C) y las reducciones logarítmicas (Log N/N_o) en el tiempo de procesamiento por LP_e de jugo de manzana.

a)



b)



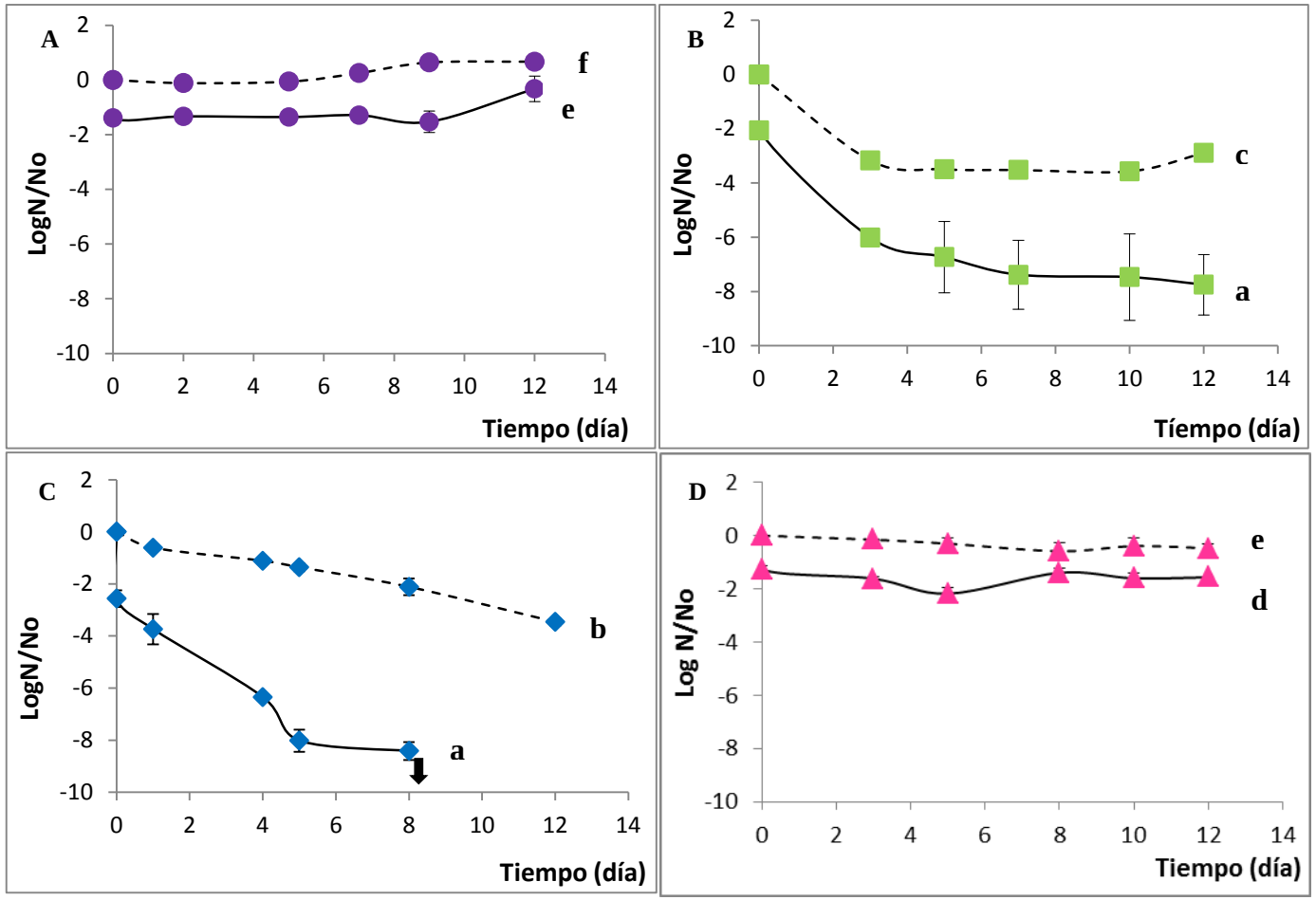
4.2.3.1 Dinámica del crecimiento de poblaciones microbianas sobrevivientes durante el almacenamiento en refrigeración de jugos frutales tratados con LP_e.

4.2.3.1.1 Microorganismos inoculados

Se llevaron a cabo estudios de la dinámica de crecimiento de poblaciones microbianas sobrevivientes en los jugos frutales procesados con LP_e durante 60 s (71,6 kJ/ m^2) y almacenados en refrigeración durante 12 días.

En la **Figura 4.1.15** se muestra la inactivación de *E. coli*, *S*. Enteritidis, *L. innocua* y *S. cerevisiae* en jugo de manzana natural luego del tratamiento con LP_e y a lo largo del almacenamiento refrigerado. Se mantuvieron las reducciones logarítmicas de *S. cerevisiae* alcanzadas luego del tratamiento por LP_e durante 9 días, mientras que se recuperaron 1,1 ciclos logarítmicos hacia el final del almacenamiento (**Figura 4.1.15A**). El tratamiento por LP_e retardó la recuperación de la levadura en jugo de manzana dado que la población control comenzó a aumentar 3 días antes (**Figura 4.1.15A**). Reducciones moderadas de la población de 2,0 y 2,5 ciclos logarítmicos se obtuvieron para *L. innocua* (**Figura 4.1.15B**) y *S*. Enteritidis (**Figura 4.1.15.C**) en jugo de manzana natural luego de la exposición a LP_e, respectivamente. Sin embargo, hacia el final del almacenamiento se alcanzaron 7,8 reducciones logarítmicas de *L. innocua,* mientras que no se detectaron colonias de *S.* Enteritidis. Asimismo, las poblaciones control de *L. innocua* y *S*. Enteritidis también decrecieron en el tiempo, ya que se redujeron 2,9 y 3,5 ciclos logarítmicos, respectivamente, luego de 12 días de almacenamiento (**Figura 4.1.15B,C**). Este comportamiento podría atribuirse a las bajas condiciones de temperatura y pH. Mientras que las poblaciones tratadas por LP_e, que probablemente estuvieran más sensibilizadas a las condiciones de alta acidez, exhibieron un mayor decrecimiento hacia el final del almacenamiento. Por lo que, la combinación entre LP_e y la refrigeración durante el almacenamiento (5 °C) presentó un efecto sinérgico en la inactivación de *S.* Enteritidis y *L. innocua* en jugo de manzana. Estos resultados sugieren que el tratamiento por LP_e provocaría daños en proteínas o enzimas

Figura 4.1.15. Dinámica del crecimiento de microorganismos inoculados en jugo de manzana natural tratado con LP_e durante el almacenamiento refrigerado (5 ℃). *S. cerevisiae* (A), *L. innocua* (B), *S.* Enteritidis (C) y *E. coli* (D) a 5 ± 1 ℃. Jugo control (sin tratamiento LP_e, línea punteada); Jugo tratado durante 60 s con LP_e (línea continua); Desvío estándar (I). Las letras minúsculas en negrita adyacentes al día 12 de almacenamiento representan diferencias significativas ($p<0,05$) según el test de Tukey. Las flechas indican recuento no detectable.



involucradas en aquellos mecanismos que permiten que estas cepas controlen el gradiente de protones a través de la membrana y proliferen a bajas temperaturas.

El tratamiento con LP_e en jugo de manzana natural provocó un escaso decrecimiento de la población de *E. coli,* la cual permaneció prácticamente sin variaciones, a lo largo de todo el almacenamiento refrigerado (**Figura 4.1.15D**).

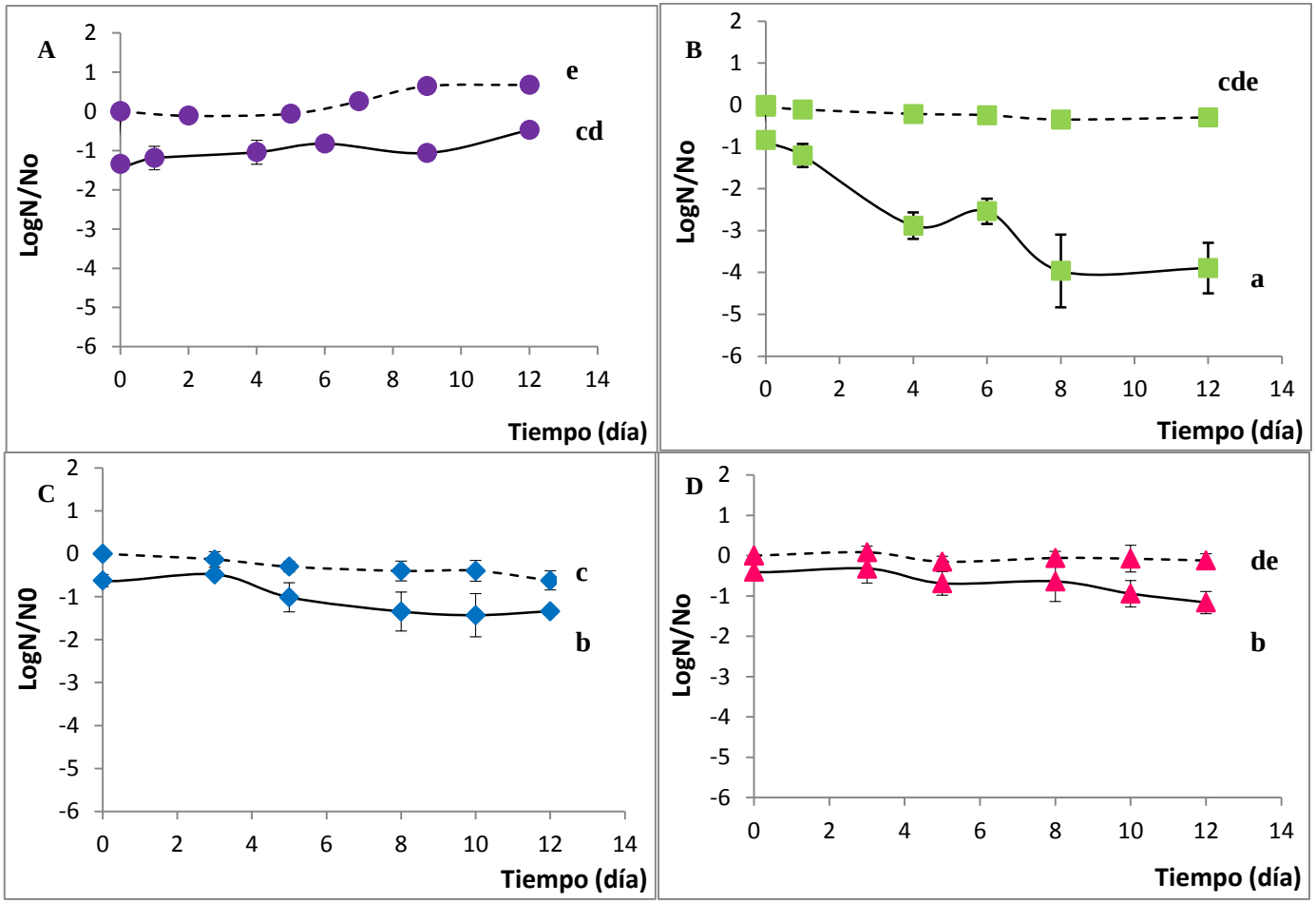
La **Figura 4.1.16** muestra la supervivencia de los microorganismos inoculados y tratados con LP_e en jugo de naranja natural a lo largo del almacenamiento.

La población de *S. cerevisiae* en jugo control aumentó en 0,7 ciclos logarítmicos hacia el final del almacenamiento mientras que, en jugo de naranja tratado por LP_e, permaneció constante hasta el día 9 y luego comenzó a crecer hasta alcanzar 0,9 ciclos log hacia el final del almacenamiento (**Figura 4.1.16A**).

En los jugos inoculados con *L. innocua* se observó una caída de 1 ciclo logarítmico inmediatamente luego del tratamiento con LP_e y la población continuó decreciendo durante el almacenamiento, alcanzando una reducción de 3,9 ciclos logarítmicos luego de 12 días. El recuento de *L. innocua* en el jugo control permaneció constante a lo largo de todo el almacenamiento (**Figura 4.1.16B**). Esto podría estar indicando que a pesar de que *L. innocua* se mostrase resistente al tratamiento por LP_e se produciría cierto daño en dichas células, que combinado con las bajas temperaturas y el pH, inhibiría su recuperación a lo largo del almacenamiento (Alzamora y col., 2015).

El tratamiento por LP_e resultó ineficiente para reducir las poblaciones de *S.* Enteritidis y *E. coli* en jugo de naranja, mientras que, hacia el final del almacenamiento, se alcanzó una reducción de 1,3 ciclos logarítmicos aproximadamente. Las poblaciones correspondientes presentes en jugo de naranja control permanecieron casi constantes a lo largo de los 12 días de almacenamiento refrigerado (**Figura 4.1.16C,D**).

Figura 4.1.16. Dinámica del crecimiento de microorganismos inoculados en jugo de naranja natural tratado con LP_e durante el almacenamiento refrigerado (5 ℃). *S. cerevisiae* (A), *L. innocua* (B), *S.* Enteritidis (C) y *E. coli* (D) a 5 ± 1 ℃. Jugo control (sin tratamiento LP_e, línea punteada); Jugo tratado durante 60 s con LP_e (línea continua); Desvío estándar (I). Las letras minúsculas en negrita adyacentes al día 12 de almacenamiento representan diferencias significativas ($p<0,05$) según el test de Tukey.



La evolución de las poblaciones sobrevivientes en jugo de frutilla tratado o no con LP_e durante el almacenamiento se muestra en la **Figura 4.1.17**. A pesar de que el tratamiento por LP_e resultó inefectivo para inactivar todos los microorganismos inoculados en jugo de frutilla, el almacenamiento refrigerado previno de la recuperación de las levaduras (**Figura 4.1.17A**). Adicionalmente, la población de *L. innocua* se redujo hasta 6 ciclos logarítmicos, dentro de los primeros dos días de almacenamiento, manteniéndose este valor hasta el final del mismo. La población correspondiente al jugo control exhibió un decrecimiento menor a 4 reducciones logarítmicas hacia el día 7 (**Figura 4.1.17B**). Por otra parte, se observaron bajas reducciones de entre 0,9 y 1,3 ciclos logarítmicos hacia el final del almacenamiento para *S.* Enteritidis y *E. coli* tratadas con LP_e, mientras que las muestras sin tratar se redujeron en un rango de 0,6 a 0,2 ciclos, respectivamente (**Figura 4.1.17C,D**).

La supervivencia a lo largo del almacenamiento refrigerado de los microorganismos inoculados en jugo de melón y tratados con LP_e, se muestra en la **Figura 4.1.18**. *S. cerevisiae* exhibió una reducción de 5,2 ciclos logarítmicos luego de la exposición a la LP_e. Las poblaciones microbianas sobrevivientes correspondientes a muestras de jugo control y tratado con LP_e comenzaron a crecer a partir del día 2 de almacenamiento, alcanzándose un incremento de 4,4 y 1,8 ciclos log hacia el día 12 de almacenamiento, respectivamente.

La población de *E. coli* se redujo 6,2 ciclos logarítmicos luego de 60 s (71,6 J/cm^2) de tratamiento, mientras que la población remanente continuó decreciendo y no se detectaron colonias a partir del día 6 (**Figura 4.1.18D**).

Por otra parte, *L. innocua* decreció 3,5 ciclos logarítmicos luego del tratamiento con LP_e. El recuento del sistema control comenzó a incrementarse a partir del día 5, mientras que la población tratada a partir del día 8.

Por lo tanto, el tratamiento con LP_e, retardó el incremento de las poblaciones de *S. cerevisiae* y *L. innocua* en jugo de melón almacenados en condiciones de refrigeración.

Un importante decrecimiento de la población a lo largo del almacenamiento se observó sólo para *L. innocua* tratada con LP_e e inoculada en los jugos de alta acidez (manzana, naranja y frutilla). Por lo que esta cepa sensibilizada luego del tratamiento por LP_e, resultó la más sensible a las condiciones de baja temperatura y alta acidez.

Figura 4.1.17. Dinámica del crecimiento de microorganismos inoculados en jugo natural de frutilla natural tratado con LP_e durante el almacenamiento refrigerado (5 ℃). *S. cerevisiae* (A), *L. innocua* (B), *S.* Enteritidis (C) y *E. coli* (D) a 5 ± 1 ℃. Jugo control (sin tratamiento LP_e, línea punteada); Jugo tratado durante 60 s con LP_e (línea continua); Desvío estándar (I). Las letras en negrita adyacentes al día 12 de almacenamiento representan diferencias significativas ($p<0,05$) según el test de Tukey.

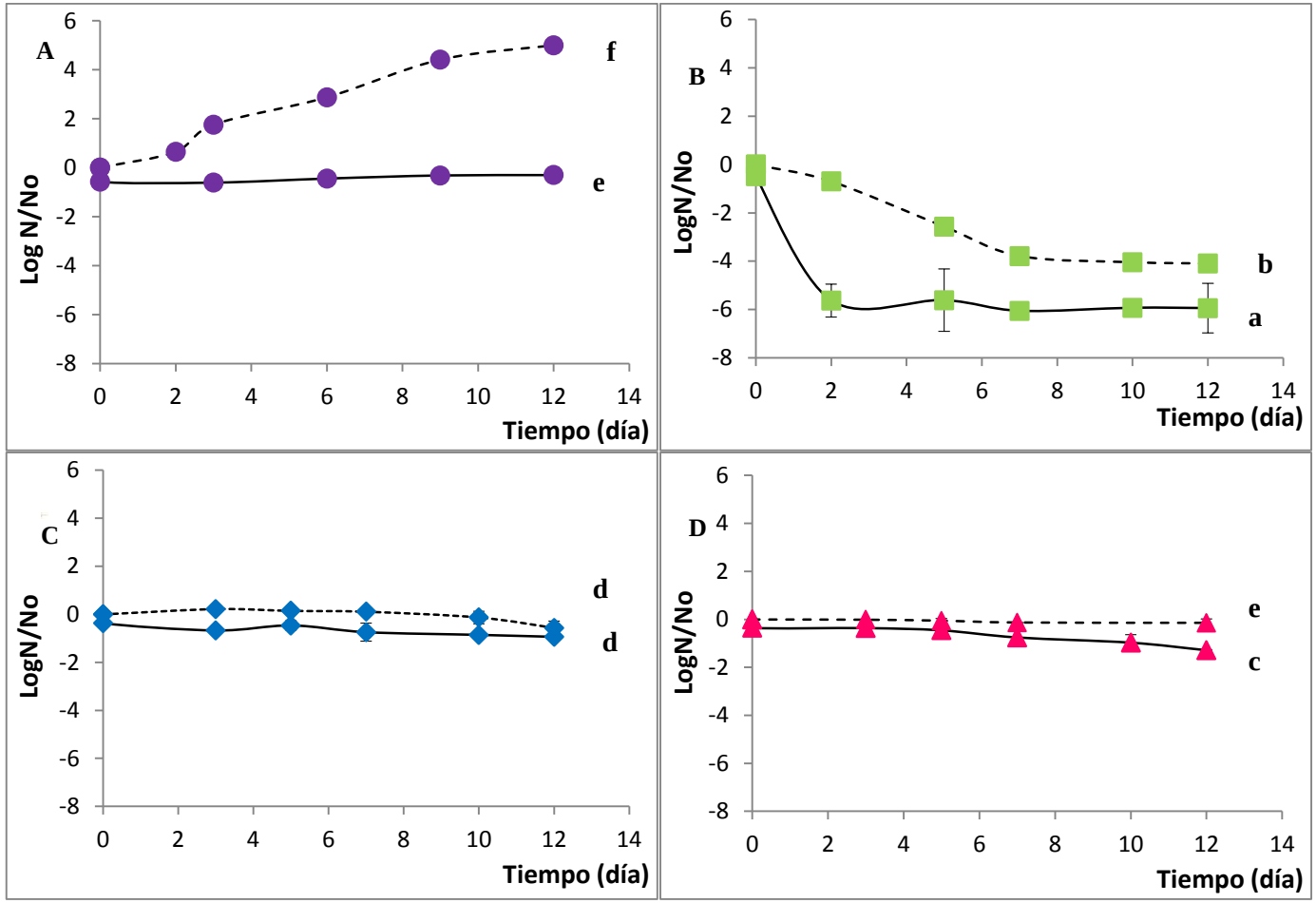
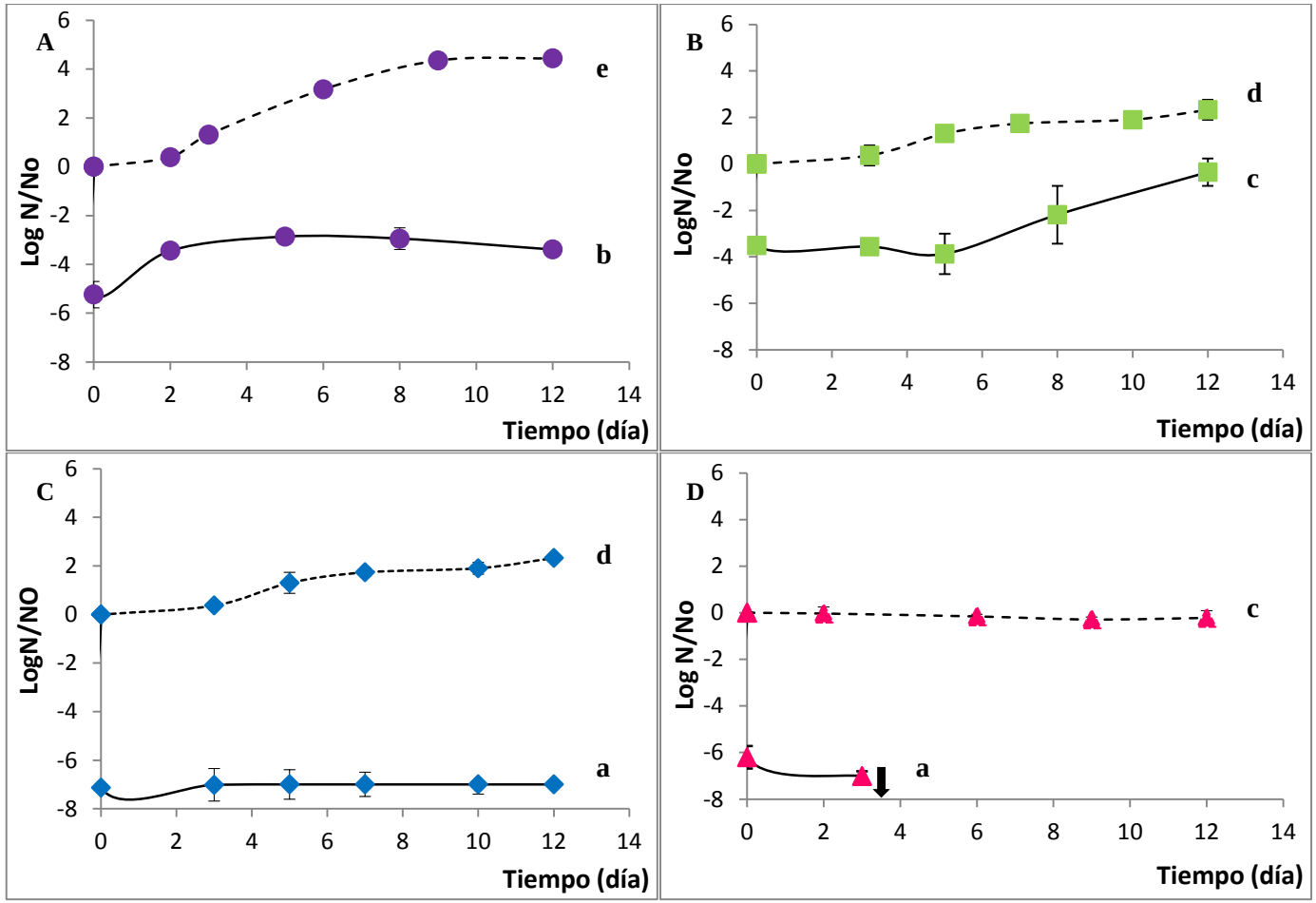


Figura 4.1.18 Dinámica del crecimiento de microorganismos inoculados en jugo de melón natural tratado con LP_e durante el almacenamiento refrigerado (5 ℃). *S. cerevisiae* (a), *L. innocua* (b), *S.* Enteritidis (c) y *E. coli* (d) a 5 ± 1 ℃. Jugo control (sin tratamiento LP_e, línea punteada); Jugo tratado durante 60 s con LP_e (línea continua); Desvío estándar (I). Las flechas indican recuento no detectable.



En concordancia con nuestros resultados, Palgan y col. (2011a) estudiaron la inactivación de *E. coli* y *L. innocua* en jugos de manzana y naranja tratados en un dispositivo estático de LP_e (0,25 m distancia de la lámpara; 1 x 10^{-3} m profundidad de muestra; 7-28 J/cm^2). Estos autores reportaron que ni *E. coli* ni *L. innocua* tratadas con LP_e pudieron recuperarse luego de 48 h de almacenamiento bajo condiciones de refrigeración. Además, Gómez y col. (2012) reportaron que la población de *E. coli* permaneció constante en discos de manzana cortada tratados con LP_e (71,6 J/cm^2, 0,1 m distancia respecto de la lámpara) luego de 7 días de almacenamiento refrigerado. También hallaron que la población de *L. innocua* continuó decreciendo a lo largo del tiempo, alcanzándose 2,5 ciclos logarítmicos hacia el final del almacenamiento. Por otra parte, observaron que la población de *S. cerevisiae* tratada con LP_e fue capaz de recuperarse 0,4 ciclos logarítmicos a partir del tercer día de almacenamiento. Mientras que, en el presente estudio, la población de *S. cerevisiae* mantuvo el nivel de reducciones alcanzado luego de la exposición a la LP_e (1,3 reducciones logarítmicas) luego de 9 días de almacenamiento a 5 ± 1 °C, y logró recuperarse 1,1 ciclos logarítmicos para el día 12.

4.2.3.1.2 Flora nativa

Con el propósito de evaluar la calidad microbiológica de los jugos tratados con LP_e se estudió la evolución de la flora nativa (mesófilos aerobios y hongos y levaduras) a lo largo del almacenamiento refrigerado de los jugos de manzana, frutilla, naranja y melón tratado o no con 60 s LP_e (71,6 J/cm^2), según lo descripto en **Materiales y Métodos, apartado 3.11.2.** La dinámica del crecimiento de la flora nativa se muestra en la **Figura 4.1.19**. El tratamiento LP_e redujo alos meséfilos aerobios en un rango de 0,1 a 1,5 ciclos logarítmicos y a los hongos y levaduras en un rango de 0,5 a 1,5 ciclos logarítmicos, dependiendo del tipo de jugo considerado. Por otra parte, la evolución a lo largo del almacenamiento refrigerado también dependió del tipo de jugo evaluado.

El tratamiento LP_e provocó una reducción de 1,5 y 1,4 ciclos logarítmicos en el jugo de melón de las poblaciones de mesófilos aerobios y de hongos y levaduras, respectivamente. Ambas poblaciones permanecieron debajo del límite recomendado

por la Agencia de Protección de la Salud (2009, Inglaterra) hasta el tercer día de almacenamiento refrigerado. El tratamiento por LP_e retrasó la recuperación de los hongos y levaduras, alcanzándose una diferencia entre las muestras control y tratadas de 2,4 ciclos en el día 7 de almacenamiento (**Figura 4.1.19a**).

La flora nativa en jugo de manzana permaneció sin variaciones significativas hasta el tercer día de almacenamiento seguido de una posterior proliferación (**Figura 4.1.19b**). Sin embargo, no se superó el límite recomendado para jugos frutales según la Agencia de Protección de la Salud (2009, Inglaterra) hasta el día 8 de almacenamiento, quien recomienda para este tipo de producto, un recuento de microorganismos mesófilos aerobios menor a 10^7 UFC/mL.

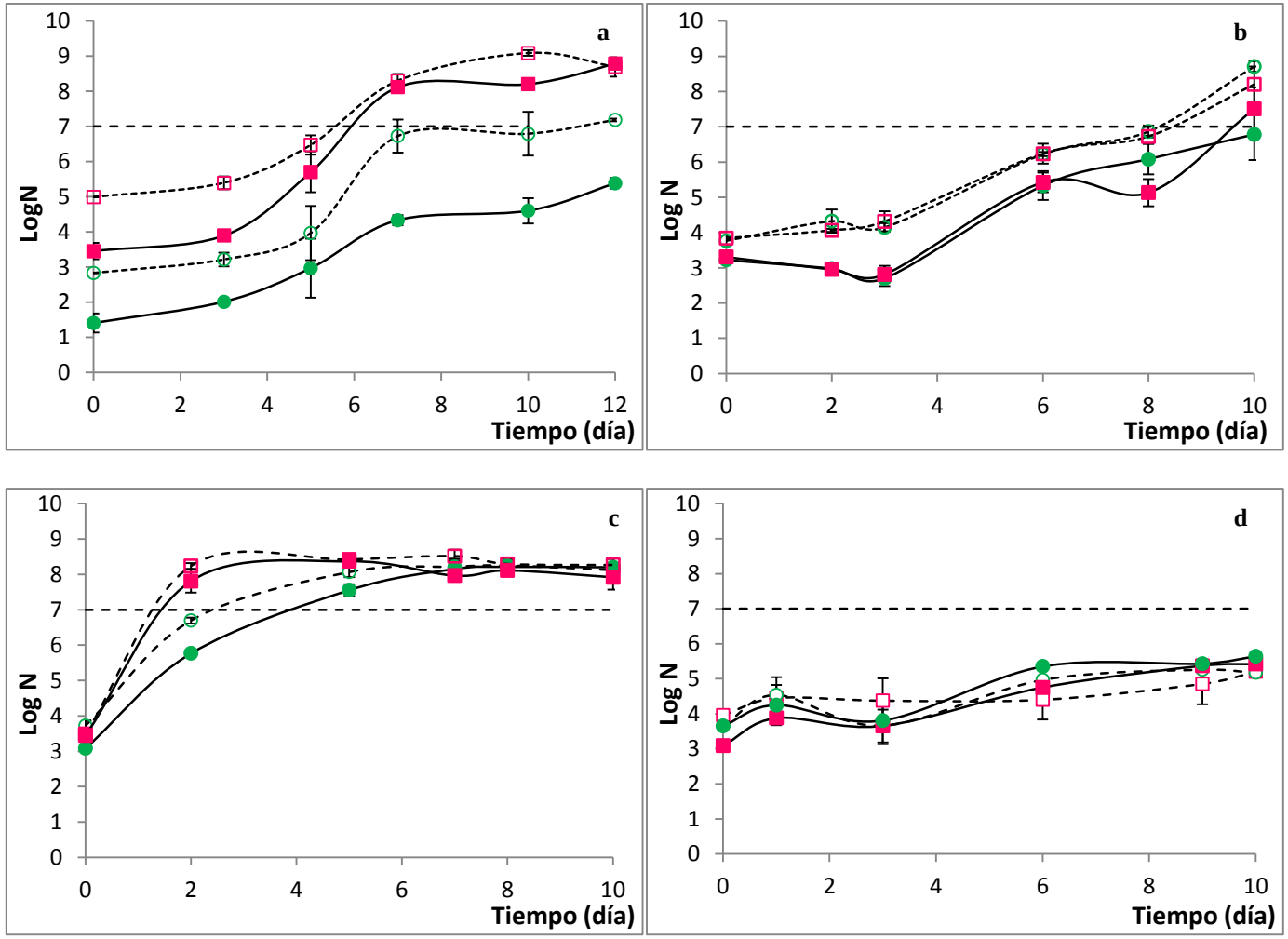
No se hallaron diferencias en la evolución de la flora nativa de jugo de naranja tratado con LP_e y control. En contraste con los restantes sistemas evaluados, el recuento de aerobios mesófilos y de hongos y levaduras comenzó a incrementarse hasta alcanzar el límite recomendado por la Agencia de Protección de la Salud (2009, Inglaterra) luego de dos días de almacenamiento. Se observó un pequeño incremento de 0,9 ciclos logarítmicos para hongos y levaduras en el jugo sin tratar al segundo día de almacenamiento (**Figura 4.1.19c**).

En el caso del jugo de frutilla, no se excedieron los límites recomendados por la Agencia de Protección de la Salud (2009, Inglaterra) a lo largo de los 12 días de almacenamiento. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la evolución de las muestras tratadas y control (**Figura 4.1.19d**).

Por lo tanto la sola aplicación de LP_e no fue lo suficientemente efectiva como método de preservación de los jugos frutales evaluados, con lo cual será necesaria su combinación con otras tecnologías.

En concordancia con estos hallazgos, Gómez y col. (2012) reportaron que la LP (71,6 J/cm^2; 0,1 m distancia respecto de la lámpara) no produjo efecto en la población de mesófilos aerobios en discos de manzana fresca al inicio del almacenamiento. Sin embargo, luego 7 días de almacenamiento 5 °C, la población de mesófilos tratados permaneció constante, mientras que la población control se incrementó en 2 ciclos logarítmicos. Respecto de los hongos y levaduras, estos autores obtuvieron 1 reducción logarítmica luego de la exposición a la LP_e y se alcanzaron 1,6 reducciones logarítmicas hacia el final del almacenamiento.

Figura 4.1.19. Evolución de la flora nativa en jugos naturales de melón (a), manzana (b), naranja (c) y frutilla (d) almacenados a 5 ± 1 ℃. Control (línea punteada) y tratados con 60 s de LP_e (línea sólida) de mesófilos aerobios (■) y hongos y levaduras (●); desvío estándar (I). La línea de guiones indica el límite de recuento de mesófilos aerobios recomendado por la Agencia de Protección de la Salud (2009, Inglaterra) para jugos frutales.



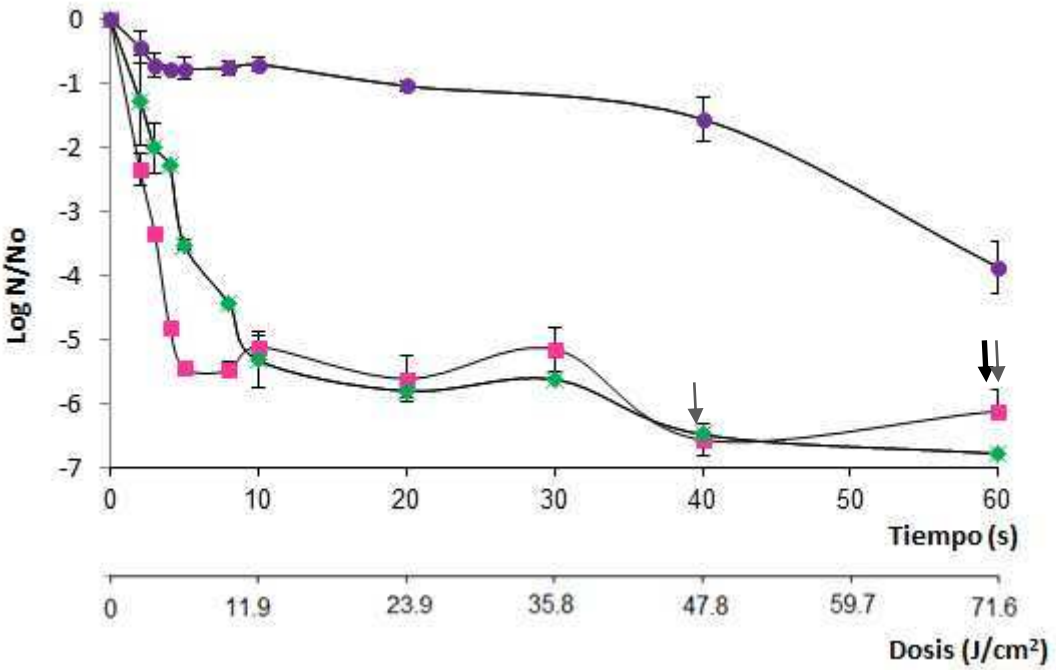
4.2.4 Análisis mediante citometría de flujo del estado fisiológico de las células microbianas frente al tratamiento LP_e

Se aplicó la técnica de citometría de flujo con el propósito de evaluar el daño ocasionado por la exposición a LP_e. Dada la complejidad de la técnica y el costo del servicio, se eligieron sólo algunas condiciones a evaluar de *S. cerevisiae*, por ser una célula de gran tamaño y por lo tanto, de fácil detección. Se trataron células de *S. cerevisiae* inoculadas en una solución de agua peptonada 0,1 % p/v pH 3,5 y 5,6 y en jugo de manzana comercial con LP_e según lo descripto en **Materiales y Métodos, apartado 3.7.1.2**. Posteriormente, se marcaron con dos fluorocromos, FDA y PI, tal como se detalla en **Materiales y Métodos, sección 3.13.** Simultáneamente, también se realizó el recuento de células por plaqueo en superficie como se describió en **Materiales y Métodos, apartado 3.9**, de modo de correlacionar el nivel de daño y la inactivación observada.

Las curvas de inactivación de *S. cerevisiae* en jugo de manzana presentaron una forma sigmoidea con un rápido decrecimiento (~ 0,7 ciclos logarítmicos) hasta los 10 s (11,9 J/cm^2) de exposición a LP_e, seguido de un hombro pronunciado de pequeña pendiente, y luego de 40 s de tratamiento, un segundo período de rápido decrecimiento en el cual se alcanzaron 3,9 ciclos logarítmicos de reducción a 60 s (71,6 J/cm^2) de tratamiento por LP_e (**Figura 4.1.20**). La concavidad hacia abajo exhibida luego de los 10 s de tratamiento, estaría indicando una acumulación de daño en la subpoblación más resistente, mientras que en los tiempos menores a 10 s las células sensibles a las LP_e fueron destruidas rápidamente.

Las curvas de inactivación de *S. cerevisiae* en agua peptonada estuvieron caracterizadas por un pronunciado decrecimiento (~ 5,5 ciclos logarítmicos) durante los primeros segundos de tratamiento, siendo la pendiente de la curva más pronunciada en el caso de menor pH. A partir de los 60 s no se detectaron colonias (**Figura 4.1.20**). La mayor efectividad de la LP_e en el agua peptonada podría deberse a la menor absortividad en la región UV respecto al jugo de manzana tal como se observó en la **Figura 4.1.3**. En concordancia con estos resultados, Sauer y Moraru (2009) estudiaron la inactivación de *E. coli* 25922 en buffer fosfato Butterfield (BPB), caldo TSB, jugo de manzana filtrado y sidra de manzana por LP (sistema

Figura 4.1.20. Curvas de inactivación de *S. cerevisiae* en agua peptonada pH 3,5 (■) y 5,6 (♦), y en jugo de manzana (●) con tratamiento LP_e durante 60 s (71,6 J/cm^2). Recuento no detectable (<3 CFU/mL) para agua peptonada pH 3,5 (↓) y pH 5,6 (↓). (I) Desvío estándar.



estanco, 13,1 J/cm^2). Estos autores observaron mayor inactivación (8,5 ciclos de reducción logarítmicos) en BPB que no presentó absorbancia de manera significativa en la región UV. En cambio, en jugo y sidra de manzana que presentaron alta absorbancia en el rango de 200 a 400 nm, se obtuvo una reducción de 2,6 y 2,3 ciclos logarítmicos, respectivamente. Por otra parte, el caldo TSB que absorbió una pequeña cantidad de luz a longitudes de onda mayores a 300 nm, exhibió una reducción de 3,2 ciclos logarítmicos.

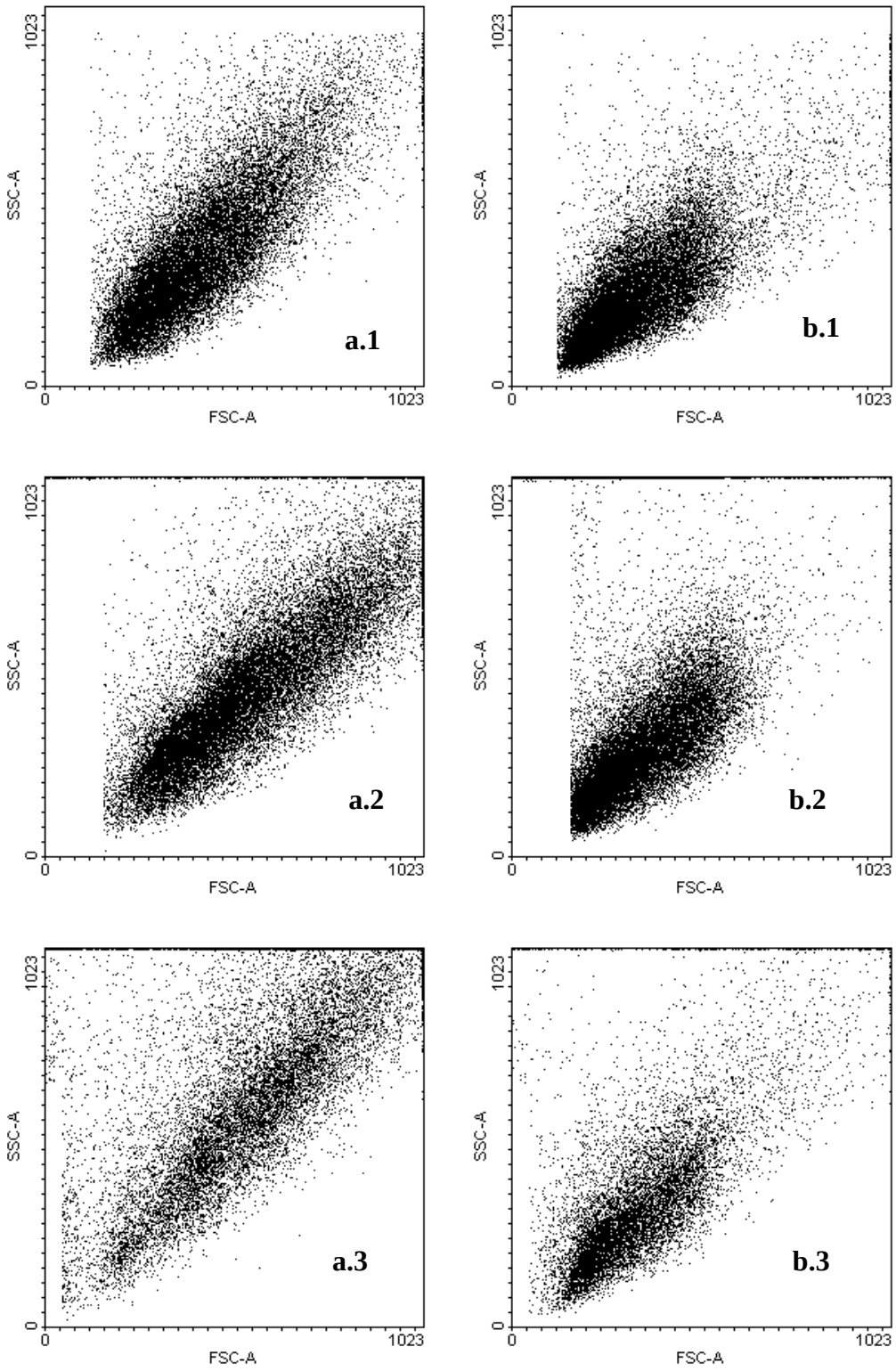
Las muestras de *S. cerevisiae* en una solución de agua peptonada 0,1 % p/v pH 3,5 y 5,6 y en jugo de manzana comercial tratadas con LP_e según lo descripto en **Materiales y Métodos, apartado 3.7.1.3**, se marcaron con dos fluorocromos, FDA y PI, tal como se detalla en **Materiales y Métodos, sección 3.14.** Simultáneamente, también se realizó el recuento de levaduras por plaqueo en superficie como se describió en **Materiales y Métodos, apartado 3.9**, de modo de correlacionar el nivel de daño y la inactivación observada.

Al obtener los gráficos de tamaño (Forward, FSC) vs granulosidad (Size, SSC) de *S. cerevisiae*, pudo visualizarse que las muestras control en todos los sistemas

fueron monomodales con respecto a SSC y FSC, desplegando una gran heterogeneidad en cuanto al tamaño y la granulosidad. Esta diversidad en el tamaño y granulosidad puede atribuirse, al menos parcialmente, a la diferente orientación de las células a medida que atraviesan el haz de luz (Hewitt y col., 2001). Luego de la aplicación del tratamiento por LP_e (**Figura 4.1.21 b1, b2, y b3**), se obtuvo una distribución más uniforme respecto a las señales de FSC y SSC, donde la mayoría de la población se desplazó hacia valores menores de ambas señales, lo que indicaría que las células se volvieron más simétricas, y de menor tamaño y granulosidad luego de la aplicación del tratamiento. Este patrón de dispersión de luz sugiere que las células se deformaron o encogieron, o incluso rompieron en fragmentos, luego de la exposición a la LP_e y que pueden haberse ocasionado fugas en la estructuras celulares que provoquen una disminución del índice de refracción.

Con el objeto de visualizar el daño causado por LP_e**,** se graficó la densidad de células reteniendo FDA vs PI para cada condición ensayada. La **Figura 4.1.22** muestra la densidad de fluorescencia verde (eje y) y roja (eje x) para células de *S. cerevisiae,* inoculada en agua peptonada o en jugo de manzana y tratadas por LP_e (0-60 s). Con el objeto de monitorear la habilidad de *S. cerevisiae* de acumular y retener FDA como indicador de la integridad de la membrana y la actividad enzimática, y de incorporar PI como consecuencia de daño en la membrana luego de tratarla con LP_e según **Materiales y Métodos, apartado 3.7.1.2,** se graficó la densidad de FDA vs PI para cada condición ensayada. En la **Tabla 1.8, Introducción, apartado 1.11.2,** se especifican los patrones de fluorescencia para cada uno de los cuadrantes y el mecanismo celular involucrado.

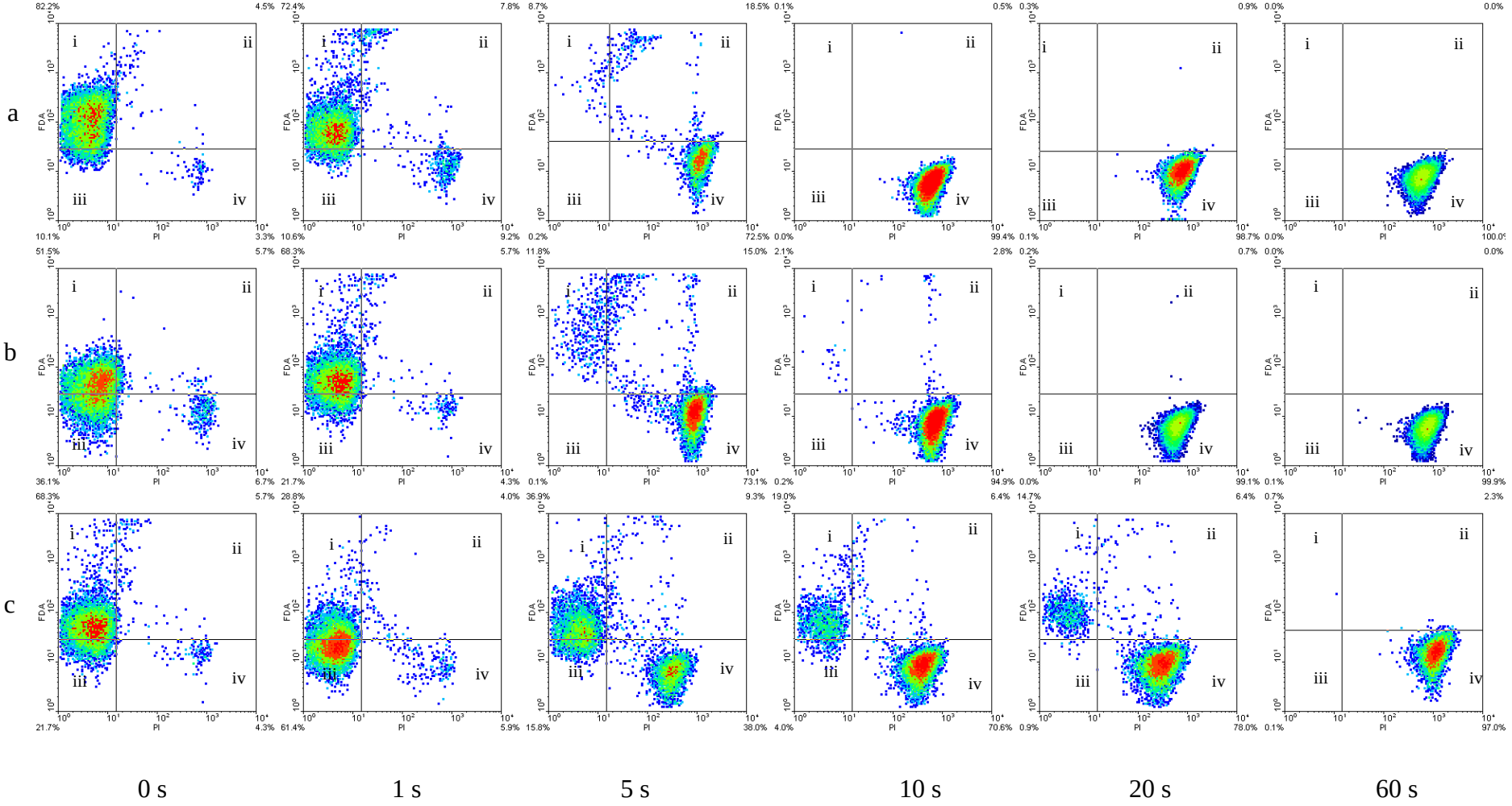
Figura 4.1.21 Gráficos de punto para el tamaño (FSC) vs granulosidad (SSC) de *S. cerevisiae* KE162 en agua peptonada o jugo de manzana tratados o no con LP_e. a) células sin tratar; b) células tratadas con LP_e (60 s); 1) agua peptonada, pH 3,5; 2) agua peptonada, pH 5,6; 3) jugo de manzana.



Las células sin tratar de *S. cerevisiae* suspendidas en ambos sistemas de agua peptonada y en jugo de manzana y teñidas con FDA (**Figura 4.1.22a,b,c**; 0 s) mostraron un patrón similar de marcación, aunque no todas se hallaron en el cuadrante i. Esto se observó principalmente en agua peptonada pH 5,6 (51,5 % células) y en jugo de manzana (68,3 % células), debido posiblemente a la extrusión de F hacia el exterior de la célula a través de un transportador de ATP, lo que explicaría la ausencia de fluorescencia verde. Este flujo es un indicador adicional de la actividad metabólica celular (Bunthof y col., 2000). La exposición de *S. cerevisiae* a dosis crecientes de LP_e (6,0-71,6 J/cm^2 para 5- 60 s, respectivamente) resultó en un pasaje gradual de las células presentes en el cuadrante i (células con actividad esterasa y membrana intacta) al cuadrante iv (células con membrana permeabilizada).

El tratamiento de LP_e destruyó la integridad de la membrana permitiendo la entrada de PI a las células, y la consecuente marcación del ADN. Finalmente, a los 60 s de tratamiento se halló la mayor fracción de células marcadas con PI (cuadrante iv), 97,0 % en jugo de manzana y ~100,0 % en ambos sistemas de agua peptonada, mientras que en los restantes cuadrantes no se detectaron fracciones significativas.

Figura 4.1.22. Gráficos de densidad de fluorescencia de FDA vs. PI para evaluar los efectos sobre la actividad esterasa e integridad de membrana de *S. cerevisiae* expuesta a diferentes tiempos de tratamiento con LP_e. a) agua peptonada, pH 3,5; b) agua peptonada, pH 5,6 y c) jugo de manzana, pH: 3,5 . Los números en cada esquina representan el porcentaje de la población que cae en cada cuadrante.



El comportamiento observado correlaciona con las curvas de inactivación determinadas por la técnica de recuento en placa mostradas en la **Figura 4.1.20**. En los sistemas de agua peptonada, luego de 5-10 s (6,0-11,9 J/cm^2) de tratamiento, la población de *S. cerevisiae* se redujo aproximadamente 5,5 ciclos logarítmicos (**Figura 4.1.20**), lo cual es acorde con la gran disminución de la sub-población con fluorescencia verde (**Figura 4.1.22a,b**; cuadrante i. A los 20 s (47,8 J/cm^2) de tratamiento no se detectaron células viables, y una gran proporción de levaduras (99 %) se encontró en el cuadrante iv (células con membrana comprometida), y prácticamente ninguna célula (0,2 %-0,3 %) retuvo F (cuadrante i), excepto en jugo de manzana donde se observó un 14,7 % con actividad esterasa y un 6,4 % en el cuadrante ii (células doblemente marcadas). En jugo de manzana, el tratamiento LP_e durante 60 s sólo provocó una reducción de 3,8 ciclos logarítmicos (**Figura 4.1.20**), dejando una subpoblación resistente evidenciada por la menor proporción de células dañadas (97,0 %) en comparación con los sistemas de agua peptonada (**Figura 4.1.22a,b c**; 71,6 J/cm^2).

El pasaje del cuadrante i al iv fue más rápido en el sistema de agua peptonada pH 3,5. Por ejemplo, para los tratamientos LP_e de 5 - 10 s, el porcentaje de células marcadas con F (**Figura 4.1.22a**, cuadrante iv) estuvo comprendido entre 8,7 % y 0,1 %. En cambio, para el sistema agua peptonada pH 5,6, el cambio fue más gradual. Luego de 5 s de tratamiento (3,5 reducciones logarítmicas de células viables), solo un 11,8 % de las células se marcaron con F, mientras que se encontró una importante proporción (15 %) de células doblemente marcadas (**Figura 4.1.22b**, cuadrante ii). Esto implica el incremento de fluorescencia roja por acumulación de PI debido a daño en la membrana, y simultáneamente, la retención de la actividad esterasa por hidrólisis de FDA. Esta subpoblación estresada o dañada se la denomina "subpoblación de células viables no cultivables" dado que presentan actividad metabólica pero no pueden ser detectadas por los métodos convencionales de siembra (Schenk y col., 2011).

El método de clasificación de células de estas fracciones ("cell sorting", en el habla inglesa) permitió aislar las subpoblaciones de diferentes cuadrantes para posteriormente sembrarlas en agar. De acuerdo a este estudio, las células

tratadas 5-10 s (6,0-11,9 J/cm^2) con LP_e no pudieron recuperarse en el caso de agua peptonada pH 3,5; mientras que una pequeña recuperación se observó en el caso de agua peptonada pH 5,6 (1,2 J/cm^2: 1,6 x 10^3 UFC/mL) y en jugo de manzana (6,0 J/cm^2: 1,5 x 10^3 CFU/mL; 11,9 J/cm^2: 4 x 10^2 UFC/mL). La presencia de esta población subletal detectada luego de la exposición a bajas dosis de LP_e puede recuperarse en condiciones adecuadas para su desarrollo y afectar la vida útil de los jugos (Zhao y col., 2010). Se detectaron células doblemente marcadas (PI^+F^+, cuadrante ii) de *S. cerevisiae* en jugo de manzana (**Figura 4.1.22c**) a los 5 s (6 J/cm^2, 9,3 %) de tratamiento, encontrándose un 6,4 % luego de 10 y 20 s de exposición. Mientras que en agua peptonada pH 3,5 y 5,6, la mayor proporción (18,5 % y 15,0 %, respectivamente) de células doblemente marcadas se alcanzó luego de 5 s (1,2 J/cm^2) de tratamiento y a los 20 s ya no fueron detectadas. Pataro y col. (2011) observaron que células de *E. coli* y *L. innocua* inoculados en jugos de naranja y manzana presentaban daño subletal al cultivarlas en medio selectivo y no selectivo.

En la **Figura 4.1.23a**, se muestra el incremento en el número de células de *S. cerevisiae* en el cuadrante iv (marcadas con PI), en función del tiempo calculado como la diferencia entre el número de células que no incorporaron PI previo y posterior a la aplicación del tratamiento.

Adicionalmente, en la **Figura 4.1.23b** se muestra la actividad esterasa residual luego del tratamiento con LP_e calculada a partir de las **ecuaciones 3.23** y **3.24.** En los sistemas con agua peptonada, durante los primeros 20 s de tratamiento (23,9 J/cm^2), se incrementó el número de células que incorporaron PI y se redujo rápidamente la actividad esterasa permaneciendo estos valores constantes hasta la máxima dosis ensayada (60 s; 71,6 J/cm^2) (**Figura 4.1.23a,b**). Por el contrario, *S. cerevisiae* en jugo de manzana presentó menor permeabilización de membrana en todo el rango de dosis ensayado. Este hecho sugiere que la pérdida de integridad de la membrana ocasionado por la exposición a LP_e es dependiente del tipo de medio.

Luego del tratamiento por LP_e, se encontró similar actividad esterasa entre los sistemas de agua peptonada para todas las dosis ensayadas, mientras que en jugo de manzana se hallaron diferencias relevantes en la actividad esterasa correspondiente al cuadrante i y la actividad esterasa total

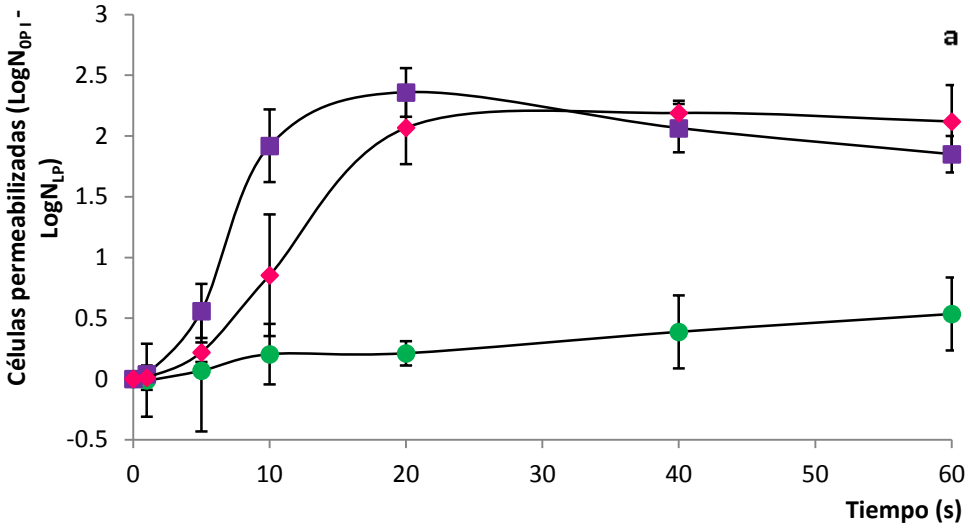
correspondientes a los cuadrantes i y ii (**Figura 4.1.23b**). Estas observaciones confirman que hay una mayor proporción de células tratadas con LP_e con daño subletal en jugo de manzana, respecto a los sistemas de agua peptonada.

Con el propósito de analizar la relación entre la disminución en la población viable determinada por el método de recuento en placa y la permeabilización de la membrana de *S. cerevisiae*, se graficó el incremento de células permeabilizadas (marcadas con PI) en función de las células no viables (**Figura 4.1.23c**). En jugo de manzana se alcanzó una reducción de 4 ciclos logarítmicos, mientras que en los sistemas de agua peptonada, se observó un rápido incremento de células no viables con un comportamiento bifásico. Es importante destacar que se encontró una mayor proporción de células no viables a medida que se incrementaba el número de células con la membrana comprometida. Por ejemplo, a los 60 s de tratamiento LP_e de jugo de manzana, se alcanzaron 4 reducciones logarítmicas de *S. cerevisiae*, aunque sólo se observó un incremento de 0,83 ciclos logarítmicos en las células permeabilizadas.

Respecto de los sistemas de agua peptonada, se obtuvo solamente un incremento de 2 ciclos logarítmicos de células con membrana comprometida que se corresponden a una reducción de 6 ciclos logarítmicos según el método de recuento en placa (**Figura 4.1.23c**). Por otra parte, en los sistemas de agua peptonada se perdió completamente la actividad esterasa total de células de *S. cerevisiae*, mientras que en jugo de manzana solo un 30 % de la actividad enzimática permaneció remanente (**Figura 4.1.23d**). A bajas dosis (11,9 J/cm^2), las células de *S. cerevisiae* inoculadas en el jugo de manzana mantuvieron prácticamente la totalidad de la actividad enzimática, mientras que las inoculadas en agua peptonada pH 5,6 exhibieron un 70 % de actividad y sólo un 30 % en pH 3,5. Estos resultados sugieren que la pérdida de actividad metabólica como resultado de la exposición a LP_e, no es un fenómeno reversible como la permeabilización de la membrana.

En concordancia con estos resultados, Aronsson y col. (2005) también observaron una mayor proporción de células inactivadas en relación a las células permeabilizadas y atribuyeron este comportamiento a una posible reversión en la permeabilización que no puede ser detectada con la marcación de PI.

Figura 4.1.23. a) Células permeabilizadas de *S. cerevisiae* determinadas por la captación de PI en función del tiempo de tratamiento de LP_e. b) Cambios relativos de la actividad esterasa total (línea punteada) o actividad esterasa en células con membrana intacta (línea sólida) vs. tiempo/dosis de LP_e. c) Células permeabilizadas (Log N0PI –Log NLP) determinadas por la captación de PI en función de las células no viables determinadas por el método de recuento en placa (Log N0- Log N). d) Cambios relativos en la actividad esterasa total en función de las células no viables determinadas por el método de recuento en placa. Agua peptonada pH 3,5 (■) o pH 5,6 (♦), y jugo de manzana (●). (I) media ± desvío estándar de 3 replicados.



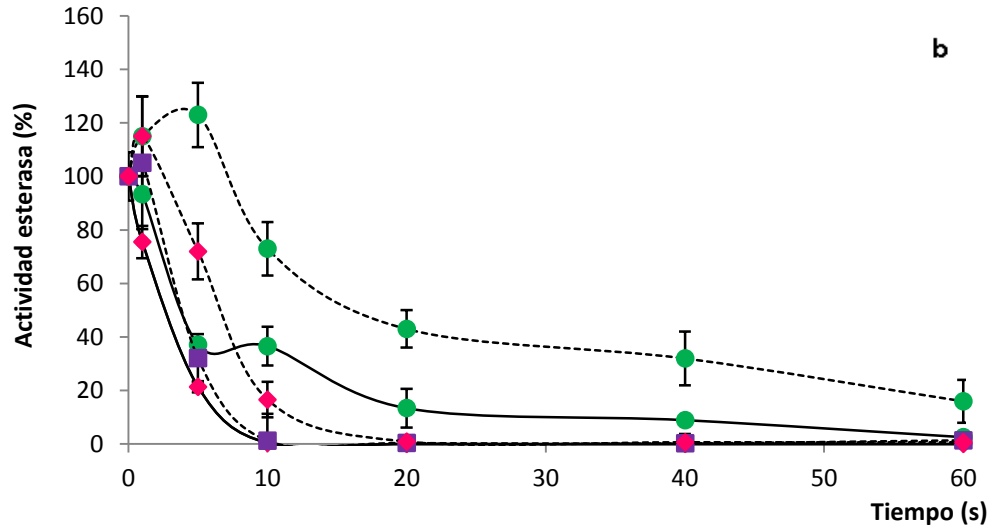
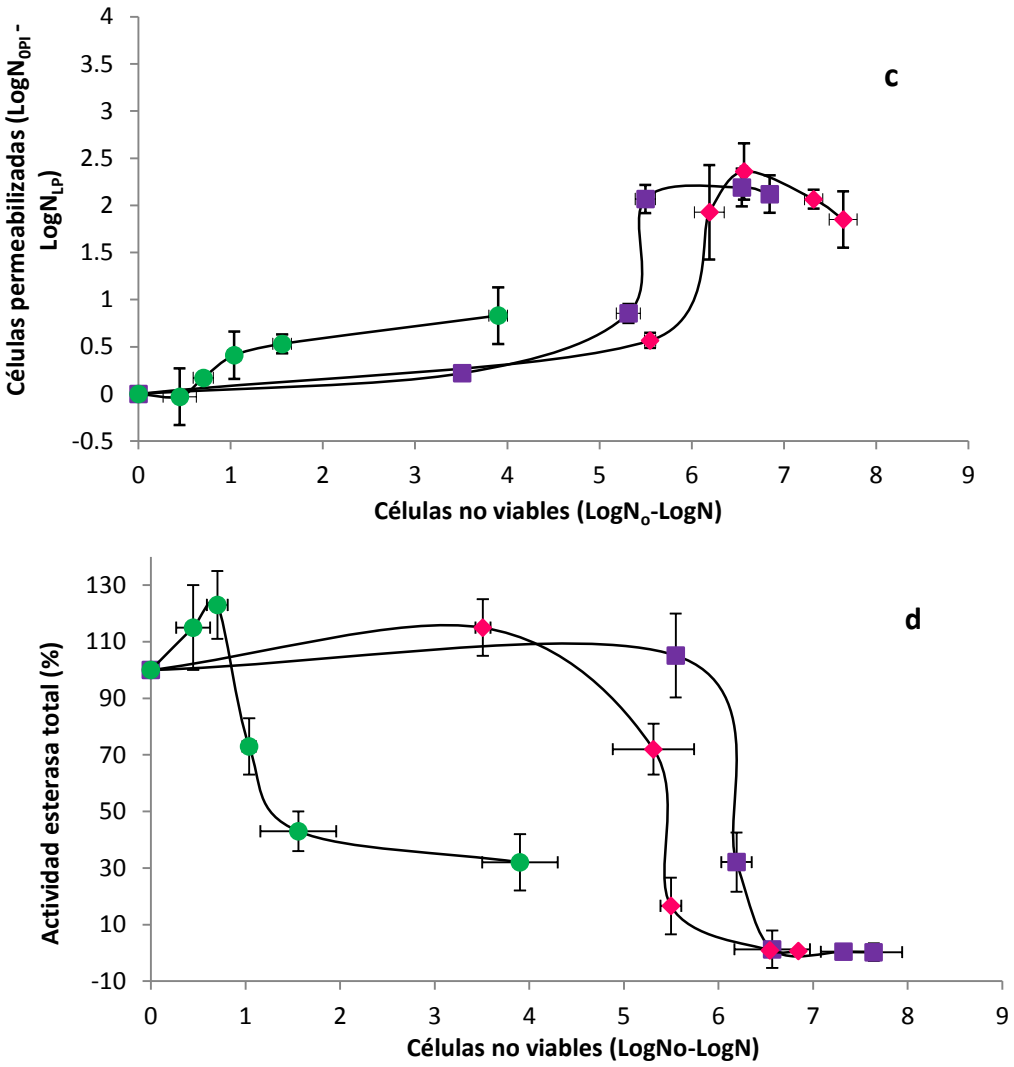


Figura 4.1.23. ***Continuación…***



4.2.5 Evaluación del daño de células tratadas con LP_e mediante microscopía electrónica de transmisión

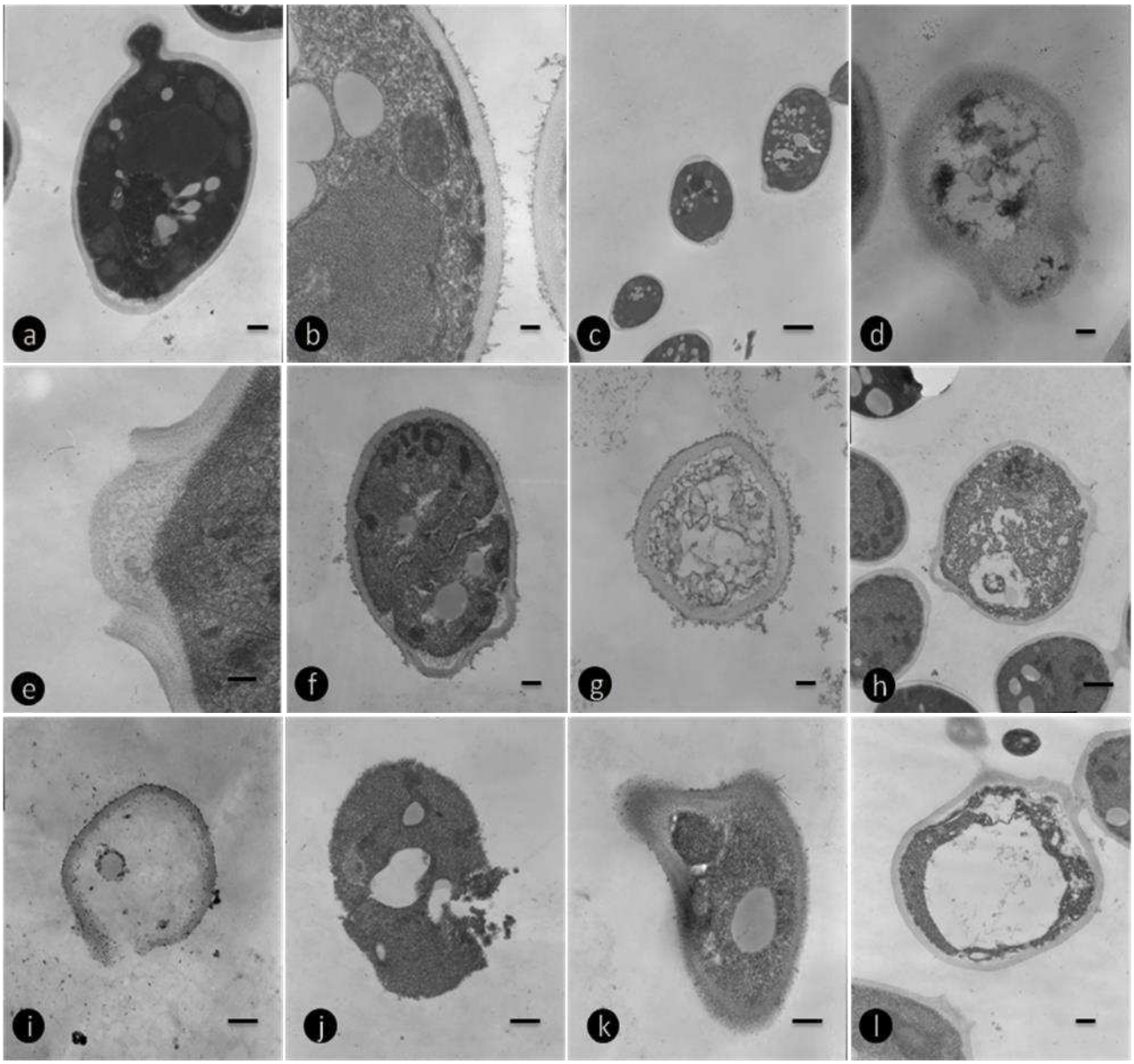
A modo de complementar la información obtenida mediante las curvas de inactivación obtenidas y la técnica de citometría de flujo, se monitorearon los cambios estructurales asociados al daño por LP_e en células de *S. cerevisiae*

luego de tratarlas con LP_e según lo descripto en **Materiales y Métodos, apartado 3.7.1.2** durante tiempos comprendidos entre 0 y 60 s, en agua peptonada pH 3,5 y en jugo de manzana.

Las micrografías correspondientes se exhiben en la **Figura 4.1.24**. Las células sanas sin tratamiento presentaron una forma elipsoidal característica (**Figura 4.1.24a-c**). Las estructuras celulares como las paredes, organelas y membranas, se observaron intactas, tanto en el agua peptonada como en el jugo de manzana. Todas las células control exhibieron alta densidad electrónica, pared celular continua y lisa, así como también se visualizaron células madre e hija, y cicatrices de gemación. Luego del tratamiento con LP_e, se detectaron distintos cambios estructurales en las células; poniéndose en evidencia diferentes sitios blanco a parte de la membrana plasmática (**Figura 4.1.24d-l**). En general, la severidad de los cambios se incrementó a medida que la dosis de LP_e aumentó. Tanto en agua peptonada como en jugo de manzana se observaron los mismos cambios al aplicar dosis bajas de LP_e. Se observaron células con vacuolas expandidas y agrandadas (**Figura 4.1.24h,j,l**). Luego de 10 s (11,9 J/cm^2) de exposición a LP_e, el citoplasma apareció menos diferenciado (**Figura 4.1.24e**). Se observaron también células deformadas (**Figura 4.1.24k**) o con forma más redondeada respecto al control (**Figura 4.1.24g**). En algunas casos pudo visualizarse que el citoplasma se encontraba ligeramente separado de la pared celular (**Figura 4.1.24f**). Tanto en la superficie celular como en discontinuidades de la membrana plasmática, se apreciaron sitios de punción (**Figura 4.1.24i,j**) por donde se observaba pérdida del contenido intracelular (**Figura 4.1.24k**).

En ciertas ocasiones pudieron detectarse células tratadas con paredes celulares hinchadas (**Figura 4.1.24g**), así como también otras que perdieron el contenido intracelular y presentaban su interior vacío (**Figura 4.1.24i**), o que perdieron su pared celular (**Figura 4.1.24j**). En general, las células tratadas con LP_e mostraron menor densidad electrónica que las levaduras control. Al aumentar el tiempo de exposición al tratamiento, el interior celular se observó más coagulado, vacuolizado, con interrupciones en las organelas.

Figura 4.1.24. Micrografías de *S. cerevisiae*. a) Aspecto general de levaduras madre e hija control, donde se pueden apreciar las organelas bien definidas con la membrana plasmática continua. b) Detalle de pared celular electrónicamente densa y membrana plasmática continua. c) Grupo de células intactas con aspecto similar. d) Ruptura de pared celular y plasmalema, con material irradiando de la célula. e) Sitio de punción individual en la superficie celular con eflujo del material intracelular. f) Célula deformada con paredes electrónicamente densas; material citoplasmático separado de la pared celular. g) Estructura interna descompuesta pero la pared celular y la membrana plasmática permanecen intactos. h) Célula deformada con estructura interna interrumpida, rodeada de células sin modificaciones estructurales. i) Restos de pared celular con escaso contenido celular. j) Contenido celular sin pared. k) Sitio de punción y distorsión de la forma celular. l) Célula deformada con importante degradación, eflujo de material interno y vacuolización. a,c,d,e,g,i,j,k: agua peptonada pH 3,5; b,f,h,l: jugo de manzana. Escala: a, f, i, j, k, l: 500 nm; b, d, e, g: 200 nm; c: 2µm; h: 1 µm.



En concordancia con estos resultados, Takeshita y col. (2003) observaron a través de micrografías de *S. cerevisiae* IFO2347 inoculadas en medio modelo y expuestas a LP_e (0-2,1 J/cm^2), que las células tratadas presentaban forma más redondeada que las levaduras control. También reportaron distorsión de la membrana plasmática y aumento del tamaño vacuolar. Asimismo, Krishnamurthy y col. (2008a) observaron daño de la pared celular con pérdida de contenido intracelular de células de *S. aureus* expuestas a LP_e (5 s, 4,95 J/cm^2).

La mayor proporción de células no viables en relación con las células con membrana comprometida observado en la **Figura 4.1.24.c**, está de acuerdo con los resultados observados por MET. Se visualizó una gran proporción de células aparentemente con pared y membrana intactas pero con el interior interrumpido. Los cambios estructurales observados por MET, como la expansión vacuolar, cambio en la forma celular y la discontinuidad del material intracelular aún en condiciones de presentar la pared y la membrana plasmática intactas, sugieren que dichos cambios contribuyeron al daño provocado por LP_e, y consecuentemente a la pérdida de viabilidad. Por otra parte, las células permeabilizadas detectadas por citometría de flujo, podrían asociarse a aquellas observadas por MET con pérdida de pared o contenido celular, con sitios de punción y eflujo del contenido intracelular (p.e. **Figura 4.1.24d,i,j**).

Parte II

4.2 Efectividad de tratamiento por LP estanco combinado con otros factores de stress

El propósito de esta etapa resulta en evaluar la efectividad de LP_e asistida por otros factores de stress microbiano tales como US y temperatura moderada, con el propósito de obtener un jugo de natural de manzana microbiológicamente estable, dado que de acuerdo a los resultados obtenidos en la etapa 1, la aplicación LP_e como única tecnología de preservación no fue lo suficientemente efectiva. Se evaluará la efectividad de los tratamientos combinados sobre la inactivación de dos microorganismos deteriorativos característicos resistentes como *S. cerevisiae* y esporas de *A. acidoterrestris*. Por otra parte, se analizará el estado fisiológico y los daños estructurales de células de *S. cerevisiae* causados por la exposición a los tratamientos combinados, por citometría de flujo y microscopía electrónica de transmisión. Por último se evaluará la dinámica de crecimiento de las poblaciones de las células vegetativas o esporas tratados con LP_e y/o su combinación con US durante el almacenamiento refrigerado.

4.2.1 Utilización de ultrasonido de alta intensidad. Estudios de reto microbiano

Ya se ha mencionado que el US es una tecnología emergente promisoria para la preservación de jugos frutales, aunque sus efectos dependen del volumen a procesar, sensibilidad del microorganismo, amplitud y la temperatura a la cual se aplica. En una primera etapa, se estudió el efecto del US en jugo de manzana sobre microorganismos deteriorativos de relevancia. Posteriormente, se seleccionaron las condiciones más apropiadas de aplicación del mismo, con el propósito de utilizarlas en un tratamiento

combinado US+LP_e, tal como se describe en **Materiales y Métodos, apartado 3.7.4**.

En la **Figura 4.2.1** se muestran las curvas de inactivación de esporas de *A. acidoterrestris* y células de *S. cerevisiae* inoculados en jugos de manzana comercial y natural tratadas 30 min US a 30 ± 1 °C o 44 ± 1 °C, según lo descripto en **Materiales y Métodos, apartado 3.7.2**.

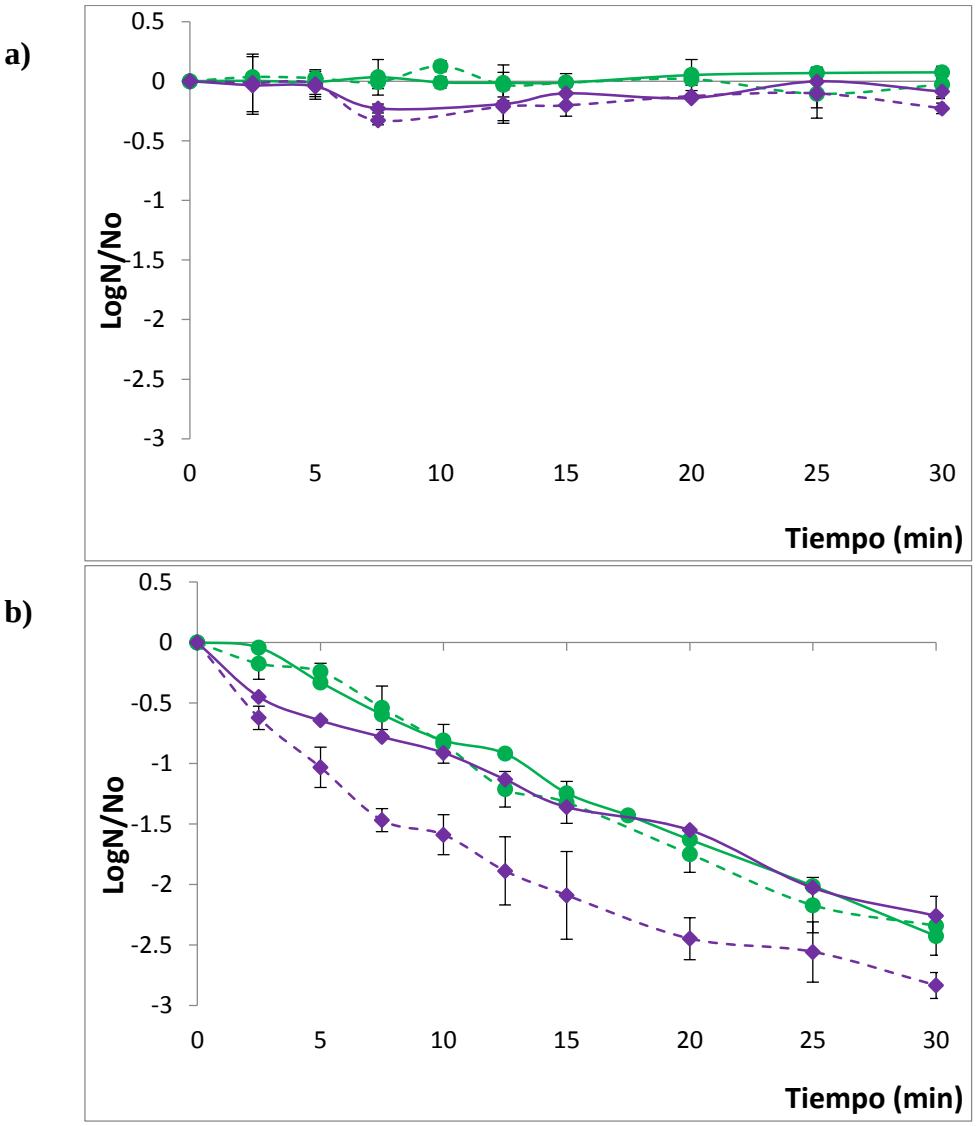
El tratamiento ultrasónico resultó inefectivo en la inactivación de las esporas de *A. acidoterrestris* en todas las condiciones estudiadas (**Figura 4.2.1a**). En concordancia con estos resultados, Djas y col. (2011) reportaron menos de 0,12 reducciones logarítmicas de esporas de *A. acidoterrestris* al aplicar US (10 min, 330 w) en jugo concentrado de manzana.

En el caso de *S. cerevisiae,* se obtuvo una reducción moderada de 2,5 ciclos logarítmicos luego de 30 min a 30 ± 1 °C para ambos jugos y a 44 ± 1 °C para el jugo de manzana comercial (**Figura 4.2.1b**). Por otra parte, en el caso de jugo de manzana exprimido y tratado con US a 44 °C, se observó una reducción un poco mayor de 2,8 ciclos logarítmicos (**Figura 4.2.1b**). Estos resultados se encuentran dentro del rango reportado por otros autores. Char y col. (2010) obtuvieron 1 ciclo logarítmico de reducción para *S. cerevisiae* KE 162 en jugo de naranja (pH 3,4; 10 °Brix) luego de 20 min de sonicación (20 kHz, 95,2 μm de amplitud) a 40 ± 1 °C. En este trabajo, se obtuvieron 1,5 y 2,4 reducciones logarítmicas luego de aplicar US (20 kHz, 95,2 μm de amplitud) durante el mismo tiempo y a 44 °C en jugo de manzana comercial y natural, respectivamente. Ferrante y col. (2007) estudiaron la inactivación de *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 en jugo de naranja natural (pH: 3,5) por US (20 kHz, 95,2 μm de amplitud) a 45 °C, y obtuvieron 0,5 ciclos de reducción logarítmica luego de 30 min de procesamiento.

Las curvas de inactivación de *S. cerevisiae* resultaron lineales en el jugo de manzana comercial para ambas temperaturas, y en el caso del jugo exprimido únicamente a la menor temperatura (**Figura 4.2.1b**). El comportamiento lineal de las curvas de inactivación de *S. cerevisiae* KE 162 también fue observado por Guerrero y col. (2001) en caldo Sabouraud (pH ajustado: 3) al aplicar US en un rango de temperatura de 35 ± 1 °C a 45 ± 1 °C; sin embargo a 55 ± 1 °C, observaron una desviación de la linealidad. En este

trabajo, se observó un comportamiento no lineal para el caso de *S. cerevisiae* inoculado en jugo natural de manzana tratado a 44 ± 1 ℃ (**Figura 4.2.2b**).

Figura 4.2.1. Curvas de inactivación de esporas de *A. acidoterrestris* (a) y células de *S. cerevisiae* (b) tratadas 30 minutos con US a 30 ± 1 ℃ (●) o 44 ± 1 ℃ (♦) en jugo comercial (▬) y natural exprimido (---) de manzana; desvío estándar (I)



Si bien las reducciones logarítmicas alcanzadas en este trabajo están dentro del rango reportado por otros autores, las pequeñas diferencias observadas pueden atribuirse al empleo de un vaso doble camisa de menor capacidad, a pesar de haber empleado el mismo volumen de muestra que en el presente trabajo (100 mL), lo cual aumenta la eficiencia del proceso (Guerrero y col., 2001), a la matriz y temperatura empleadas.

4.2.2 Utilización de temperatura moderada en el procesamiento LP_e

Ya se ha mencionado que la temperatura de las muestras se incrementa durante el procesamiento por LP, debido a la absorción de luz. En la **Parte I**, se utilizó una cama de hielo en escamas a modo de evitar el aumento de temperatura de los jugos. En este capítulo, se aprovechará el incremento de temperatura que se produce durante el mismo procesamiento por LP_e, para evaluar si las temperaturas moderadas incrementan la efectividad del procesamiento por LP_e.

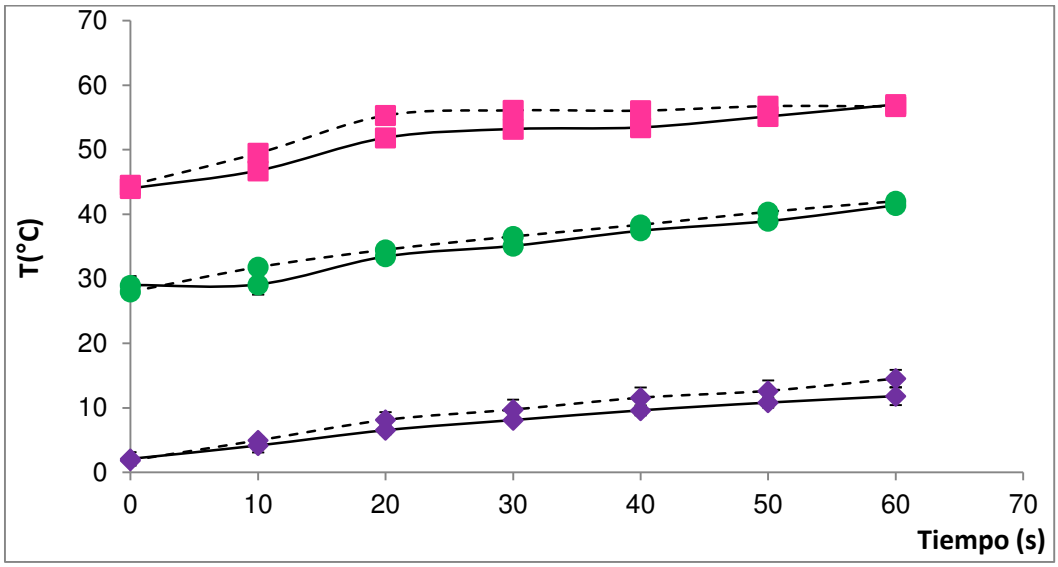
Es pertinente resaltar que las curvas de inactivación obtenidas de LP_e asistida por temperatura no han sido modeladas dado que son curvas de inactivación no isotérmicas y no se ha encontrado al momento un modelo adecuado de ajuste, quedando este objetivo pendiente.

4.2.2.1 Perfil de temperatura

La evolución de la temperatura de jugo de manzana con distinta temperatura inicial de procesamiento por LP_e (T_{LPei}) se muestra en la **Figura 4.2.2.** Durante el tratamiento con LP_e, la temperatura de las muestras aumentó con el tiempo como consecuencia de la absorción de luz (Krishnamurthy y col., 2007). El incremento de temperatura osciló entre los 10 y 14 ± 1 °C luego de 60 s de exposición a LP_e, dependiendo principalmente de la T_{LPei}, y en menor medida, del tipo de jugo (natural o comercial).

El jugo de manzana natural exhibió levemente mayor incremento de temperatura que el jugo comercial, y en particular a la mayor temperatura evaluada, probablemente debido a la mayor absorbancia que presenta el primer jugo en el rango UV-IR (**Resultados y Discusión, Figura 4.1.2**). Los sistemas con T_{LPei} 2 °C y 30 °C mostraron un incremento lineal de la temperatura con escasas diferencias entre las dos matrices.

Figura 4.2.2. Perfil de temperatura de jugos de manzana comercial (—) y natural exprimido (---).T_{LPei}: 2 °C (♦), 30 °C (●) o 44 °C (■), durante el tratamiento por LP_e a 10 cm de distancia de la lámpara, T: temperatura del jugo a un dado tiempo de tratamiento. Desvío estándar (I).



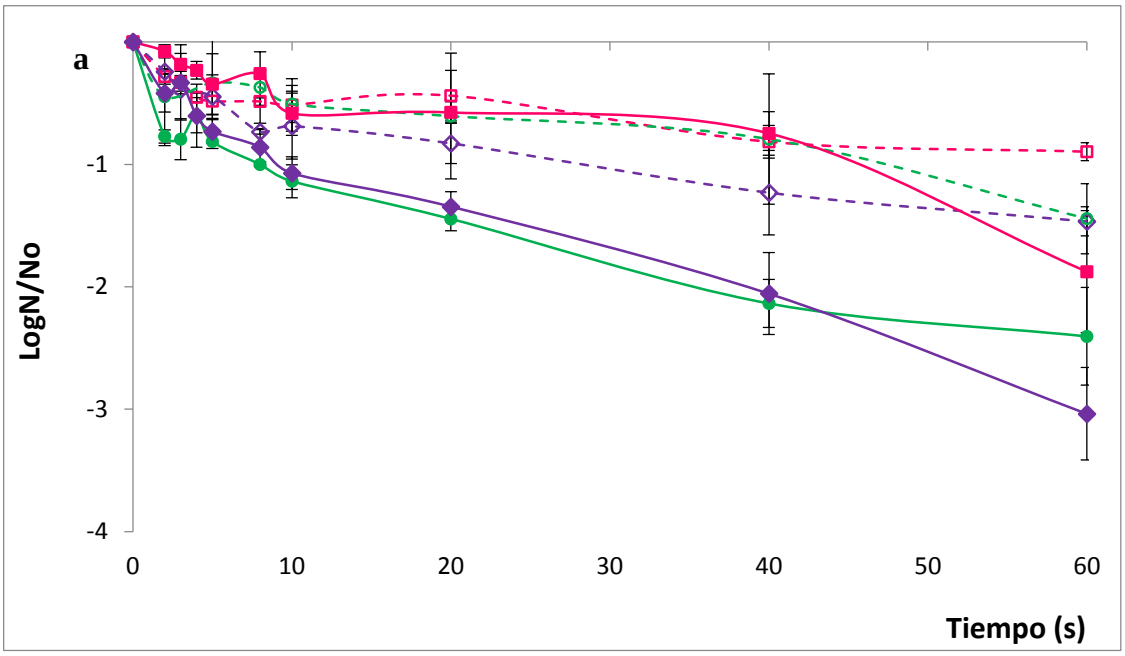
Sin embargo, se hallaron diferencias para la condición de T_{LPei} 44 °C, donde el jugo natural alcanzó una T_{LPef} de 56 °C a los 20 s de exposición a LP, mientras que dicha temperatura se alcanzó a los 60 s de tratamiento en el jugo de manzana comercial. No obstante, para esta condición, ambos sistemas exhibieron un alto incremento de la temperatura durante los primeros 20 s de tratamiento, seguidos de una segunda etapa con menor tasa de incremento.

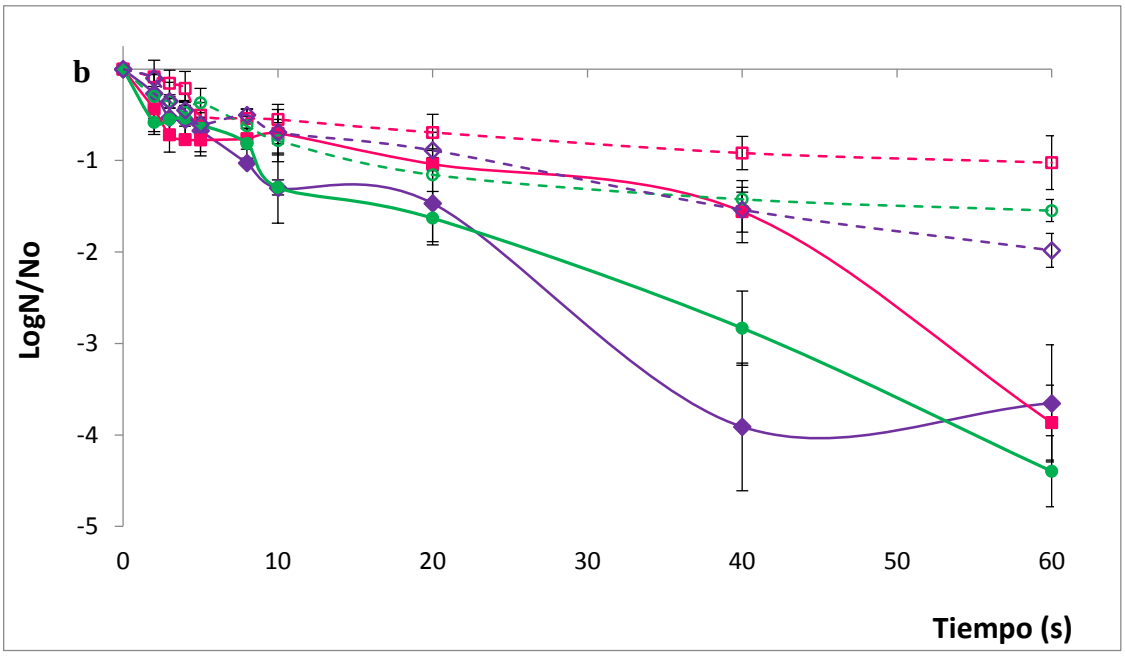
4.2.2.2 Estudios de reto microbiano

En la **Figura 4.2.3** se muestran las curvas de inactivación de las esporas de *A. acidoterrestris* y de células de *S. cerevisiae* en jugos comercial y natural de manzana, procesados por LP_e como se describió en **Materiales y Métodos, apartado 3.7.3**. El tratamiento por LP_e fue altamente efectivo en el jugo comercial dado que se obtuvieron hasta 3,0 y 4,4 ciclos de reducción para las esporas de *A. acidoterrestris* (**Figura 4.2.3a**) y células de *S. cerevisiae* (**Figura 4.2.3b**), respectivamente. Por otra parte, se obtuvieron sólo 1,5 y 2,0 ciclos de reducción logarítmica para las esporas de *A. acidoterrestris* (**Figura 4.2.3a**) y células de *S. cerevisiae* (**Figura 4.2.3b**), respectivamente, en jugo de

manzana natural. Este comportamiento puede atribuirse a diferencias en la absortividad de los jugos, dado que el jugo de manzana comercial exhibió menor absortividad en la región UV letal (**Figura 4.1.2, Resultados y Discusión, sección 4.2.2**). Además, la presencia de partículas de pulpa en

Figura 4.2.3. Curvas de inactivación de esporas de *A. acidoterrestris* (a) y células de *S. cerevisiae* (b) en jugos comercial (▬, símbolo sólido) y natural (---, símbolo abierto) de manzana, tratados con LP_e (T_{LPi}: 2 ± 1 ℃ (■; □), 30 ± 1 ℃ (●; ○), o 44 ± 1 ℃ (♦; ◊)); Desvío estándar (I)





jugo de manzana natural puede contribuir a disminuir la transmisión de luz debido a reflexión o dispersión, afectando así la efectividad del tratamiento (Gómez-López y col., 2007). Por otra parte, cabe destacar que la menor efectividad de LP_e en la inactivación de las esporas en el jugo comercial de manzana Cepita (**Figura 4.2.3a**) respecto al jugo de manzana comercial Tropicana (**Figura 4.1.11, Resultados y Discusión, Parte I, apartado 4.2.3.1.1**) podría atribuirse a la menor absortividad del último jugo en el rango UV (**Figura 4.1.3c, Resultados y Discusión, Parte I, apartado 4.2.2**)

Las curvas de inactivación de células de *S. cerevisiae* y esporas de *A. acidoterrestris* exhibieron una leve concavidad hacia arriba en jugo de manzana natural, mientras que en jugo de manzana comercial, las curvas de *S. cerevisiae* resultaron sigmoideas. Durante los primeros 10 s de exposición a LP_e, se observó un pronunciado decaimiento en el número de supervivientes en jugo de manzana natural, seguidos de una menor tasa de inactivación, que condujo a la presencia de cola en estas curvas de inactivación (**Figura 4.2.3**) Este comportamiento ha sido explicado por diferentes argumentos, como falta de homogeneidad dentro de la población (Xiong y col., 1999), fenómenos múltiples de impacto (Yousef y Marth, 1988), presencia de sólidos solubles (Koutchma, 2009), diferentes habilidades de las células para reparar mutaciones a nivel del ADN (Wekhof, 2000), la topografía de la muestra, y el efecto de sombra que se origina a partir de los bordes de las cápsulas de Petri empleadas en los ensayos (Gómez-López y col., 2007; Yaun y col., 2003, 2004).

Para ambas cepas y matrices se alcanzó mayor inactivación para los sistemas que tuvieron mayor incremento de temperatura. La diferencia más notoria se obtuvo a los 40 s (47,76 J/cm^2) de tratamiento. A dicha dosis, se alcanzó una reducción de 0,74 o 2,05 ciclos logarítmicos para las esporas de *A. acidoterrestris* según si T_{LPei} era 2 ± 1 °C o 44 ± 1 °C, respectivamente, en jugo de manzana comercial (**Figuras 4.2.3a**).

La inactivación de esporas de *A. acidoterrestris* por LP (sistema continuo, 1,5 J/cm^2) también ha sido reportada por Chaine y col. (2012), quienes obtuvieron una reducción de ~4 ciclos logarítmicos en jarabe de azúcar (65 °Brix). Por otra parte, en el presente trabajo, se alcanzó una reducción de 1,56 o 3,91 ciclos logarítmicos a los 40 s de exposición a LP (47,76 J/cm^2) para

S. cerevisiae, cuando T_{LPei} fue 2 ± 1 °C o 44 ± 1 °C, respectivamente (**Figura 4.2.3b**). En estas mismas condiciones, se obtuvieron 0,80 y 1,23 ciclos logarítmicos para esporas de *A. acidoterrestris* en jugo de manzana natural (**Figura 4.2.3a**); mientras que para *S. cerevisiae*, se alcanzaron 0,91 y 1,53 ciclos logarítmicos en dicha matriz (**Figura 4.2.3b**). A los 60 s (71,6 J/cm^2) de exposición a LP se observó una pequeña diferencia en la inactivación de las esporas de *A. acidoterrestris* en jugo de manzana comercial, ya que se obtuvieron 1,87 y 3,03 ciclos logarítmicos según la T_{LPei} era de 2 ± 1 °C o 44 ± 1 °C, respectivamente (**Figura 4.2.3a**).

Krishnamurthy y col. (2007) estudiaron la inactivación de *S. aureus* en leche tratada con LP en flujo continuo y también reportaron que el incremento de temperatura provocado por la porción IR del tratamiento LP, podría jugar un importante rol en mejorar la eficiencia del mismo en la inactivación microbiana. Estos autores recalcaron que el incremento de la temperatura no podría haber sido el responsable de la inactivación de *S. aureus* dado que la temperatura más alta registrada se correspondió con un valor no letal de 38 °C. Cheigh y col. (2012) también propusieron que el efecto de inactivación de la LP es sobre distintos sitios blanco dado que observaron a través de micrografías que células de *L. monocytogenes* y *E. coli* tratadas con UV-C mantenían su forma respecto al control; mientras que células tratadas con LP sufrieron destrucción de la pared celular y de la membrana plasmática, así como ruptura de la organización interna.

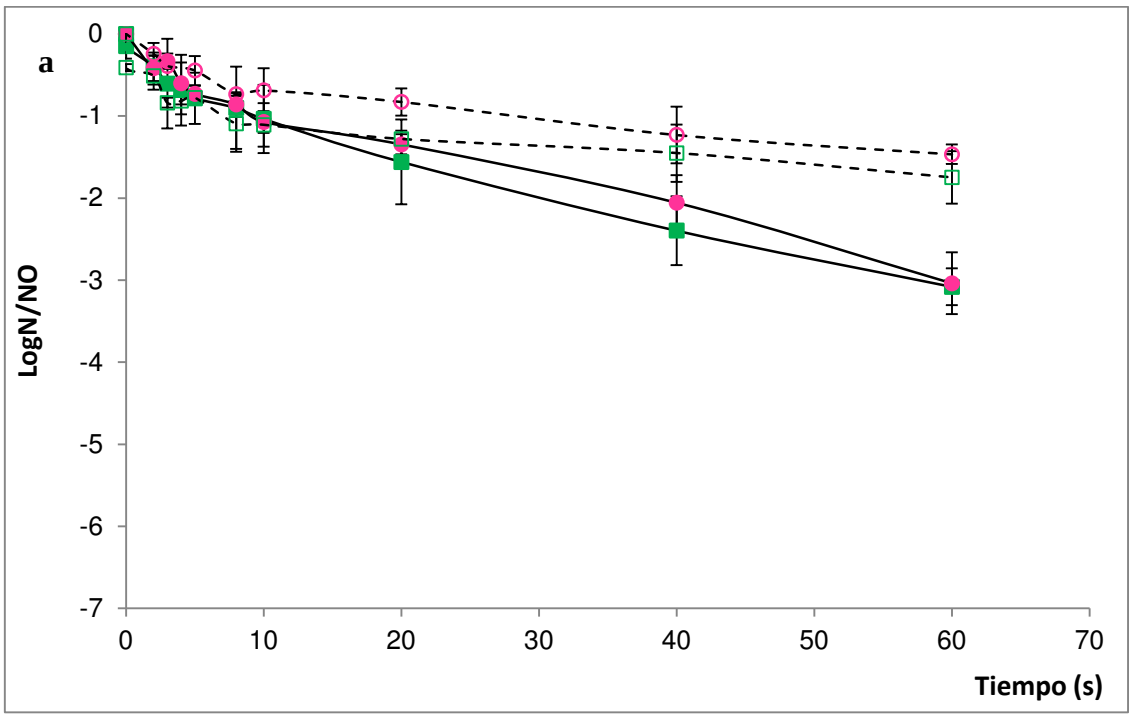
4.2.3 Combinación de US y LP estanco asistido por temperatura

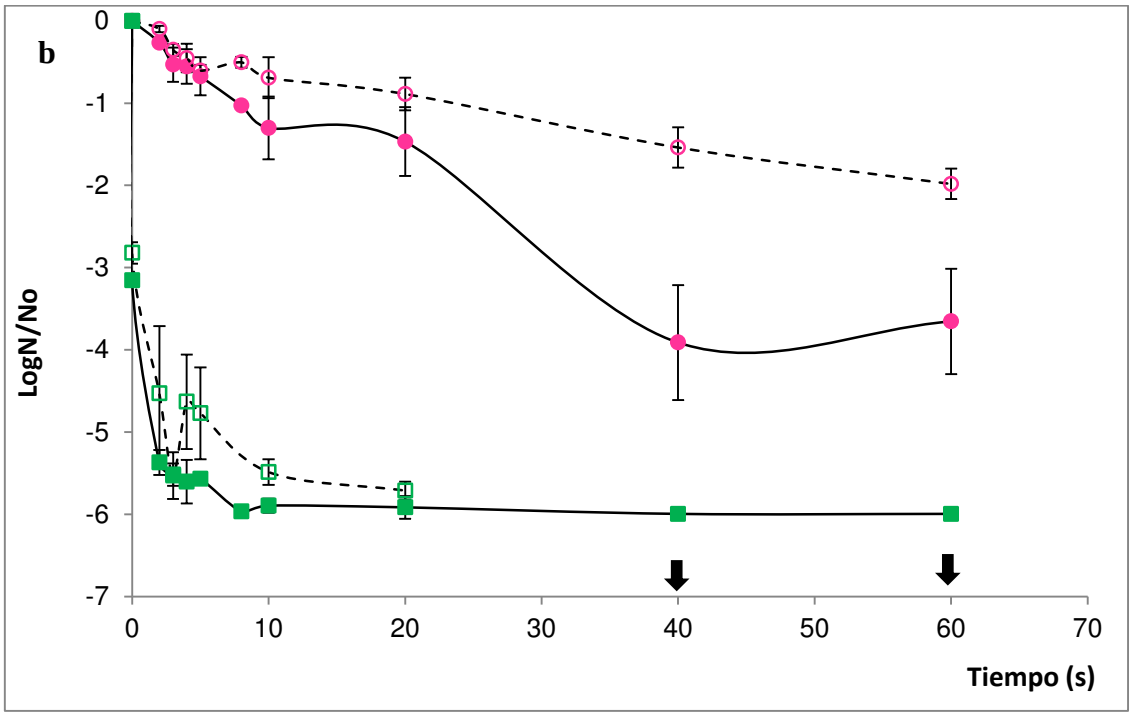
En base a los distintos métodos de acción de US y LP sobre los microorganismos, se decidió combinar estas tecnologías como método de preservación del jugo de manzana. En esta sección se evaluará la efectividad del tratamiento de LP_e asistido por temperatura y pretratado con las condiciones más óptimas encontradas de US, sobre la inactivación de *S. cerevisiae* y esporas de *A. acidoterrestris* en jugo de manzana.

4.2.3.1 Estudios de reto microbiano

En la **Figura 4.2.4** se muestran las curvas de inactivación de las esporas de *A. acidoterrestris* y células de *S. cerevisiae* inoculados en jugo comercial y natural de manzana y tratados con LP_e (60 segundos) con o sin previa sonicación (30 minutos) (**Materiales y Métodos, apartado 3.7.4**). Al aplicar un pretratamiento de US, no se hallaron diferencias en la forma de las curvas de inactivación o en el nivel de reducciones alcanzado para las esporas de *A. acidoterrestris* en ambas matrices respecto de la aplicación de LP_e de modo individual (**Figura 4.2.4a y 4.2.4a)**, lo cual era lo esperado dado que el tratamiento ultrasónico es inefectivo en la inactivación de esporas. En contraposición, la forma de la curva de inactivación de *S. cerevisiae* por LP_e con pretratamiento US, difiere considerablemente de las correspondientes a la aplicación de LP_e individual en ambas matrices, lo que sugiere una mayor sensibilidad al tratamiento LP_e debido al daño previo sufrido por US. La aplicación de US simple (30 min, 44 ± 1 °C) provocó una reducción de ~ 2,5 ciclos logarítmicos de *S. cerevisiae* en ambas matrices; y 2,0 y 3,7 ciclos de reducción al aplicar 60 s LP simple (71,4 J/cm^2, T_{LPei} 44 ± 1 °C) en jugo de manzana natural y comercial, respectivamente. Al aplicar US previo a LP, se alcanzaron hasta 6 ciclos de reducción para ambos jugos a los 10 s de LP_e). Por lo que, la aplicación de US previo a LP_e incrementó la tasa de inactivación a bajas dosis de LP_e. Las curvas de inactivación de *S. cerevisiae* tratados por LP_e exhibieron concavidad hacia arriba y estuvieron caracterizadas por un pronunciado decrecimiento durante los primeros 10 s de tratamiento, luego el número de supervivientes decreció lentamente al aumentar el tiempo de exposición a LP_e, y en algunos casos se observó la presencia de cola (**Figura 4.2.4b**). No se detectaron sobrevivientes hacia el final del tratamiento en jugo comercial de manzana, mientras que en jugo natural, las curvas presentaron una cola pronunciada (**Figura 4.2.4b**).

Figura 4.2.4. Curvas de inactivación de esporas de *A. acidoterrestris* (a) y células de *S. cerevisiae* (b) en jugo de manzana comercial (símbolos rellenos, ▬) y natural exprimido (símbolos abiertos,- -) tratados 60 s LP_e (T_{LPi} : 44 ± 1 ℃)(●; ○) o 60 s LP_e con un tratamiento previo de 30 min US (■; □). (I) Desvío estándar.





Adicionalmente, se realizó un ANOVA según lo descripto en **Materiales y Métodos, apartado 3.7.4** con el propósito de detectar si los distintos tratamientos aplicados diferían entre sí en cuanto a su efectividad. En la **Figura 4.2.5**, se muestran el grado de inactivación logrado al final de los tratamientos simples de US (10 y 30 min) y LP_e (20 y 60 s) o la combinación US+LP_e a dosis y perfiles de temperatura selectos, así como también las diferencias significativas entre los tratamientos luego de aplicar el Test de Tukey.

El ANOVA mostró que los términos simples *tratamiento*, *temperatura* y la interacción *tratamiento*temperatura* resultaron significativos para predecir la respuesta, Log N/No con altos valores del estadístico Fisher, F (p-valor< 0,001), lo que indicó que la efectividad de cada tratamiento dependió del valor inicial de temperatura elegido para el tratamiento LP_e (T_{LPei}). El coeficiente de determinación R^2_{aj} indicó que el modelo explicó la variabilidad en la información observada en un rango del 92 al 96 % (**Tablas 4.2.1a-d**).

No se observaron diferencias entre los tratamientos de 20 s y 60 s de LP_e simple para *S. cerevisiae* inoculada en jugo de manzana natural (**Figura 4.2.5a,b**). Algunas combinaciones de US+LP_e incrementaron de manera significativa la inactivación obtenida en los tratamientos simples. Por ejemplo, la combinación 10 min US+LP_e resultó más efectiva en la inactivación de esporas respecto a 20 y 60 s LP simple para la T_{LPei} 44 ± 1 °C en ambas matrices (**Figura 4.2.5a,b**), y sólo en el jugo comercial para *S. cerevisiae*. De igual manera, la combinación 30 min US + 20 s y 60 s LP resultó más eficiente en la inactivación de esporas que la aplicación de esos tratamientos por separado en ambas matrices, y para *S. cerevisiae* sólo en jugo comercial. La utilización de un valor inicial de temperatura en el tratamiento LP_e (T_{LPei}) de 44 ± 1 °C aumentó la efectividad de la combinación 10 min US + 20 s y 60 s LP_e y 30 min US + 60 s LP_e en comparación con una T_{LPei} de 2 ± 1 °C (**Figura 4.2.5a,b**).

Figura 4.2.5. Reducciones logarítmicas y diferencias significativas entre los tratamientos para *S. cerevisiae* en jugo comercial (a) y natural (b) de manzana y esporas de *A. acidoterrestris* en jugo comercial (c) y natural (d) de manzana tratados con US, LP o su combinación. Temperatura del tratamiento US simple: 20 ℃ (■), 30 ℃ (■) o 44 ℃ (■).Temperatura final (T_{LPf}) del tratamiento LP simple: 12 ℃ (■), 44 ℃ (■) o 56 ℃ (■). En las referencias, los números indican el tiempo de tratamiento en min (US) o segundos (LP). Las diferentes letras sobre las barras representan diferencias significativas ($p< 0,05$) entre los tratamientos según ANOVA y test de Tukey.

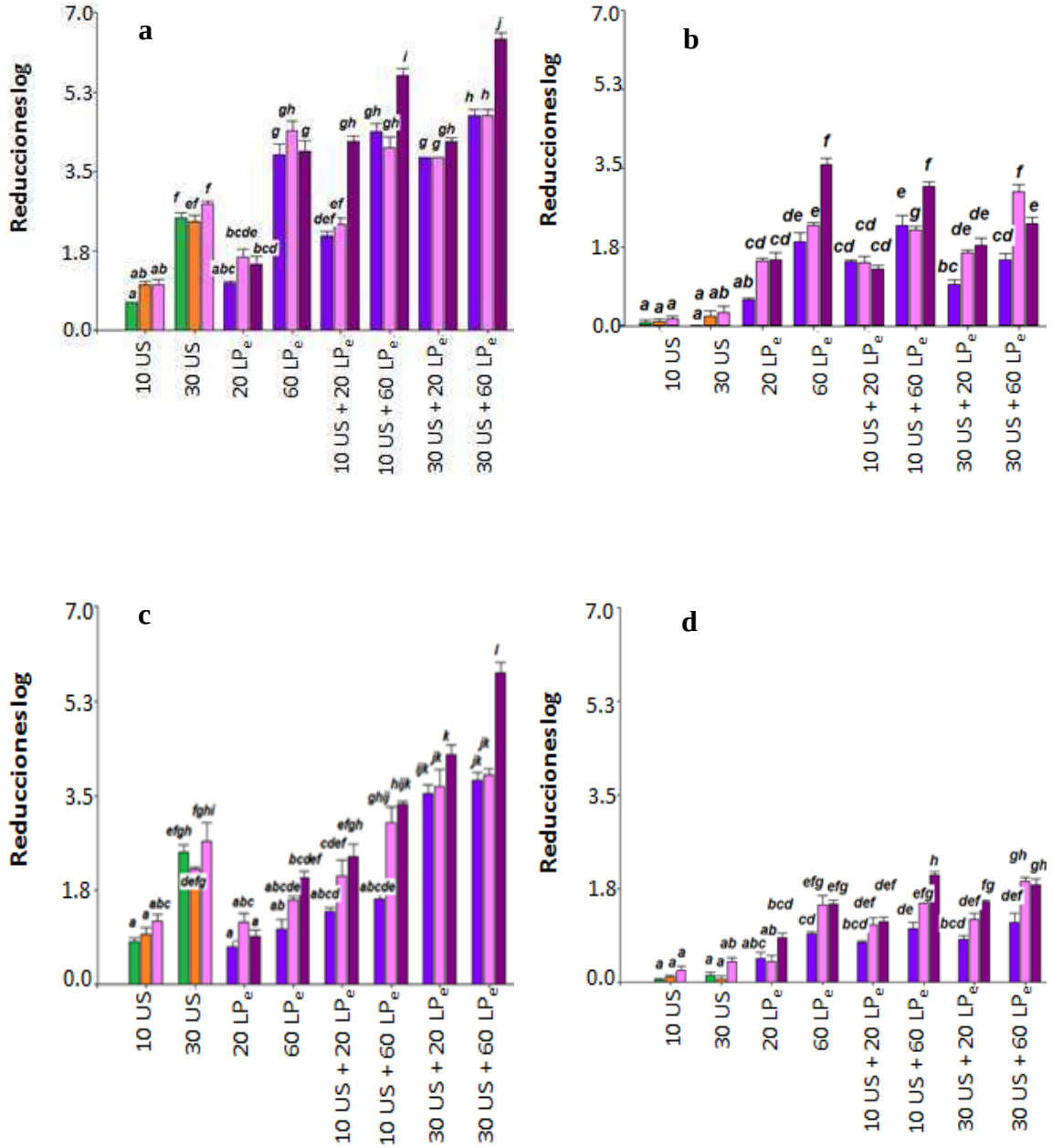


Tabla 4.2.1. ANOVA de dos factores mostrando el efecto del tratamiento (US, LP_e y US+LP_e) y la temperatura (T) en la inactivación de *S. cerevisiae* (*I*) y esporas de *A. acidoterrestris* (*II*) en jugo comercial (a) y natural (b) de manzana.

a)

I Fuente	GL	CM	F^a	*II* Fuente	GL	CM	F^a
Tratamiento	7	15,03	159,99****	**Tratamiento**	7	2,94	126,96****
T	2	4,95	52,69****	**T**	2	1,67	72,23****
Tratamiento*T	14	0,56	5,92****	**Tratamiento*T**	14	0,11	126,96****
Error	48	0,09		**Error**	48	0,02	
Total	71			**Total**	71		
R^2		0,96		R^2		0,96	
F^b		56,88****		F^b		47,84****	

b)

I Fuente	GL	CM	F^a	*II* Fuente	GL	CM	F^a
Tratamiento	7	21,97	348,19****	Tratamiento	7	7,93	183,10****
T	2	4,49	70,81****	T	2	2,18	50,29****
Tratamiento*T	14	0,74	11,71****	Tratamiento*T	14	7,92	9,41****
Error	48	0,06		Error	48	0,04	
Total	71			Total	71		
R^2		0,98		R^2		0,97	
F^b		119,26****		F^b		65,83****	

GL: grados de libertad; **CM**: media de cuadrados; F^a: estadístico de Fisher parcial; F^b: estadístico Fisher del modelo. ****Significativo al 0,1 %

El tratamiento combinado 30 min US+ 60 s LP_e con T_{LPi} 44 °C resultó el más efectivo para inactivar a *S. cerevisiae* en ambas matrices, dado que se obtuvieron 6,4 y 3,8 reducciones logarítmicas en jugo de manzana comercial y natural, respectivamente (**Figura 4.2.5a,b**). En general, la combinación de estas dos tecnologías no térmicas presentó efecto aditivo en la inactivación de la levadura, dado por la suma de efectos individuales.

Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Muñoz y col. (2012b), quienes estudiaron el efecto de LP y la subsiguiente aplicación de US en la inactivación de *E. coli* y *L. innocua* inoculados en solución buffer. Estos autores reportaron que la aplicación de US posterior a LP, incrementó la

inactivación respecto a la aplicación de los tratamientos simples, sólo en el caso de *L. innocua* pero no para *E. coli.* Por otra parte, Muñoz y col. (2011 y 2012a) estudiaron la inactivación de *E. coli* en jugo de naranja y manzana por la combinación de LP en flujo continuo y termosonicación. En concordancia con los resultados aquí mostrados, estos autores encontraron efectos aditivos al combinar las tecnologías.

A pesar que, la combinación US+LP_e no mejoró la inactivación de las esporas de *A. acidoterrestris* respecto a la aplicación de LP_e simple (**Figura 4.2.5c,d**), el incremento de la temperatura inicial, mejoró la efectividad de los tratamientos: 60 s (71,6 J/cm^2) LP_e, 10 min US + 60 s LP y 30 min US+LP en ambas matrices (**Figura 4.2.5.c,d**). Por lo tanto, la mayor T_{LPei} ensayada aumentó la eficiencia del tratamiento de LP y algunas combinaciones de US+LP_e para ambas cepas en comparación con el menor incremento de temperatura.

4.2.3.1.1.1 Dinámica del crecimiento de la flora nativa sobreviviente durante el almacenamiento en refrigeración de jugos frutales con tratamiento US+LP_e.

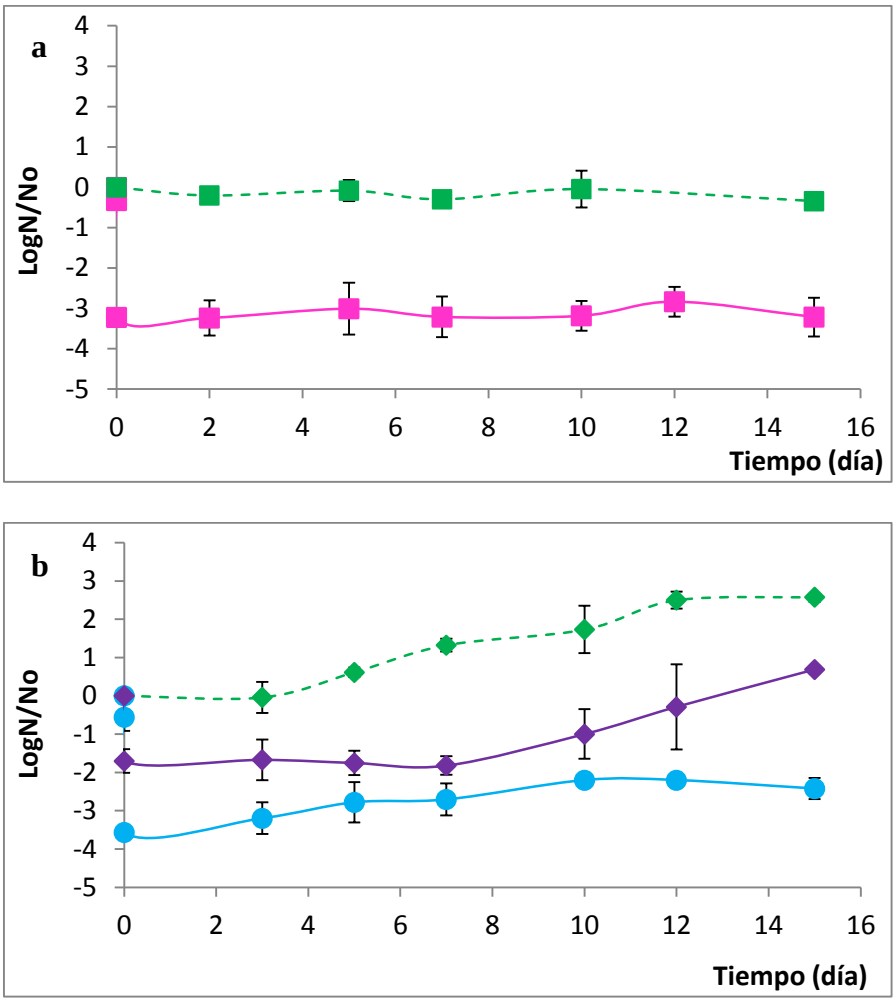
Tal como se realizara en la **Parte I**, se llevaron a cabo estudios de almacenamiento de los microorganismos inoculados en jugo de manzana procesado con el tratamiento simple LP_e o combinado, US+LP_e, con el objeto de estudiar la posibilidad de la recuperación de los mismos, procediendo según lo descripto en **Materiales y Métodos, apartado 3.11.1.**

El nivel de inactivación de las esporas de *A. acidoterrestris* alcanzado luego de 60 s (71,6 J/cm^2; T_{LPei} 44 ± 1 °C) de exposición a LP_e se mantuvo constante durante 15 días de almacenamiento refrigerado al igual que la población no tratada (control), debido a las condiciones de muy baja temperatura para esta cepa termo-acidofílica (**Figura 4.2.6a**).

Por otra parte, la población control de *S. cerevisiae* creció ~2,6 ciclos log a partir del tercer día de almacenamiento. La aplicación de 60 s (71,6 J/cm^2; T_{LPei} 44 °C) LP_e, que provocó una reducción de 1,7 ciclos-logarítmicos, previno de la recuperación de las levaduras durante 7 días. A partir de ese momento, la

población tratada comenzó a crecer a la misma tasa que las muestras control. Si bien las células tratadas con LP_e se recuperaron 2,4 ciclos logarítmicos luego de 15 días de almacenamiento, el recuento de las muestras tratadas resultó inferior al control (**Figura 4.2.6b**). La combinación 10 min US + 20 s LP_e provocó una reducción de 3,6 ciclos logarítmicos de *S. cerevisiae*, la cual logró recuperarse sólo en 1,1 ciclos logarítmicos, luego de 15 días de almacenamiento. La diferencia entre las muestras control y tratadas hacia al final del almacenamiento fue de ~5 ciclos logarítmicos (**Figura 4.2.6b**).

Figura 4.2.6. Almacenamiento de esporas de *A. acidoterrestris* (a) y células de *S. cerevisiae* (b) en jugo comercial de manzana a 5 ± 1 °C. Control (---, ■) y tratado (—) durante 60 s LP_e (■), 20 s LP_e (♦) o 10 min US/20 s LP_e (●) a T_{LPei} 44 ± 1 °C; (I) Desvío estándar.



4.2.4 Análisis mediante citometría de flujo del estado fisiológico de las células microbianas frente al tratamiento combinado US+LP$_e$

Con el objeto de monitorear la habilidad de *S. cerevisiae* de acumular y retener FDA como indicador de la integridad de la membrana y la actividad enzimática, y de incorporar PI como consecuencia de daño en la membrana luego de tratarla con US, LP$_e$ (T_{LPei} 2 y 44 °C) y US+LP$_e$ según **Materiales y Métodos, apartado 3.7.2, 3.7.3 y 3.7.4**, se graficó la densidad de FDA vs PI para cada condición ensayada.

La **Figura 4.2.7** muestra la densidad de fluorescencia verde (eje y) y roja (eje x) para células de *S. cerevisiae,* inoculada en jugos de manzana comercial y natural tratadas por 10 y 30 min US (T_{US} 20 y 44 °C), 60 s LP$_e$ (T_{LPei} 2 y 44 °C) y la combinación US+LP$_e$. En la **Tabla 1.8** de la **Introducción, apartado 1.11.2** se especifican los patrones de fluorescencia para cada uno de los cuadrantes y el mecanismo celular involucrado.

La exposición de células de *S. cerevisiae* a US y US+LP$_e$ provocó una migración de células del cuadrante i (células con actividad esterasa y membrana intacta) al cuadrante iv (células con membrana permeabilizada). El pasaje fue casi total para las condiciones de 10 min US+LP$_e$, 30 min US y 30 min US+LP$_e$ dado que se hallaron entre 88,7 -98,4 % de células en el cuadrante 4 tras la aplicación de dichos tratamientos. Mientras que el tratamiento de 10 min US promovió una migración menos pronunciada, hallándose entre 58,8 -77,2 % (T_{LPei} 2 °C) y ~89 % (T_{LPei} 44 °C) de células en el cuadrante iv, según el tipo de jugo y la temperatura del sistema (**Figura 4.2.7a,b,c,d**). Por otra parte, el tratamiento de LP$_e$ produjo a las dos temperaturas un pasaje de 34,5- 91,5 % y ~68-95,7 % al cuadrante iv en jugo comercial y natural, respectivamente y la temperatura. La menor proporción de células F^-PI^+ observadas en el jugo natural estaría vinculada con la menor inactivación alcanzada para dicho jugo (**Figura 4.2.3**). Se halló una importante fracción (~25 %) de células doblemente marcadas (F^+PI^+) luego de la aplicación de LP$_e$ en jugo natural de manzana a ambas temperaturas evaluadas. Esto indicaría que la integridad de

Figura 4.2.7. Gráficos de densidad de fluorescencia de FDA vs. PI para evaluar los efectos sobre la actividad esterasa e integridad de membrana de *S. cerevisiae* en jugo de manzana comercial (a, c) y natural (b, d) con distintos tratamientos: US (10 y 30 min), LP_e (71,6 J/cm^2) y 10 y 30 min- US+LP_e. **a,b:** T_{US}: 20 ℃; LP_{ei}: 2 ℃; T_{US}: 20 ℃/T_{LPei}: 2 ℃; **c,d:** T_{US} 44 ℃; LP_{ei}: 44 ℃; T_{US} 44 ℃/T_{LPei}: 44 ℃. El número en cada esquina representa el porcentaje de la población que cae en cada cuadrante. Los números en la descripción de tratamientos indican los tiempos de US

aa

membrana se vio afectada, pero las células retuvieron la actividad esterasa gracias a la hidrólisis del fluorocromo FDA. La presencia de esta subpoblación sub-letal podría afectar la vida útil de los jugos tratados con LP (Zhao y col., 2011), dado que las células son metabólicamente activas pero no pueden ser detectadas por los métodos convencionales de recuento en placa (Schenk y col., 2011). Asimismo, Pataro y col. (2011) también reportaron la existencia de *E. coli* y *L. innocua* con daño sub-letal luego del tratamiento de LP en sistema continuo (500 mL; 1,8-5,1 J/cm^2) en jugo de manzana y naranja al cultivar en medio selectivo y no selectivo.

Luego de 10 min US a 20 ± 1 °C, se encontró sólo el 77,2 % y 58,8 % de las células en el cuadrante iv en jugo comercial y natural de manzana, respectivamente; mientras que, cuando la temperatura fue de 44 ± 1 °C, se halló entre el 88,6 % y 89,4 % (**Figura 4.2.7a,b,c,d**). Por lo tanto, la temperatura aceleró el pasaje del cuadrante 1 al 4 para la condición de 10 min US en ambas matrices.

No se observaron diferencias en los porcentajes de la subpoblación F^-PI^+ para las condiciones de 10 min US+LP$_e$, 30 min US y 30 min US+LP$_e$, a pesar de que sí se obtuvieron diferencias en el grado de inactivación (**Figura 4.2.5**).

Se llevó a cabo la técnica de clasificación de células o *cell sorting* de las poblaciones halladas en el cuadrante iv correspondiente a dichos tratamientos, para evaluar si hay diferencias en la capacidad de recuperación de las levaduras en medio rico. No hubo recuperación en el caso de las poblaciones tratadas 30 min US+LP$_e$ para ambas temperaturas, pero recuperaron 2 x 10^2 UFC/mL y 1 x 10^2 UFC/mL de las poblaciones tratadas 30 min US a T_{US}: 20 ± 1 °C y 44 ± 1 °C, respectivamente. Esto sugiere que la permeabilización de la membrana ocurrió pero no sería el único factor responsable de la inactivación de la levadura.

Joyce y col. (2010) reportaron un 76.5 % y 90.9 % de células de *E. coli* muertas luego de 10 y 15 min de sonicación (200 mL, 20 kHz, 25 °C), respectivamente. Además, Wu y col. (2012) estudiaron la integridad y viabilidad por citometría de flujo de una suspensión de *Microcystis aeruginosa* tratada 30 min US (200 mL, 20 kHz, 25 °C), y hallaron que el 85 % de las células se encontraba en el cuadrante iv. Estos autores atribuyeron la pérdida de viabilidad al efecto del US que provoca ruptura de las membranas. En

contraposición con los resultados aquí mostrados, Ananta y col. (2005) reportaron que sólo un 11 % de células de *Lactobacillus rhamnosus* tratadas con 20 min US (20 kHz, 10 mL, T <20 °C) presentaron ruptura de membrana.

Cuando se obtuvieron los gráficos de tamaño (FSC) vs granulosidad (SSC) de *S. cerevisiae* tratadas por US+LP_e, se puede advertir una disminución del tamaño celular y la complejidad interna de las células en caso de jugo comercial de manzana para todos los tratamientos; mientras que en jugo de manzana natural, se visualizó una disminución sólo del tamaño celular en los tratamientos de US y combinados. Estos cambios podrían atribuirse a la acción de las tecnologías sobre las paredes celulares ocasionando ruptura y quizá desprendimiento de la misma, visualizándose más pequeñas (**Figura 4.2.8**).

En la **Figura 4.2.9** se muestra el cambio de la actividad esterasa obtenido por la exposición a US y US+LP_e con distinta temperatura inicial y las correspondientes diferencias significativas entre los tratamientos obtenidas por aplicación del Test de Tukey, aplicando la **ecuación 3.24** de **Materiales y Métodos, sección 3.13**.

La interacción *tratamiento*temperatura* resultó una variable estadísticamente significativa con altos valores del estadístico F ($p< 0,001$) para el caso del jugo natural, mientras que para el jugo comercial, sólo la variable tratamiento resultó significativa ($p< 0,001$). El coeficiente de determinación, R^2_{aj} explicó la variabilidad observada en un 99 %. El tratamiento 10 min US a ambas temperaturas en jugo comercial de manzana y para el jugo natural en la condición T_{LPei}: 2 ± 1 °C, redujo la actividad esterasa al 10-16 % respecto del jugo sin tratamiento (100 %, **Figura 4.2.9**). Por otra parte, el tratamiento por LP_e redujo la actividad esterasa en un rango similar (~15 %) para jugo natural y para el comercial, entre 4-6 %. Esta mayor reducción observada en el jugo comercial es acorde a la mayor inactivación observada por el método de recuento en placa (**Figura 4.2.3b**). Los tratamientos 30 min US sólo y los combinados 10 min y 30 min US+LP_e, a ambos perfiles de temperatura, redujeron notoriamente la actividad esterasa a menos

Figura 4.2.8. Gráficos de punto para tamaño (FSC) vs granularidad (SCC) de *S. cerevisiae* control (a), y tratada 60 s LP_e (b), 10 min US (c), 10 US+LP_e (d), 30 US (e), 30 US+LP_e (f). Jugos de manzana comercial (i), y natural (ii).

i)

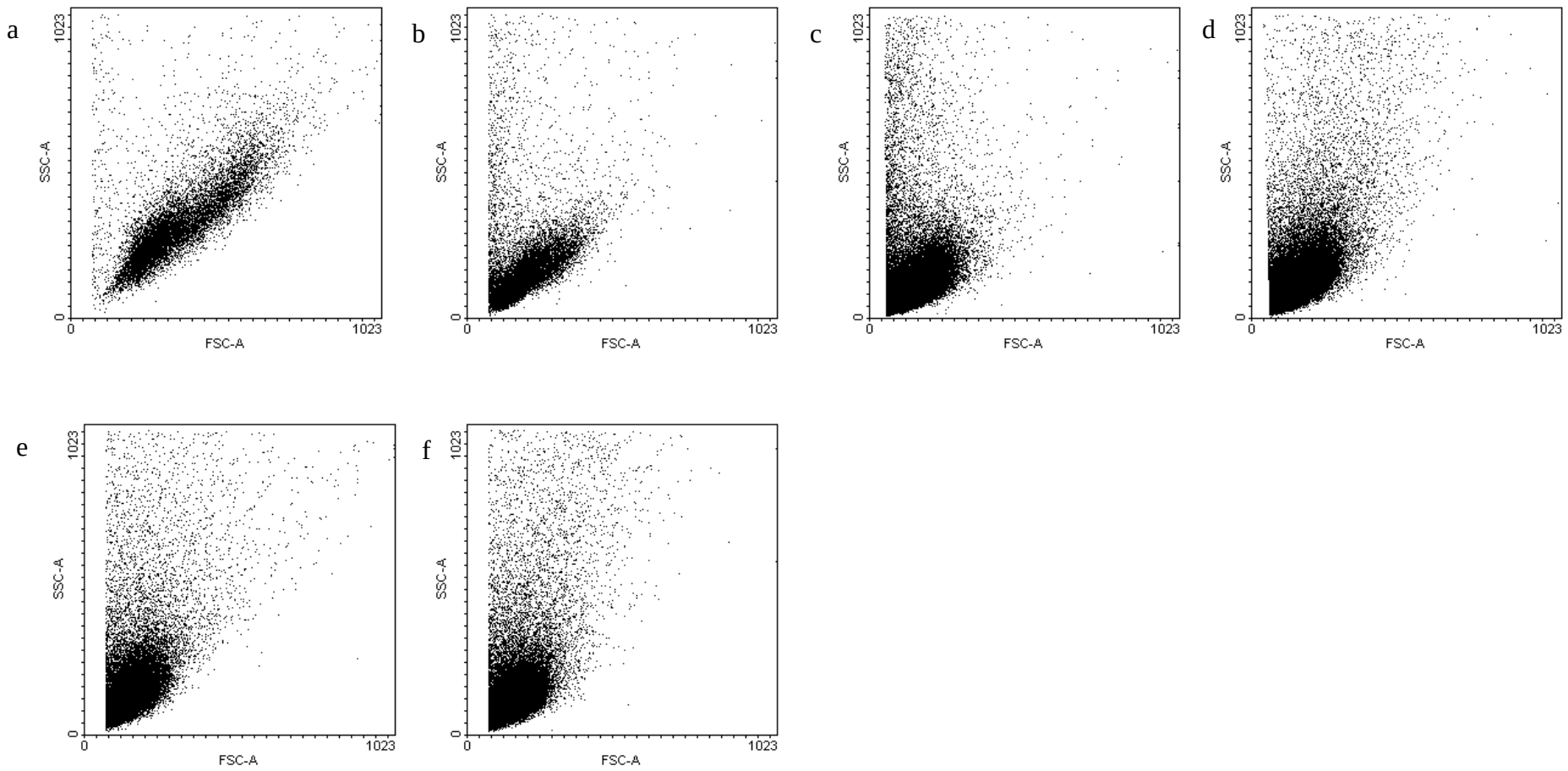
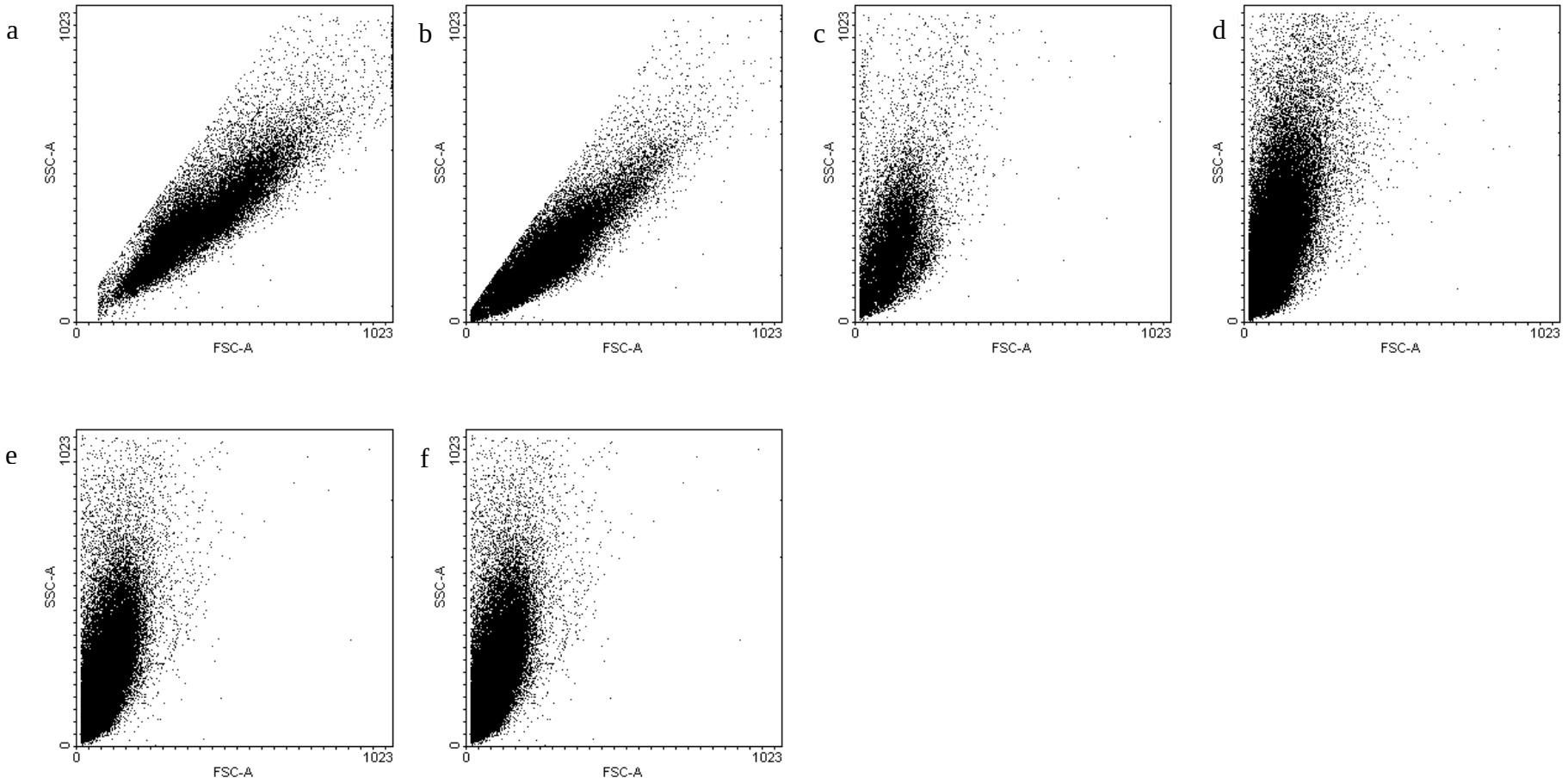


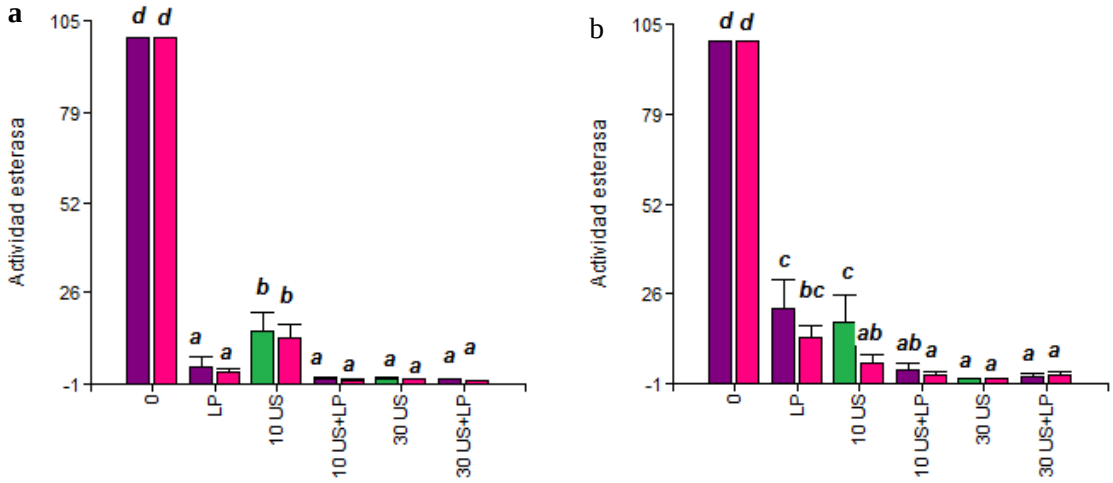
Figura 4.2.8. ***Continuación…***

ii)



de 2 % (**Figura 4.2.9**). Esta mayor reducción de la actividad esterasa eran esperables para el tratamiento combinado, debido a la mayor inactivación observada respecto a la aplicación de los tratamientos simples (**Figura 4.2.5a,b**), mientras que en el caso del tratamiento de 30 min US simple, podría deberse su mecanismo de inactivación, que provoca la ruptura de la pared celular, con la consecuente pérdida del FDA, impidiendo la marcación.

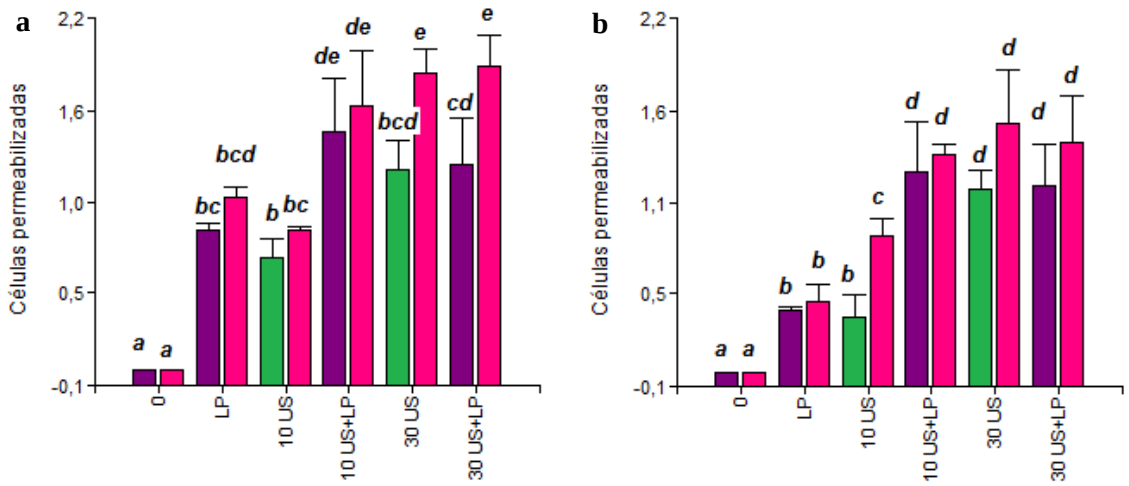
Figura 4.2.9. Cambios relativos de la actividad esterasa de *S. cerevisiae* en jugo de manzana comercial (a) y natural (b) control y con diferentes tratamientos. T_{US}: 20 ℃ (■), T_{LPei}: 2 ℃ (■), T_{US}: 20 /T_{LPei}: 2 ℃ (■) y T_{US} 44 ℃ (■), T_{US} 44 ℃/T_{LPei}: 44 ℃ (■). En las referencias, los números representan el tiempo en min (US). Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (p< 0,05) entre los tratamientos de acuerdo al test de Tukey. Desvío estándar (I).



La permeabilidad de la membrana de las células *S. cerevisiae* control y tratadas y las correspondientes diferencias significativas entre los tratamientos obtenidas por el test de Tukey se muestran en la **Figura 4.2.10**. La interacción *tratamiento*temperatura* resultó significativa (p< 0,001), y el coeficiente de determinación R^2_{aj} estuvo comprendido en un rango de 94-96 %. Todos los tratamientos indujeron permeabilización de la membrana. No se hallaron diferencias entre los tratamientos 10 min US y 60 s LP_e, dado que se obtuvo un incremento de permeabilización de la membrana de 0,9 y 0,8 ciclos logarítmicos luego de 10 min US en jugo comercial y natural; y de 1,0 y 0,5 luego de la exposición a LP_e en jugo comercial y natural, respectivamente.

Para ambas matrices, el tratamiento 30 min US provocó mayor permeabilización de membrana que 10 min US. Se produjo un aumento entre 0,8-0,9 y 1,5-1,6 ciclos logarítmicos luego de 10 y 30 min US, respectivamente, dependiendo de la matriz y la temperatura (**Figura 4.2.10a,b**). Estos resultados son consistentes con la mayor inactivación observada por el método de recuento en placa para la condición de 30 min US (**Figura 4.2.1b**). La aplicación de LP_e incrementó la permeabilidad de la membrana sólo para la condición de 10 min US+LP_e para ambas temperaturas en jugo natural y comercial (**Figura 4.2.10a,b**). Además, la temperatura incrementó la permeabilización de la membrana en el caso de 10 min US en jugo de manzana natural (**Figura 4.2.10b**) y 30 min y 30 min US+LP_e para el comercial (**Figura 4.2.10a**).

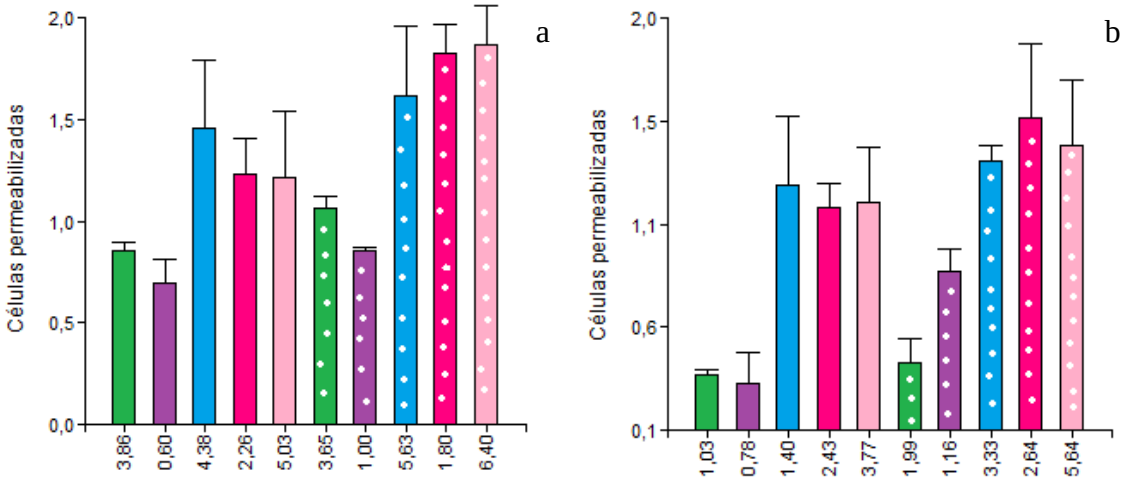
Figura 4.2.10. Permeabilización de la membrana de células de *S. cerevisiae* determinado por la incorporación de PI en función del tratamiento en jugo de manzana comercial (a) y natural (b). T_{US}: 20 ℃ (■), T_{LPei}: 2 ℃ (■), T_{US}: 20 /T_{LPei}: 2 ℃ (■) y T_{US} 44 ℃ (■), T_{US} 44 ℃/T_{LPei}: 44 ℃. En las referencias, los números representan el tiempo en min (US). Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos de acuerdo al test de Tukey. Desvío estándar (I).



Adicionalmente, se graficó el incremento de células que incorporaron PI (células permeabilizadas) en función del incremento de células no viables (**Figura 4.2.11**), con el propósito de analizar la relación entre la disminución en la población viable (determinado por el recuento en placa) y la permeabilización de la membrana de *S. cerevisiae* determinado según lo explicado en

Materiales y Métodos, sección 3.13. Puede observarse que se obtuvo un mayor número de células inactivadas respecto a la cantidad de células permeabilizadas (**Figura 4.2.11**); así por ejemplo, luego del tratamiento 30 US+LP_e a la temperatura más alta se obtuvieron 5,7 y 6,2 ciclos logarítmicos de reducción en jugo comercial y natural, respectivamente, pero sólo 1,8 y 1,4 reducciones logarítmicas de células permeabilizadas.

Figura 4.2.11. Células permeabilizadas de *S. cerevisiae* (determinadas por incorporación de PI) en función de las células no viables (determinadas por el método de recuento en placa) en jugo de manzana comercial (a) y natural (b). LP_e (■), 10 min US (■), 10 min+LP_e (■), 30 min US (■), 30 min+LP_e (■); T_{US}: 20 ± 1 ℃/T_{LPei}: 2 ± 1 ℃ (barras colores sólidos) y T_{US} 44 ± 1 ℃, T_{US} 44 ± 1 ℃/T_{LPei}: 44 ± 1 ℃ (barras con lunares blancos). En el eje de absisas, los números representan las reducciones logarítmicas alcanzadas para cada tratamiento. Desvío estándar (I).



Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Aronsson y col. (2005) y Ananta y col. (2005). Aronsson y col. (2005) atribuyeron este fenómeno a una posible reversión en la permeabilización, que no se revela con la marcación de PI. En contraposición, Ananta y col. (2005) obtuvieron un pequeño porcentaje de células F^-PI^+ luego de 20 min US en relación a la inactivación obtenida en el recuento en placa. Estos autores sugieren que la muerte celular provocada por la sonicación podría ocurrir incluso sin daño severo en la membrana.

4.2.5 Evaluación del daño de células sometidas a LP_e y US+LP_e por microscopia electrónica de transmisión

Con el propósito de complementar la información obtenida mediante las curvas de inactivación obtenidas y la técnica de citometría de flujo, se monitorearon los cambios estructurales asociados al daño de *S. cerevisiae* en jugo de manzana comercial control y tratado 10 min US (T_{US}: 44 ± 1 °C) o mediante la combinación US+LP_e (T_{US}: 44 ± 1 °C, T_{LPef}: 56 ± 1 °C), según lo explicado en **Materiales y Métodos, apartado 3.7.4**.

Las células control mostraron la forma elipsoidal característica (**Figura 4.2.12a,b,c**). Las estructuras celulares como paredes, organelas y membranas, aparecieron intactas con alta densidad electrónica. Luego de la aplicación de 10 min US, se visualizó discontinuidad de la membrana plasmática con pérdida del contenido celular y punción de la pared (**Figura 4.2.12d,e,f**). Estas observaciones fueron también reportadas previamente por Guerrero y col. (2005) al evaluar el efecto de 20 min US (100 mL, 45 °C, 20 kHz) sobre *S. cerevisiae* en medio modelo. La aplicación de US+LP_e provocó un cambio en la forma de las células, que se tornaron más redondeadas y con paredes hinchadas (**Figura 4.2.13g,j**). También se hallaron restos de células que perdieron su contenido intracelular (**Figura 4.2.13j**), células con menor densidad electrónica (**Figura 4.2.13g-j**) cuyo interior se encontraba coagulado y células donde no era posible distinguir estructura alguna (**Figura 4.2.13g-j**).

Takeshita y col. (2003) también observaron forma celular redondeada, distorsión de la membrana plasmática e incremento de la vacuolización luego de la exposición de *S. cerevisiae* en medio modelo a LP estanco (1,4-2,1 J/cm^2). Además, Krishnamurthy y col. (2007) reportaron daño en la pared celular y pérdida del contenido intracelular de *S. aureus* tratado 5 s LP estanco en medio modelo. Asimismo visualizaron encogimiento de plasmalema y colapso de estructuras internas.

En la **Figura 4.2.13** se muestran las imágenes correspondientes a las esporas control y tratadas 60 s LP_e (T_{LPei}: 44 °C) de *A. acidoterrestris* en jugo de manzana comercial**.** Las endoesporas no tratadas exhibieron su forma característica: core, membranas externa e interna, córtex, pared germinal,

cutícula y exosporio (**Figura 4.2.13a,b**). La exposición a LP_e (71,6 J/cm^2, T_{LPei}: 44 ℃), correspondiente a 3 ciclos de reducción logarítmicos, indujo la coagulación del material intracelular con la imposibilidad de distinguir ninguna estructura y restos de esporas sin contenido intracelular ("esporas fantasma") (**Figura 4.2.13e,f**). También pudieron visualizarse restos de esporas que perdieron su contenido intracelular (**Figura 4.2.13c**) y separación del exosporio de la capa de la espora (**Figura 4.2.13d**).

Figura 4.2.12. Imágenes MET de *S. cerevisiae* en jugo de manzana comercial con diferentes tratamientos. **a,b,c**: células no tratadas; **d-f**: 10 min US (T_{US}: 44 ℃), **g- i**: 60 s LP_e (T_{LPei}: 44 ℃), **j-l**: 10 min US+LP_e (T_{US}: 44 ℃, T_{LPei}: 44 ℃). Escala: **a, d, f, k**: 200 nm; **c,e,l**: 270 nm; **j**: 350 nm; **g**: 500 nm; **b**: 590 nm; **h,i**: 600 nm. **a,c**) Aspecto general de células intactas, mostrando organelas y membranas intactas; **b**) Grupo de células intactas con aspecto general similar; **d**) vacuolización; **e**) Pérdida de contenido intracelular a partir de un único sitio de punción; **f**) Alteración de la membrana plasmática y del contenido intracelular pero con pared intacta; **g**) Grupo de células redondeadas mostrando el contenido celular interrumpido y sin pared; **h**) Detalle de pared celular dañada e imposibilidad de distinguir estructuras internas; **i**) contenido celular degradado y separación del citoplasma de la pared; **j**) Grupo de células con pérdida de material interno y contenido intracelular coagulado.

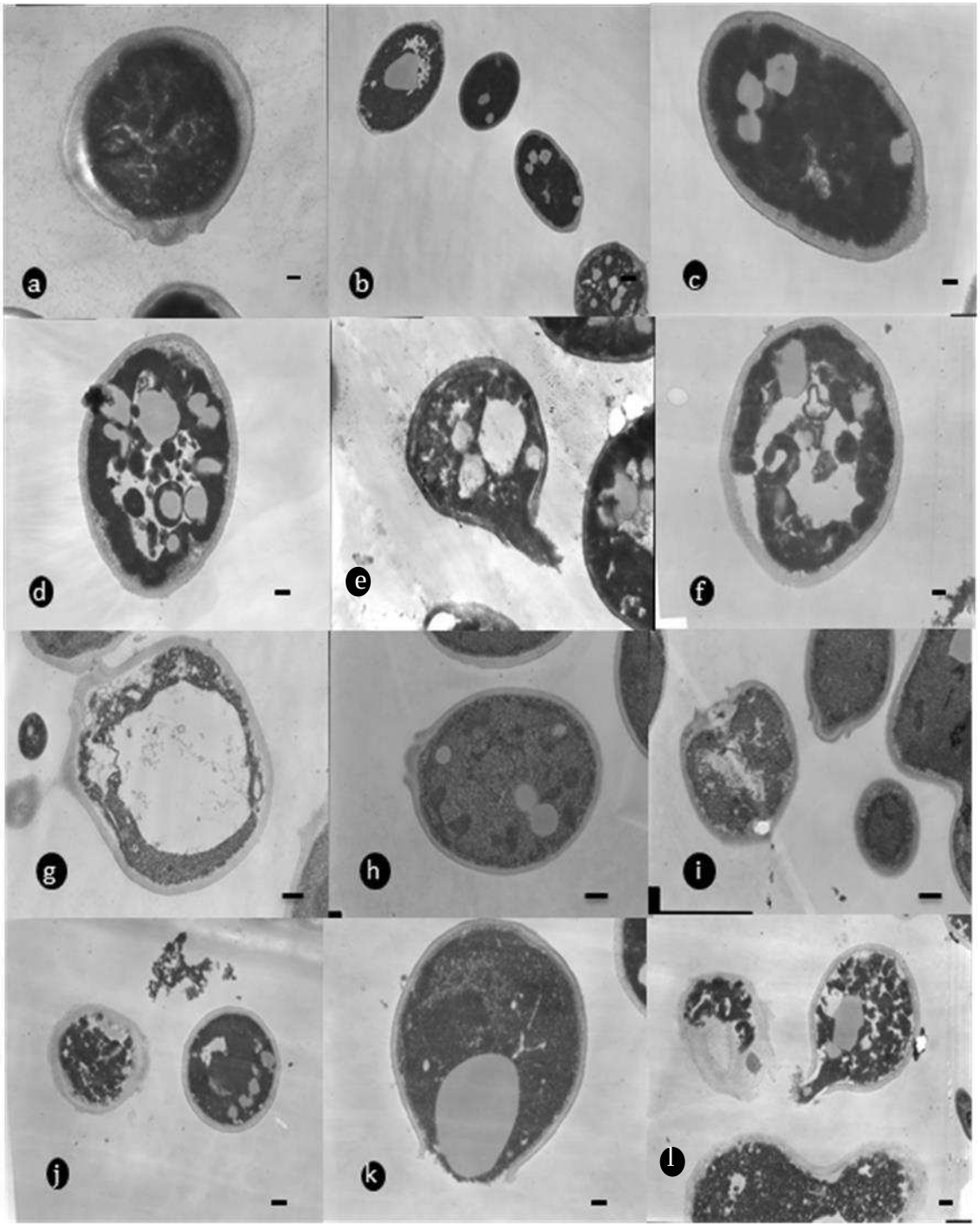
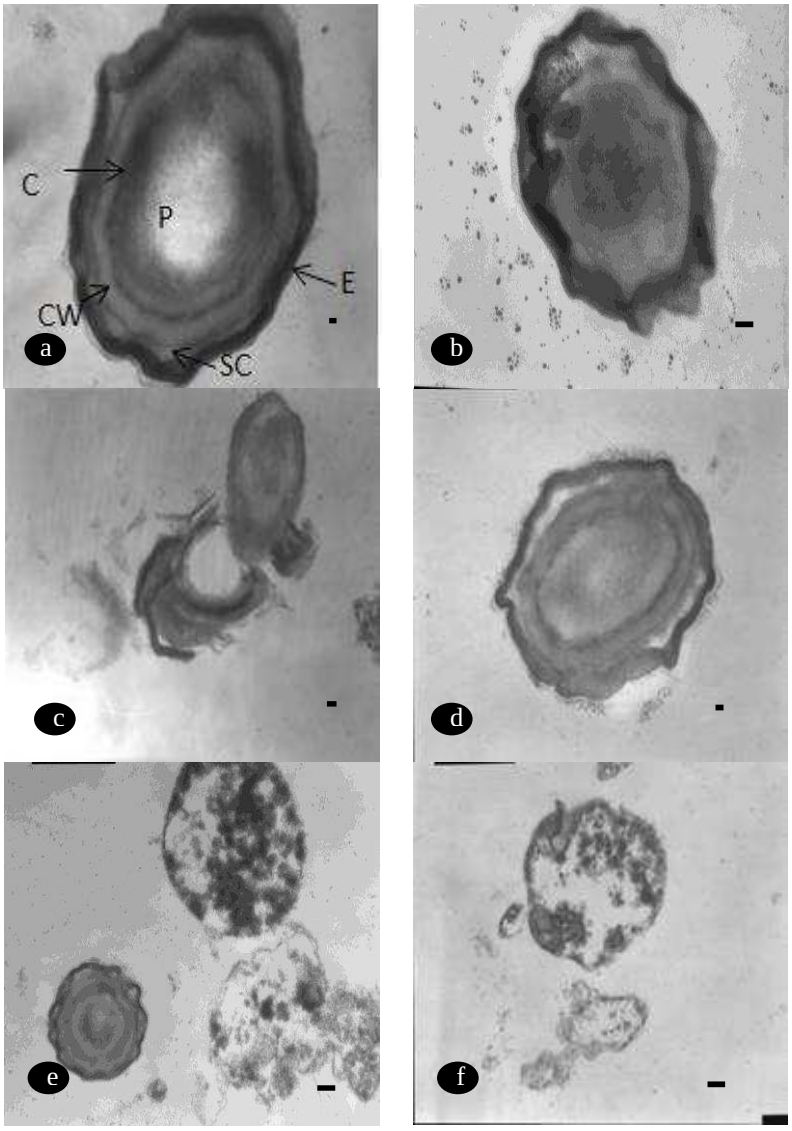


Figura 4.2.13. Imágenes MET de esporas *A. acidoterrestris*. **a,b**: esporas no tratadas; **c-f:** esporas tratadas 60 s LP_e, T_{LPei}: 44 ± 1 ºC) en jugo de manzana comercial. Escala: **d**: 200 nm; **c**: 270 nm; **f**: 350 nm; **a**: 500 nm; **b**: 590 nm; **e**: 600 nm. **a,b**) Aspecto de endoesporas intactas, mostrando protoplasto bien definido (P), núcleo (C), pared del núcleo (CW), cubierta multicapa de la espora (SC) y exosporio (E); **c**) fragmentos subcelulares fuera de la espora; **d**) Separación del exosporio de la capa de la espora; **e,f**) contenido intracelular coagulado y restos de esporas sin contenido intracelular ("esporas fantasma").



Parte III

4.3 Efectividad del tratamiento por luz pulsada en flujo continuo (LP_c)

Habiéndose estudiado la utilización de LP_e en el marco de una estrategia combinada de preservación de jugo de manzana con US y temperatura moderada, se decidió investigar la tecnología de pulsos de luz en flujo continuo para aumentar el volumen de producto procesado, tender a un proceso más industrial identificando los inconvenientes y las fortalezas de la implementación del mismo y, analizar las diferencias de efectividad entre los procesos en los modos estanco y continuo.

El objetivo del presente capítulo reside en la instalación, adaptación, puesta a punto y calibración del equipo de LP en la modalidad de flujo continuo y la evaluación de la efectividad del tratamiento en microorganismos de relevancia en jugo de manzana.

4.3.1 Determinación de la dosis de LP_c

Con el propósito de determinar la dosis emitida por el equipo de LP_c, se aplicaron las **ecuaciones 3.2** a **3.11** siguiendo el procedimiento descripto en **Materiales y Métodos, apartado 3.7.5.2.** Se obtuvo un valor de dosis máxima correspondiente a 0,73 J/cm^2 para 60 s de tratamiento LP, el cual que se corresponde a una dosis en el jugo de 0,018 J/mL a 10 cm de distancia respecto de la lámpara en una ubicación en la cabina correspondiente al punto central y a 10 cm a ambos lados. En la **Tabla 4.3.1** se muestran los valores de dosis correspondientes a los distintos tiempos de exposición a LP_c bajo las condiciones de operación descriptas en la **Tabla 3.1, Materiales y Métodos, apartado 3.7.5.**

Tabla 4.3.1.Valores de dosis correspondientes a los distintos tiempos de exposición a LP_c

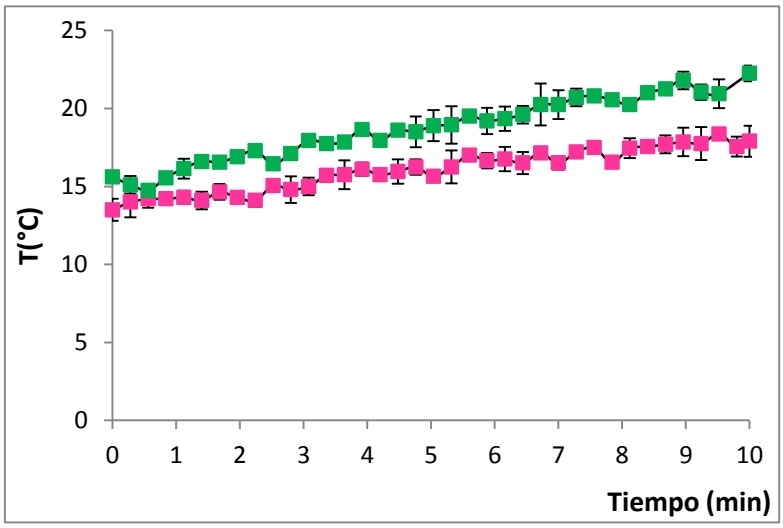
Tiempo (min)	Dosis (J/cm^2)	Dosis (J/mL)
0	0	0
1	0,07	0,0018
2	0,14	0,0035
3	0,24	0,0060
4	0,28	0,0070
5	0,35	0,0088
6	0,42	0,0105
7	0,49	0,0123
8	0,56	0,0140
9	0,63	0,0158
10	0,73	0,0183

4.3.2 Efectividad del tratamiento por LP_c en jugo de manzana

4.3.2.1 *Perfil de temperatura*

La **Figura 4.3.1** muestra la evolución de la temperatura durante el tratamiento con LP_c de las muestras de jugo de manzana comercial y natural. La temperatura de los jugos se incrementó con el tiempo de tratamiento. Pero, gracias al sistema adoptado de refrigeración de los mismos (muestra colocada en baño de hielo y sistema de circulación con refrigerante), la temperatura no superó los 25 ºC en ningún caso. El rango de incremento térmico fue 4,5 - 6,2 ºC, para el jugo natural y comercial, respectivamente.

Figura 4.3.1. Perfil de temperatura durante el tratamiento con LP_c de jugo de manzana comercial (■) y natural (■)



4.3.2.2 Estudios de reto microbiano

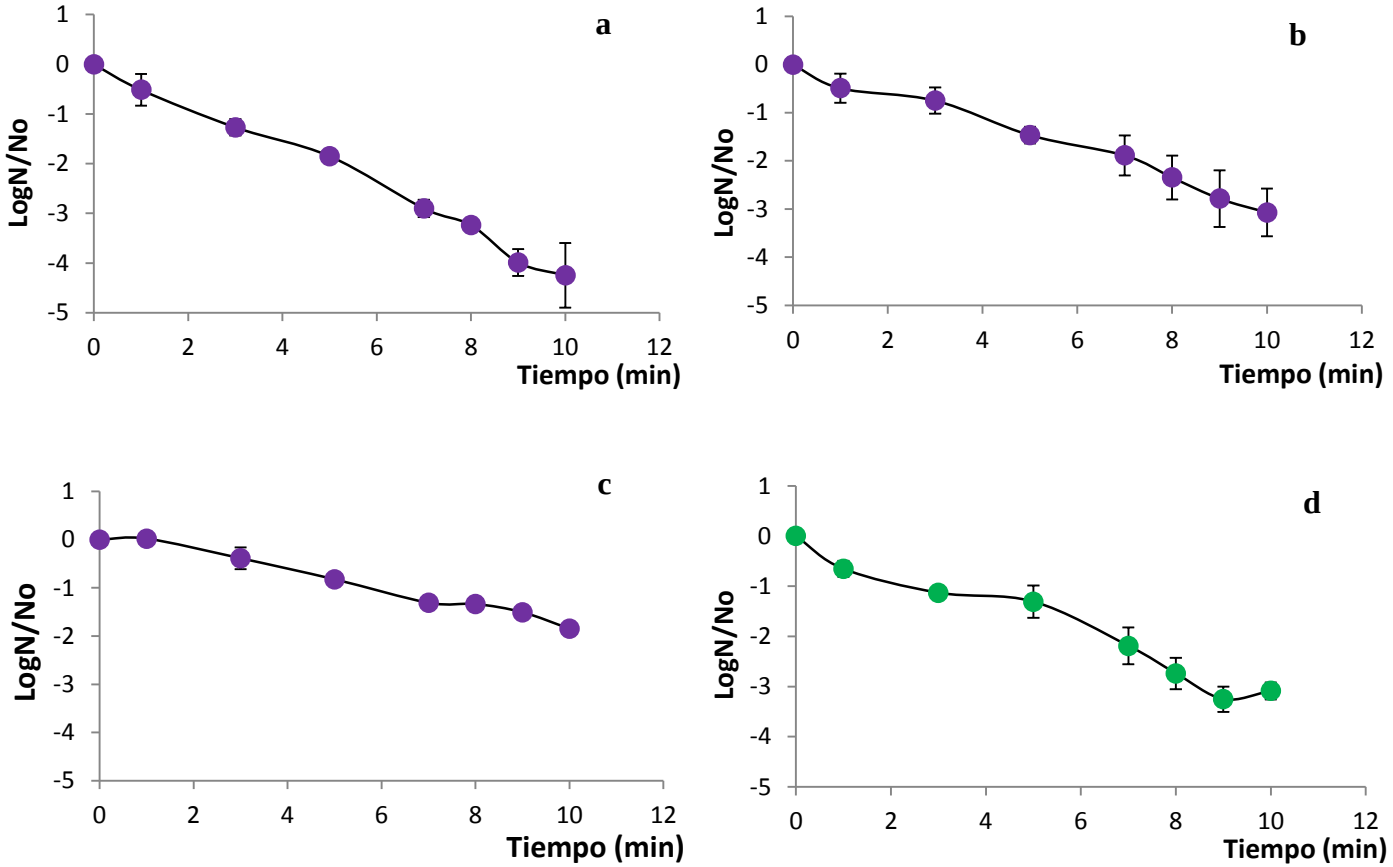
En la **Figura 4.3.2** se muestran las curvas de inactivación de *E. coli* ATCC 35218, *S. cerevisiae* KE162, y *S.* Enteritidis MA44 tratados con LP_c durante 10 min (dosis 0,0183 J/mL), tal como se describió en **Materiales y Métodos, apartado 3.7.5.** Se calculó la figura de mérito E_{EO} correspondiente al tratamiento por LP_c aplicando la **ecuación 3.11b** tal como se describió en **Materiales y Métodos, apartado 3.8,** obteniéndose un valor de $1{,}8.10^3$-$4{,}1.10^3$ kW.h/m^3/orden, siendo este valor notoriamente más bajo que el correspondiente obtenido para LP en modo estanco, denotando así un proceso más eficiente.

En general, las curvas de inactivación resultaron lineales, alcanzando hacia el final del tratamiento 1,8, 3,1 y 4,2 reducciones logarítmicas para *S. cerevisiae*, *E. coli* y *S.* Enteritidis, respectivamente en jugo de manzana comercial (**Figura 4.3.1a,b,c**). En el caso de *E. coli* inoculada en jugo natural, se obtuvieron 3,1 reducciones logarítmicas (**Figura 4.3.1d**).

Pataro y col. (2011) estudiaron la inactivación de *E. coli* y *L. innocua* en jugos de manzana y naranja tratados con LP en sistema continuo (0,19 m de distancia de la lámpara, 0-5,5 J/cm^2). Estos autores observaron que el efecto letal de la LP se incrementaba a medida que aumentaba la energía entregada

al sistema. Las curvas de inactivación presentaron un pequeño hombro inicial seguido de un rápido descenso. También resaltaron la presencia de cola en algunas de las curvas de inactivación y atribuyeron este comportamiento principalmente al "efecto sombra" que se genera debido a una insuficiente penetración de la luz en las profundidades de jugos con baja transmitancia. Se observaron 4,00 y 2,90 ciclos de reducción logarítmicas para *E. coli* y 2,98 y 0,93 ciclos logarítmicos para *L. innocua*, al entregar una dosis correspondiente a 4 J/cm^2. Por otra parte, Muñoz y col. (2012) estudiaron la inactivación de *E. coli* y *L. innocua* tratados con LP en un equipo de flujo continuo (3,3 J/cm^2; 0,19 m distancia de la lámpara) en buffer fosfato y reportaron 3,6 y 2,7 ciclos de reducción logarítmica, respectivamente. Además, Muñoz y col. (2012b) obtuvieron 3,1 y 4,9 reducciones logarítmicas UFC/mL luego del tratamiento con LP (sistema continuo; 4,0 J/cm^2 y 5,1 J/cm^2; 0,19 m distancia de la lámpara) en jugo de manzana.

Figura 4.3.2. Curvas de inactivación en función del tiempo de tratamiento LP_c de esporas *S.* Enteritidis (a), *E. coli* (b) y *S. cerevisiae* (c) en jugo comercial de manzana y de *E. coli* en jugo natural de manzana (d); Desvío estándar (I)



4.3.2.2.1 Modelado matemático de la respuesta microbiana

Con el propósito de analizar cuantitativamente las diferencias obtenidas en las curvas de inactivación entre los diferentes microorganismos y matrices estudiados, se aplicaron los modelos de primer orden y de distribución de frecuencias tipo Weibull detallado en **Materiales y Métodos, apartado 3.12,** que ajustó adecuadamente las curvas de inactivación estudiadas en **Resultados y Discusión, apartado 4.2.3.1**. Adicionalmente, se calculó la dosis de reducción decimal según **Materiales y Métodos, apartado 3.9**.

Para el modelo de primer orden, la **Tabla 4.3.1** muestra los valores de D_{10} y de los parámetros estimados. El parámetro D_{10} reflejó que *S*. Enteritidis MA44 resultó la cepa más sensible al tratamiento por LP_c, seguido por *E. coli* ATCC 35218 y por último *S. cerevisiae* KE162 en jugo de manzana.

La **Figura 4.3.3** muestra el ajuste del modelo de distribución de frecuencias de Weibull a los datos experimentales (**ecuación 3.12 de Materiales y Métodos, sección 3.10**). Los parámetros estimados a partir del modelo weibulliano resultaron significativos, por lo que el ajuste por dicho modelo es apropiado para representar los datos de experimentales. Se obtuvieron valores de R^2_{aj} comprendidos en el rango de 98 % a 99 %, por lo que en dicho rango, la variación en los datos experimentales puede ser explicado por el modelo. Todas las curvas de supervivencia presentaron n ~ 1, en conformidad con el perfil lineal que presentaron las curvas de inactivación. A partir de los parámetros *b* y *n*, se obtuvieron las distribuciones de frecuencia de resistencias (**Figura 4.3.4**) y se calcularon los estadísticos asociados: moda, media, varianza y sesgo, a modo de obtener una mejor explicación del efecto de la LP_c en la inactivación de los microorganismos. En particular, en la **Tabla 4.3.2** se detallan los estadísticos asociados con la distribución de Weibull calculados a partir de las **ecuaciones 3.13** a **3.17 de Materiales y Métodos, sección 3.10.**

Las distribuciones de frecuencias de resistencias correspondientes al tratamiento por LP_c resultaron sesgadas a derecha indicando que la mayor proporción de los microorganismos se inactivó a tiempos cortos y por lo tanto el proceso resultó efectivo (**Figura 4.3.4**) Asimismo las distribuciones resultaron

anchas indicando una importante dispersión en los tiempos de muerte, probablemente debido al mezclado de elementos de volumen durante el proceso (**Figura 4.3.4**). *S*. Enteritidis exhibió la mayor sensibilidad al tratamiento, seguido por *E. coli* y *S. cerevisiae* ya que presentó menores valores de moda, media y varianza (**Tabla 4.3.3**). En el caso de *S. cerevisiae*, se observó que la distribución estaba caracterizada por una ancha cola, indicando la existencia de una amplia proporción de microorganismos resistentes (Peleg y Cole, 1998). Excepcionalmente, *E. coli* inoculado en jugo de manzana natural no presentó moda, pero los valores de media y varianza resultaron similares a los correspondientes a *E. coli* inoculado en el jugo comercial, por lo que no se observaron diferencias en la efectividad del tratamiento según la matriz utilizada. En concordancia con estos resultados, se reportaron numerosos estudios que muestran que el modelo de Weibull ajusta adecuadamente las curvas de inactivación de LP en medio líquido (Uesugui y col., 2007; Sauer y Moraru, 2009), y en matrices sólidas (Bialka y col., 2007; Izquier y Gómez-López, 2011).

Figura 4.3.3. Curvas de inactivación en función de la dosis de LP_c (J/mL) según el modelo de Weibull para *S.* Enteritidis (a), *E. coli* (b) y *S. cerevisiae* (c) en jugo comercial de manzana y de *E. coli* en jugo natural (d) ; valor experimental (símbolo) ; valor predicho (línea); desvío estándar (I)

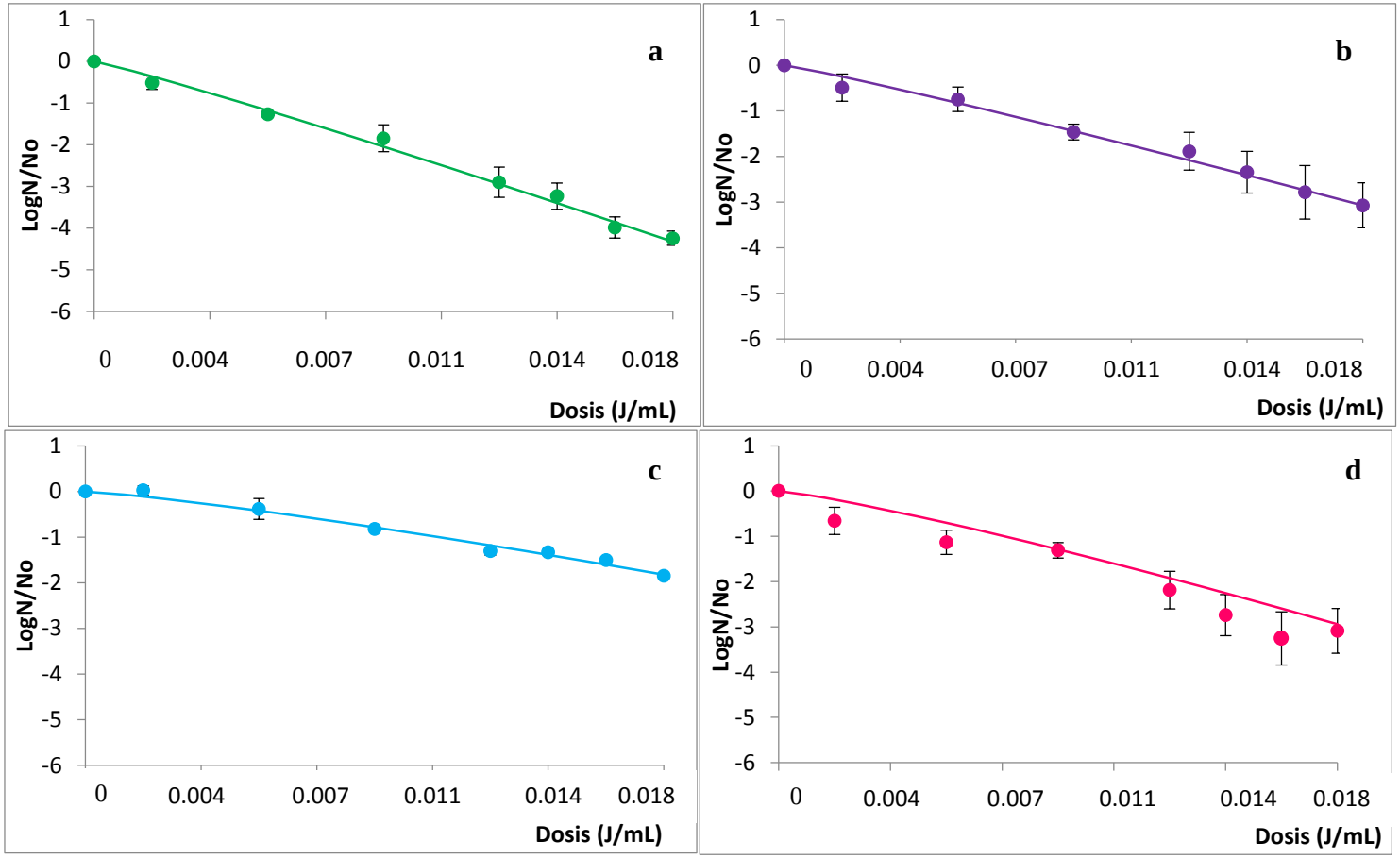


Figura 4.3.4. Distribuciones de frecuencia de resistencias según el modelo de Weibull para *S.* Enteritidis (a), *E. coli* (b), y *S. cerevisiae* (c) en jugo comercial de manzana, y *E. coli* (d) en jugo natural, tratados con LP_c.

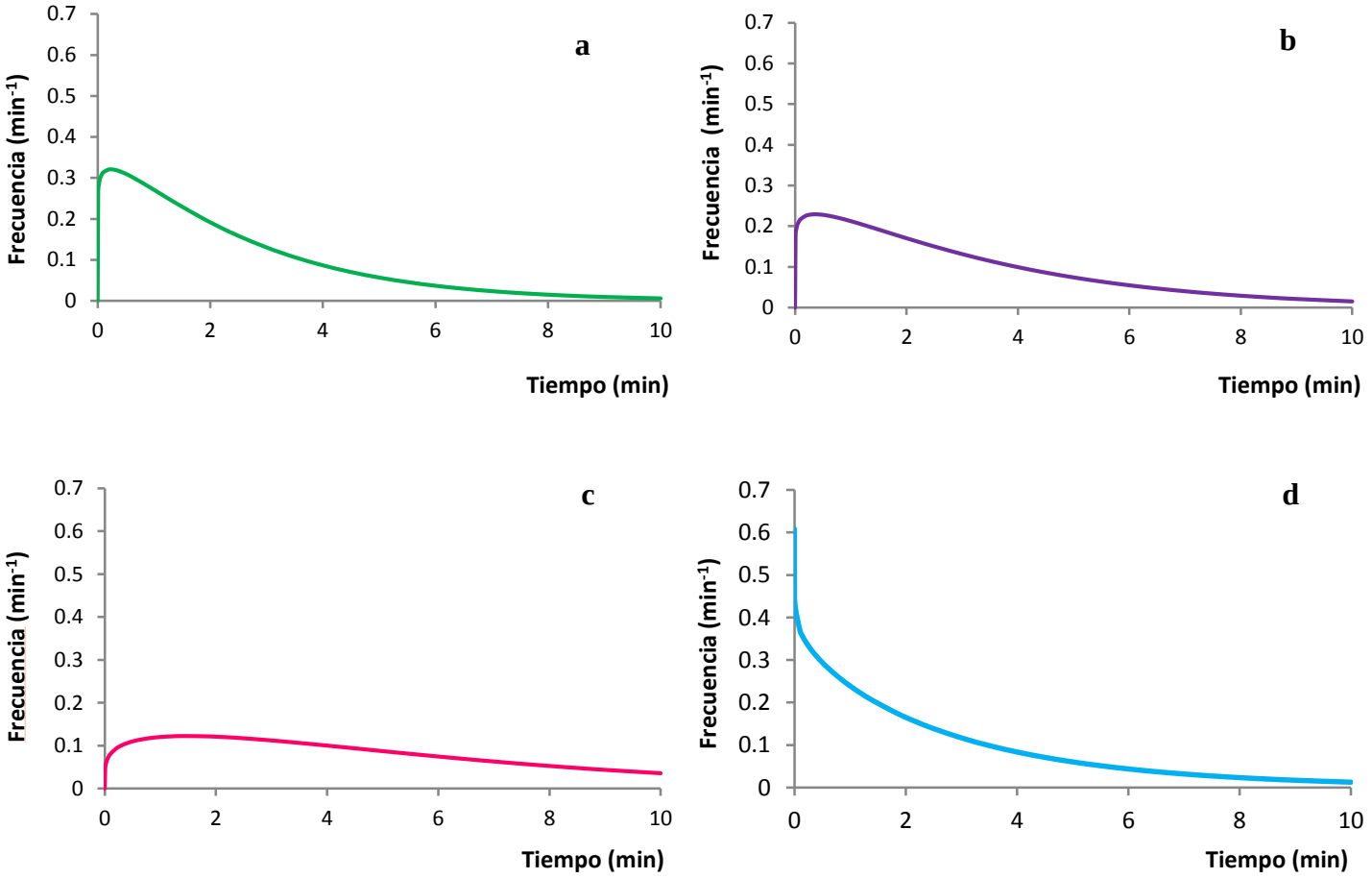


Tabla 4.3.1. Dosis de reducción decimal (D_{10}) y parámetros correspondientes al modelo de Weibull para el comportamiento de *E. coli*, *S. cerevisiae* y *S.* Enteritidis en jugos comercial y natural de manzana tratados con $LP_{c.}$

Jugo de manzana	microorganismo	Modelo de primer orden		Modelo de Weibull		
		D_{10}	R^2_{aj}	b (min^{-n})	n	R^2_{adj}
Comercial	*E. coli* ATCC 35218	$4{,}18^{***}$ (0,23)	0,98	$0{,}27^{**}$ (0,05)	$1{,}05^{***}$ (0,09)	0,98
	S. cerevisiae KE 162	$2{,}84^{***}$ (0,14)	0,99	$0{,}11^{**}$ (0,03)	$1{,}22^{***}$ (0,12)	0,98
	S. Enteritidis MA44	$5{,}97^{***}$ (0,23)	0,99	$0{,}36^{***}$ (0,05)	$1{,}08^{***}$ (0,07)	0,99
Natural	*E. coli* ATCC 35218	$4{,}43^{***}$ (0,37)	0,95	$0{,}49^{**}$ (0,11)	$0{,}81^{***}$ (0,11)	0,95

(valor) error estándar;*** significativo al 0,1%; ** significativo al 1%

Tabla 4.3.2. Estadísticos asociados al modelo de Weibull[a] para la inactivación de *E. coli*, *S. cerevisiae* y *S.* Enteritidis en jugo comercial de manzana y a *E. coli* en jugo natural, tratados 10 min LP_c

Jugo de manzana	Microorganismo	t_{cm} (min)	$\bar{t}_c$ (min)	*Varianza* (min^2)	*Sesgo* (-)
Comercial	*E. coli* ATCC 35218	0,36	3,45	10,05	1,95
	S. cerevisiae KE 162	1,50	5,72	22,20	1,78
	S. Enteritidis MA44	0,23	2,50	5,37	1,97
Natural	*E. coli* ATCC 35218	-	3,00	9,98	2,24

[a] Estadísticos del modelo de Weibull: t_{cm}, moda de la distribución, $\bar{t}_c$ media de la distribución, σ^2 varianza, v_1 coeficiente de sesgo.

Parte IV

4.4 Efectividad del tratamiento de luz pulsada en flujo continuo, LP_c en combinación con US

En la **Parte II** se obtuvieron resultados promisorios en la utilización de LP_e para la preservación de jugo de manzana en el marco de una estrategia combinada con US y temperatura moderada, mientras que en la **Parte III** se ha evaluado satisfactoriamente la efectividad del tratamiento de LP_c. En el presente capítulo se buscará alcanzar un jugo de manzana microbiológicamente estable a partir del procesamiento con LP en modo de flujo continuo combinado con US y temperatura moderada. Se ha decidido utilizar el US en modalidad estanco debido a su baja efectividad en modalidad continuo en las condiciones actuales de operación. Se evalúa en esta sección la efectividad del tratamiento combinado en la inactivación de diversos microorganismos de relevancia y en la flora nativa de jugo de manzana.

4.4.1 Estudios de reto microbiano

A partir de los resultados obtenidos de las **Partes II** y **III**, se seleccionaron las condiciones de procesamiento de 30 min US (T_{US}: 25 ºC) y 10 min LP_c ($T_{LPc\ final}$: 25 ºC) como método de combinación para la preservación del jugo de manzana, por resultar las condiciones más apropiadas en cuanto a la inactivación observada (páginas 254 y 283). En la **Figura 4.4.1** se muestran las curvas de inactivación de *S.* Enteritidis MA 44, *E. coli* ATCC 35218 y *S. cerevisiae* KE 162 en jugo comercial de manzana y *E. coli* en jugo natural tratados por LP_c y pretratados durante 30 min con US (T_{US}: 25 ºC), como se detalló en **Materiales y Métodos, apartado 3.7.2**. Al aplicar el US previo a LP_c, no se hallaron diferencias en la forma de las curvas de inactivación respecto a las obtenidas por LP_c. Se alcanzaron 1,1; 1,4 y 2,0 reducciones logarítmicas para *S. cerevisiae*, *E. coli* y *S.* Enteritidis, respectivamente, al aplicar US sólo en jugo de manzana comercial (**Figura 4.4.1a,b,c**). Por otra parte, LP_c provocó una reducción de 1,8; 3,1 y 4,2

ciclos logarítmicos para dichas cepas (**Figura 4.3.1a,b,c**). Gracias a la combinación utilizada que considera la aplicación de US y LP_c, se alcanzaron 3,7; 5,9 y 6,3 reducciones logarítmicas para *S. cerevisiae*, *E. coli* y *S*. Enteritidis, respectivamente, en jugo de manzana comercial (**Figura 4.4.1a,b,c**). En el caso de *E. coli* en jugo de manzana natural se lograron 2,7 y 3,1 ciclos logarítmicos de reducción luego de la aplicación de US y LP_c, respectivamente; mientras el tratamiento combinado, provocó una reducción de 5,7 ciclos logarítmicos (**Figura 4.4.1d**). Por ende, la aplicación de US+LP_c mostró efecto aditivo, dado que la inactivación obtenida luego de la combinación de las tecnologías, resultó ser la suma de los efectos aplicados de manera separada. Se calculó la figura de mérito E_{EO} correspondiente al tratamiento combinado US+LP_c aplicando las **ecuaciones 3.11a** y **3.11b** para los tratamientos individuales US y LP_c tal como se describió en **Materiales y Métodos, apartado 3.8,** para operaciones en los modos estanco y continuo y luego sumando ambos valores, obteniéndose así valores de E_{EO} de $4{,}4.10^5$- $1{,}1.10^6$ kW.h/m^3/orden, valor más similar al obtenido para el tratamiento individual por US, por ser este proceso el menos eficiente en la entrega de energía eléctrica (Bolton y col., 2001). Desafortunadamente, no existen en bibliografía, a los fines de comparación, valores de EEO correspondientes a tratamientos de preservación de alimentos tradicionales o emergentes que involucren un suministro de energía guiado por energía eléctrica, encontrándose en su mayoría información referida a eliminación de contaminantes en aguas por tratamientos oxidativos con luz UV-C (Bolton y col., 2001; Behnajady y col., 2009; Bagheri, y Mohseni, 2015)

Muñoz y col. (2012a) estudiaron la combinación de LP (42,5 J/mL, 0,019 m distancia respecto a la lámpara) y la consecutiva aplicación de US en sistema continuo (500 W, 20 KHz, 48-50 °C, 100 J/mL) en flujo continuo en la inactivación de *E. coli* y *L. innocua* en medio modelo. Estos autores reportaron que la posterior aplicación de US contribuyó a un incremento en la inactivación provocada por LP sólo para *L. innocua*, donde mostró efecto aditivo. Además, Palgan y col. (2011a) reportaron que combinaciones de LP en flujo continuo (0,019 m distancia respecto a la lámpara, 1,213 J/cm^2/pulso) y manotermosonicación (20 KHz, 750 W, 400

kPa) condujeron a una reducción de 6 ciclos logarítmicos de *E. coli* y *P. fermentans* en jugo mezcla de manzana y arándano. En este caso, los autores no pudieron detectar si los efectos eran aditivos o sinérgicos dado que obtuvieron muy bajo recuento luego de la aplicación de los tratamientos combinados. Por otra parte, Muñoz y col. (2011 y 2012b) estudiaron la combinación de LP en flujo continuo (0,019 m distancia respecto de la lámpara, 35 °C, 4,03-5,10 J/cm^2) y termosonicación en sistema continuo (TS, 24 KHz, 400 W, 14 mL/min, 40 °C o 8 mL/min, 53 °C) en la inactivación de *E. coli* en jugos de naranja y manzana en un dispositivo continuo. De acuerdo con los resultados aquí descriptos, estos autores encontraron que los tratamientos combinados, mostraron un efecto aditivo, alcanzándose ~5,0 reducciones logarítmicas en jugo de manzana y ~3,2 ciclos logarítmicos en jugo de naranja cuando la TS se aplicó como primer obstáculo.

A partir de los valores de los parámetros *b* y *n*, se graficaron las distribuciones de frecuencias de resistencias que se detallan en la **Figura 4.4.2**, y se calcularon los parámetros asociados a la distribución (**Tabla 4.4.1**). A diferencia de lo observado luego de la aplicación de LP_c sólo, donde la mayoría de las distribuciones presentaron gran dispersión con altos valores de media y con moda (**Figura 4.3.3; Tabla 4.3.2**), las distribuciones correspondientes a US+LP_c resultaron sesgadas a derecha, marcando una importante efectividad del proceso (**Figura 4.4.2a,b,d**). Este resultado sugiere que para cada microorganismo evaluado, la mayoría de la población fue inactivada al comienzo del tratamiento, dejando una fracción de microorganismos resistentes que fue afectada en menor medida. En el caso de *S*. Enteritidis y *E. coli* en jugo comercial, las distribuciones carecieron de moda (**Figura 4.4.2a,b; Tabla 4.4.2**). Solamente se obtuvo una importante cola y altos valores de varianza en los tiempos de muerte en el caso de *S. cerevisiae* tratada con US+LP_c (**Figura 4.4.2c**), lo que indica su mayor resistencia al tratamiento respecto a las demás cepas. En jugo comercial de manzana, respecto al parámetro D_{10}, *E. coli* y *S. cerevisiae* mostraron mayor D_{10} al aplicar US+LP_c en comparación con LP_c, lo que sugiere una mayor sensibilidad de estos microorganismos al tratamiento combinado.

Figura 4.4.1. Curvas de inactivación en función de la dosis de LP_c (J/mL) según el modelo de Weibull para *S.* Enteritidis (a), *E. coli* (b) y *S. cerevisiae* (c) en jugo comercial de manzana y de *E. coli* en jugo natural de manzana (d) tratados con LP_c (---) y LP_c pretratado con US (▬);) ; valor experimental (símbolo) ; valor predicho (línea); desvío estándar (I)

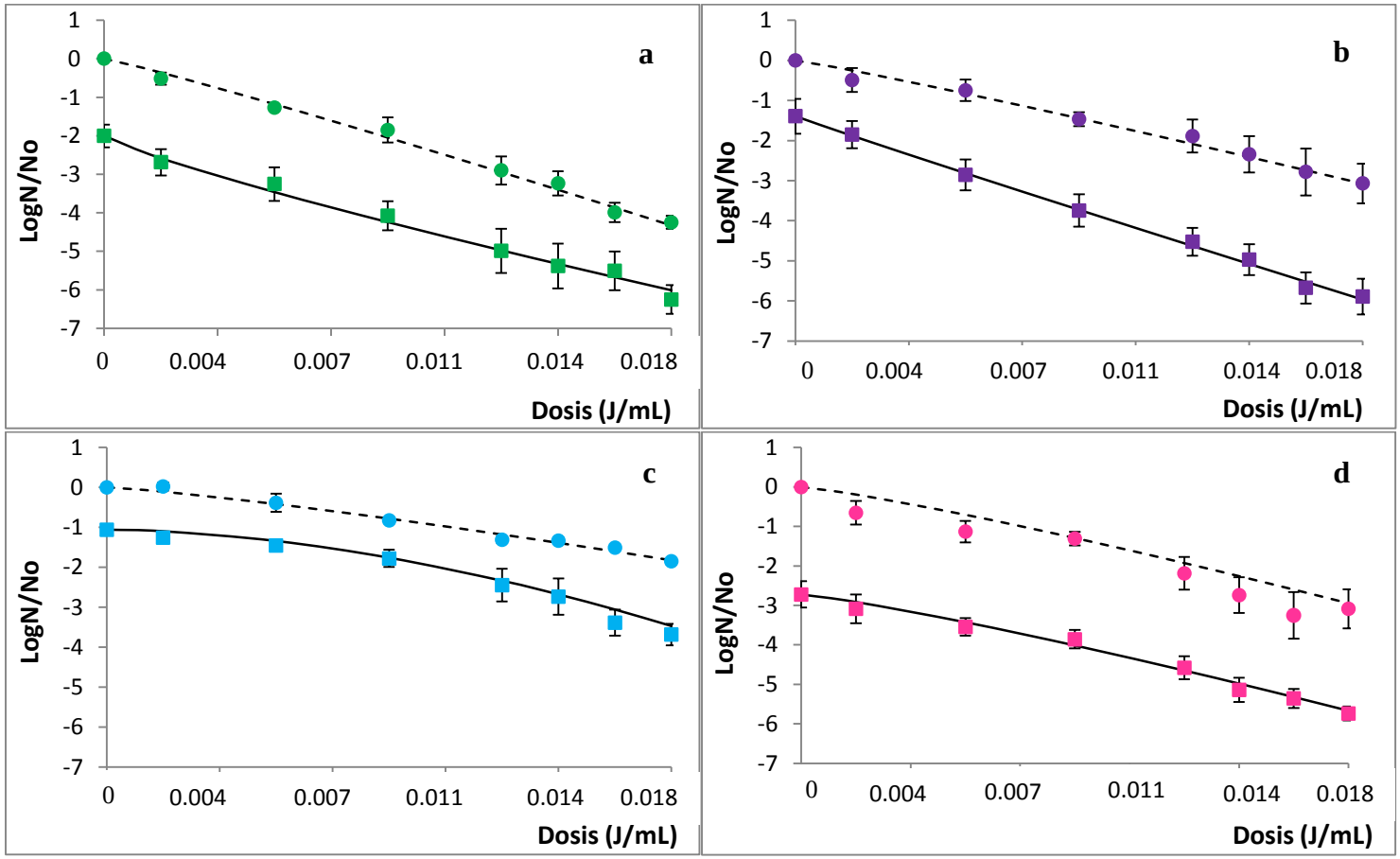


Figura 4.4.2. Distribuciones de frecuencia de resistencias correspondientes a las curvas de inactivación de *S.* Enteritidis (a), *E. coli* (b), y *S. cerevisiae* (c) en jugo comercial de manzana, y a *E. coli* (d) en jugo natural tratadas con US+LP_c.

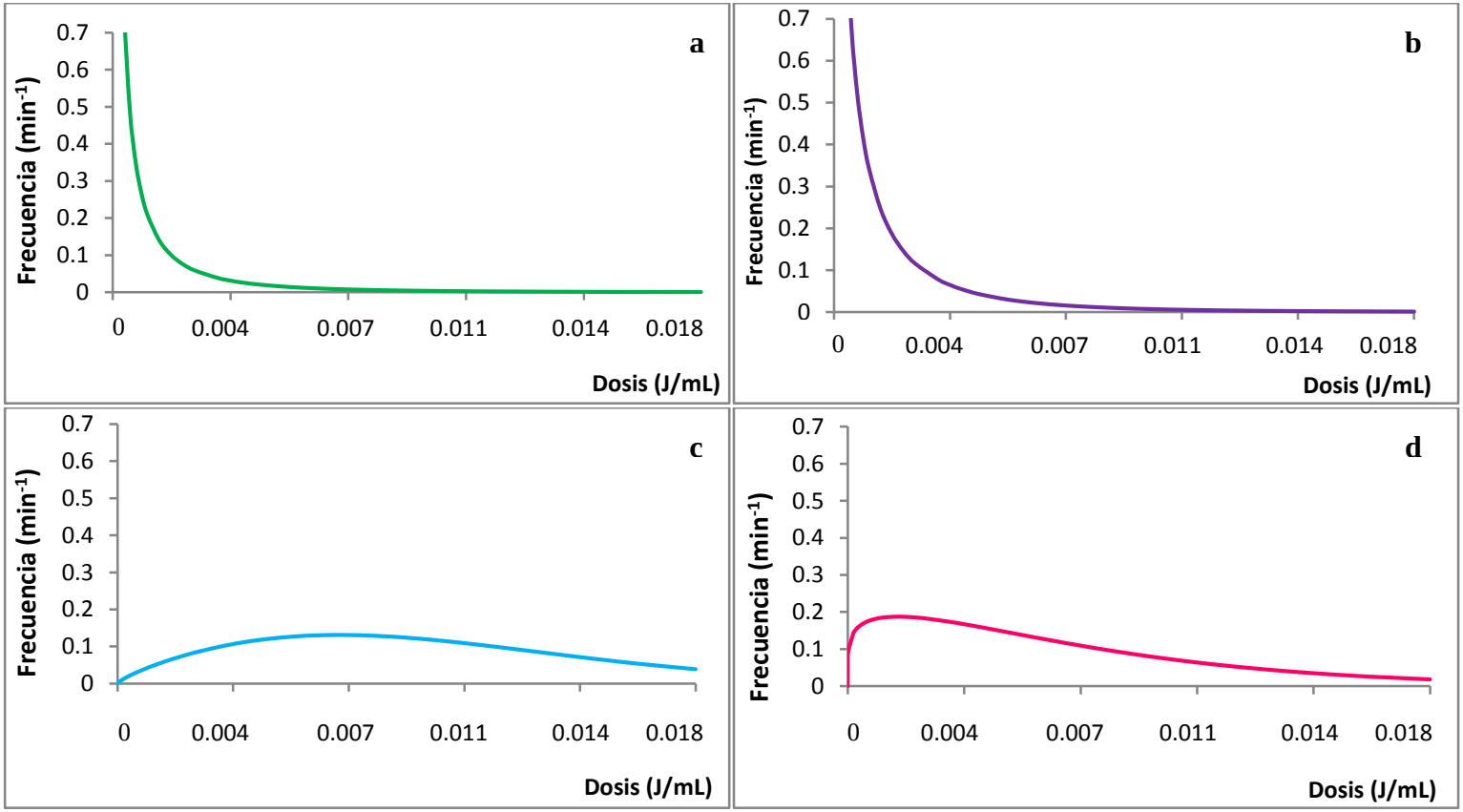


Tabla 4.4.1 Dosis de reducción decimal (D_{10}) y parámetros correspondientes al modelo weibulliano de distribución de resistencias para el comportamiento de *E. coli*, *S. cerevisiae* y *S.* Enteritidis en jugos comercial y natural de manzana tratados con US+$LP_{c.}$

Sistema	Microorganismo	Modelo de primer orden		Modelo de Weibull		
		D_{10}	R^2_{aj}	b (min^{-n})	n	R^2_{adj}
Comercial	*E. coli* ATCC 35218	6,40*** (0,19)	0,99	0,49*** (0,04)	0,97*** (0,04)	0,99
	S. cerevisiae KE 162	3,63*** (0,37)	0,93	0,04** (0,01)	1,78*** (0,14)	0,98
	S. Enteritidis MA 44	5,67*** (0,22)	0,99	0,58*** (0,09)	0,84*** (0,07)	0,99
Natural	*E. coli* ATCC 35218	4,17*** (0,22)	0,99	0,19*** (0,04)	1,19*** (0,10)	0,99

(valor) error estándar de cada parámetro; *** significativo al 0,1%; ** significativo al 1%

Tabla 4.4.2. Estadísticos asociados al modelo de Weibull[a] correspondientes a las curvas de inactivación de *E. coli*, *S. cerevisiae* y *S.* Enteritidis en jugo comercial de manzana y a *E. coli* en jugo natural, tratados US+$LP_{c.}$

Jugo de manzana	Microorganismo	t_{cm} (min)	$\bar{t}_c$ (min)	*varianza* (min^2)	*sesgo* (-)
Comercial	*E. coli* ATCC 35218	-	2,11	4,75	2,19
	S. cerevisiae KE 162	3,84	5,42	9,93	1,40
	S. Enteritidis MA 44	-	2,10	6,29	2,58
Natural	*E. coli* ATCC 35218	0,86	3,80	10,30	1,81

[a] Estadísticos del modelo de Weibull, t_{cm}, moda de la distribución, $\bar{t}_c$ media de la distribución, σ^2 varianza, v_1 coeficiente de sesgo.

4.4.1.1 *Comparación de la inactivación microbiana por LP_e, LP_c y US+LP_c*

En la **Figura 4.3.1** (**Resultados y Discusión**, **Parte III, apartado 4.3.3**) se ilustraron las curvas de inactivación de *S.* Enteritidis MA44, *E. coli* ATCC35218 y *S. cerevisiae* KE162 inoculados en jugo de manzana tratado con LP_c a una dosis máxima de 0,73 J/cm^2 (0,0175 J/mL) que resultaron lineales, y alcanzándose 4,2; 3,1 y 1,8 ciclos de reducción logarítmicos. Asimismo, las curvas de inactivación de estos tres microorganismos procesados por el método combinado propuesto US+LP_c también resultaron lineales (**Figura 4.4.1**). En cambio, las curvas de inactivación de estos mismos microorganismos inoculados en jugo de manzana y tratados con LP_e (dosis máxima 71,6 J/cm^2) presentaron una importante reducción durante los primeros 10 s de tratamiento seguidos de un segundo período de menor reducción. Las diferencias observadas en la forma de las curvas pueden atribuirse a la menor fluencia alcanzada en el procesamiento continuo (**Resultados y Discusión, Figura 4.1.5, Parte I, apartado 4.2.3**).

Sin embargo, es importante destacar que el tratamiento por LP_c fue más efectivo en la inactivación de estos microorganismos que LP_e en jugo de manzana, dado que se alcanzaron 1,8-4,2 reducciones logarítmicas al utilizar la dosis máxima de 0,73 J/cm^2 de LP_c mientras que, se obtuvieron 0,4-1,7 reducciones logarítmicas luego de la exposición a la dosis más baja de LP_e analizada (2,4 J/cm^2) (**Figura 4.1.5, Parte I, apartado 4.2.3**).

En la **Figura 4.4.4,** ilustra las E_{EO} correspondientes a LP_e, LP_c y US+LP_c calculadas a partir de la **ecuación 3.11a y 3.11b** como se describió en **Materiales y Métodos, apartado 3.8**. Como puede apreciarse y se ha comentado, la figura de mérito E_{EO} obtenida para LP_e resultó 4x10^3-9x10^3 veces mayor a la calculada para LP_c por lo que el tratamiento continuo resulta más conveniente económicamente dado que requiere menor consumo energético.

Por otra parte, se graficaron las distribuciones de frecuencias de resistencias calculadas a partir de las **ecuaciones 3.13 a 3.17** de **Materiales y Métodos, sección 3.11** correspondientes a la inactivación de *E. coli*, *S. cerevisiae* y *S.* Enteritidis por LP_e, LP_c y US+LP_c en jugo de manzana comercial con el propósito de comparar la efectividad de los tres tratamientos (**Figura 4.4.3**).

Figura 4.4.3. Distribuciones de frecuencia de resistencias según el modelo de Weibull para *S.* Enteritidis (—), *E. coli* (—) y *S. cerevisiae* (—) en jugo comercial de manzana tratados con LP_e (**a**), LP_c (**—**) y US+LP_c (- - -) (**b**,**c**,**d**).

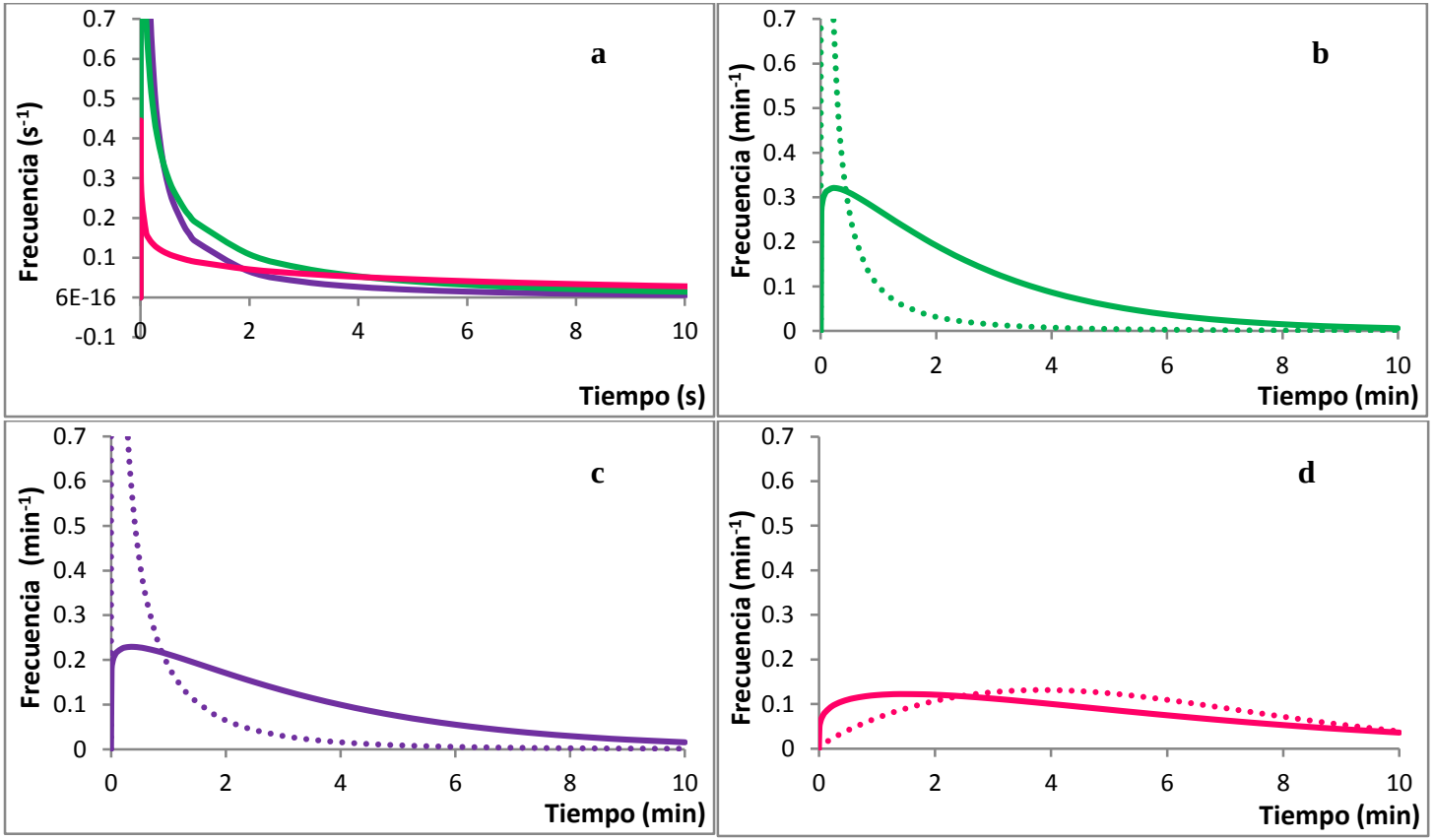
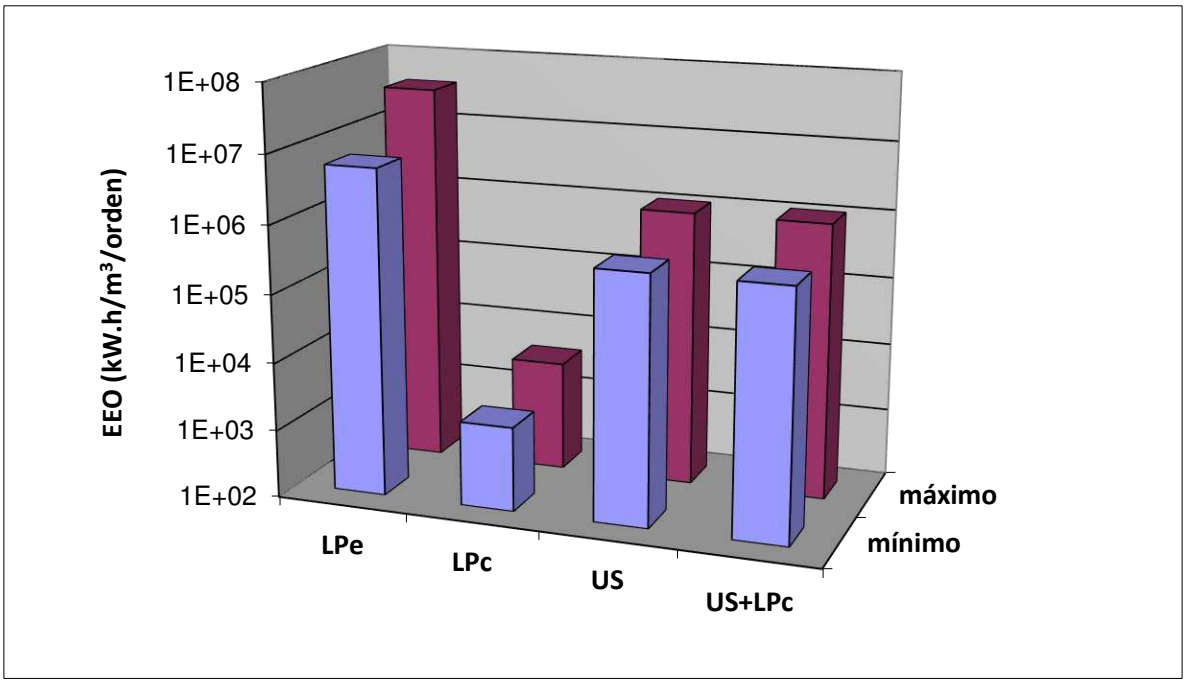


Figura 4.4.4. Energía eléctrica por orden (E_{EO}) mínima y máxima estimada para los procesos de LP_e, LP_c y $US+LP_c$ para jugo de manzana.



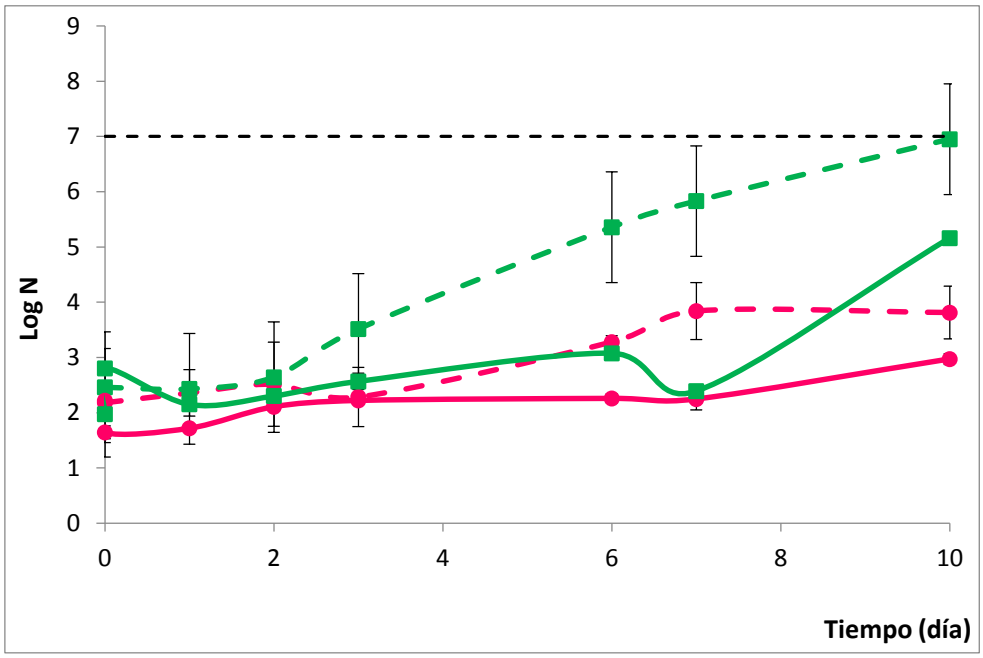
Las distribuciones correspondientes a LP_e carecieron de moda y resultaron fuertemente sesgadas a derecho; por lo que todas las cepas resultaron sensibles a bajas dosis de LP_e (**Figura 4.4.3a**). Por otra parte, las distribuciones correspondientes a LP_c, resultaron achatadas, con cola, altos valores de media y varianza, indicando que una importante fracción de microorganismos sobrevivió luego del tratamiento (**Figura 4.4.3b,c,d**). Por último, las distribuciones de frecuencia correspondientes a $US+LP_c$ carecieron de moda y fueron sesgadas a derecho, sugiriendo que la mayoría de los microorganismos fue inactivado a cortos tiempos (**Figura 4.4.3b,c,d**).

4.4.2 Dinámica de crecimiento de la flora nativa sobreviviente durante el almacenamiento refrigerado de jugo de manzana natural tratado con US+LP$_e$

En la **Figura 4.4.5** se muestra la evolución de la flora nativa (microoganismos mesófilos aerobios y hongos y levaduras) durante el almacenamiento refrigerado del jugo de manzana exprimido tratado o no (control) con US+LP$_c$. El recuento de microorganismos mesófilos aerobios y de hongos y levaduras no tratados fue de 2,8 y 2 ciclos logarítmicos, respectivamente; mientras que luego del tratamiento se obtuvieron 1,7 y 1,9 ciclos logarítmicos. Por lo tanto el tratamiento US+LP$_c$ no logró reducir la flora nativa inmediatamente luego del tratamiento; sin embargo, previno de su recuperación por 6 días. Mientras que, el recuento de hongos y levaduras control se incrementó más de dos ciclos logarítmicos para dicho día. Además, no se excedió el límite del recuento para mesófilos aerobios recomendado (Agencia de Protección de la Salud de Inglaterra, 2009) luego de 10 días de almacenamiento refrigerado. En contraposición, la exposición a LP$_e$ (71,6 J/cm^2) del jugo de manzana, si bien también redujo escasamente la población de microorganismos mesófilos aerobios y hongos y levaduras luego del tratamiento, no se hallaron diferencias entre las poblaciones control y tratadas a lo largo del almacenamiento refrigerado (**Figura 4.1.12**). Por lo que, el retraso observado en la recuperación de los hongos y levaduras puede atribuirse a la aplicación previa de US, la cual mejora la efectividad de LP.

Palgan y col. (2011b) estudiaron la vida útil en refrigeración de un jugo mezcla de manzana y arándano tratados con LP en flujo continuo (360 μs, 3 Hz, 1,213 J/cm^2/pulso) en combinación con campos eléctricos pulsados (34 kV/cm, 18 Hz, 93 μs). Estos autores no detectaron colonias luego de la exposición a LP, mas observaron un incremento de 2 ciclos logarítmicos luego de 14 días de almacenamiento a 4 °C.

Figura 4.4.5. Evolución de la flora nativa en jugo manzana natural almacenado a 5 ± 1 ℃. Control (línea punteada) y tratados con US+LP_c (línea sólida). Mesófilos aerobios (■); hongos y levaduras (●); desvío estándar (I). La línea de guiones indica el límite de recuento de mesófilos aerobios recomendado por la Agencia de Protección de la Salud (2009, Reino Unido) para jugos frutales.



Parte V

4.5 Efectividad del tratamiento de luz pulsada en flujo continuo, LP_c en combinación con US- Estudios de calidad sensorial

Dados los resultados promisorios obtenidos en la **Parte IV** respecto de la preservación de jugo de manzana por la aplicación de LP_c con pretratamiento de US, en el presente capítulo se evaluarán los aspectos sensoriales y de color y la vida útil sensorial sobre el producto de jugo procesado por la combinación de tratamientos.

4.5.1 Evolución del color en el almacenamiento refrigerado

Con el objeto de determinar el efecto de los tratamientos de preservación sobre los jugos comerciales y naturales de manzana y los cambios deteriorativos que pudieran ocurrir durante el almacenamiento, se estudió la evolución de los parámetros de color L*, a*, b*, BI/BI_o, C^*_{ab}, h_{ab} y opacidad de los jugos control, y tratados por LP_c y $US+LP_c$, como se describió en **Materiales y Métodos, apartado 1.12**. En la **Figura 4.5.1** y en la **Tabla 4.5.1** se muestra la evolución del promedio de los parámetros L*, a*, b*, BI/BI_o, C^*_{ab} y h_{ab} del jugo comercial y natural de manzana control y procesado por LP_c ($T_{LPc\ final}$: 25 ºC) y $US+LP_c$ (T_{US} y $T_{LPc\ final}$: 25 ºC) durante el almacenamiento a 4 ± 1 ºC. En general, las muestras control y procesadas por LP_c exhibieron mayor L* que las correspondientes al tratamiento combinado. Además, las muestras control mostraron mayor a* y menor b* que las tratadas. Todas las muestras mostraron bajos valores de C^*_{ab} (menores a 14 %), indicando tonalidades grisáceas, mientras que el parámetro h_{ab}, indicó que las muestras presentaron tonalidades amarillo-verde. En las muestras control y las LP_c de jugo comercial, se observó un incremento de L* (mayor luminosidad) y una disminución de a* (muestras más verdosas) a lo largo del almacenamiento.

Figura 4.5.1 Evolución de las funciones del color en jugo de manzana con diferentes tratamientos durante 12 días de almacenamiento a 4 ℃. Control (●), LP_c (●) y $US+LP_c$ (●). a) Jugo comercial b) Jugo natural. i) Luminosidad, L^*_{ab}; ii) Función a*; iii) función b*; iv) BI/BI_o v) C^*_{ab}; h_{ab}; desvío estándar (I).

a

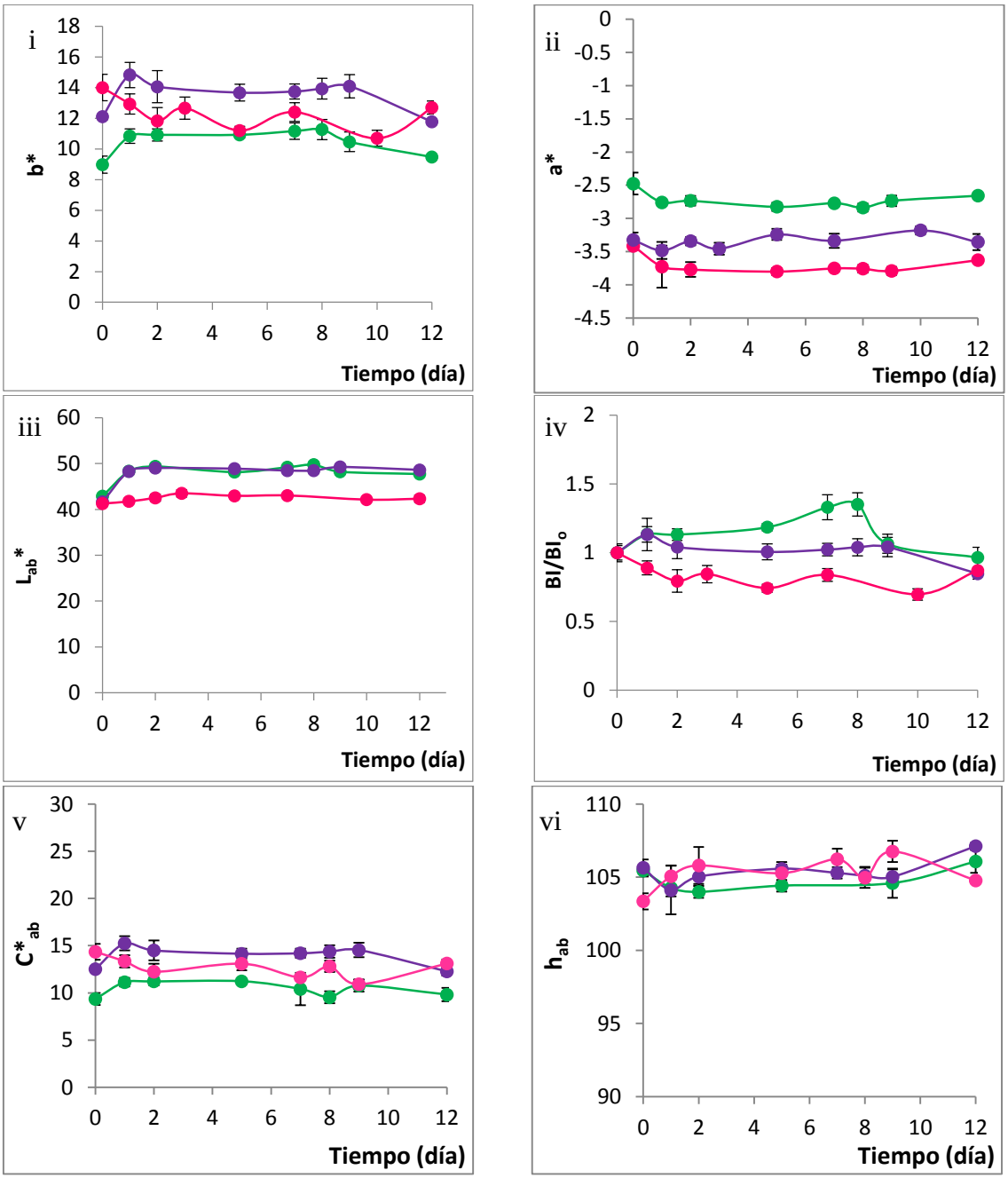


Figura 4.5.1. ***Continuación…***

b

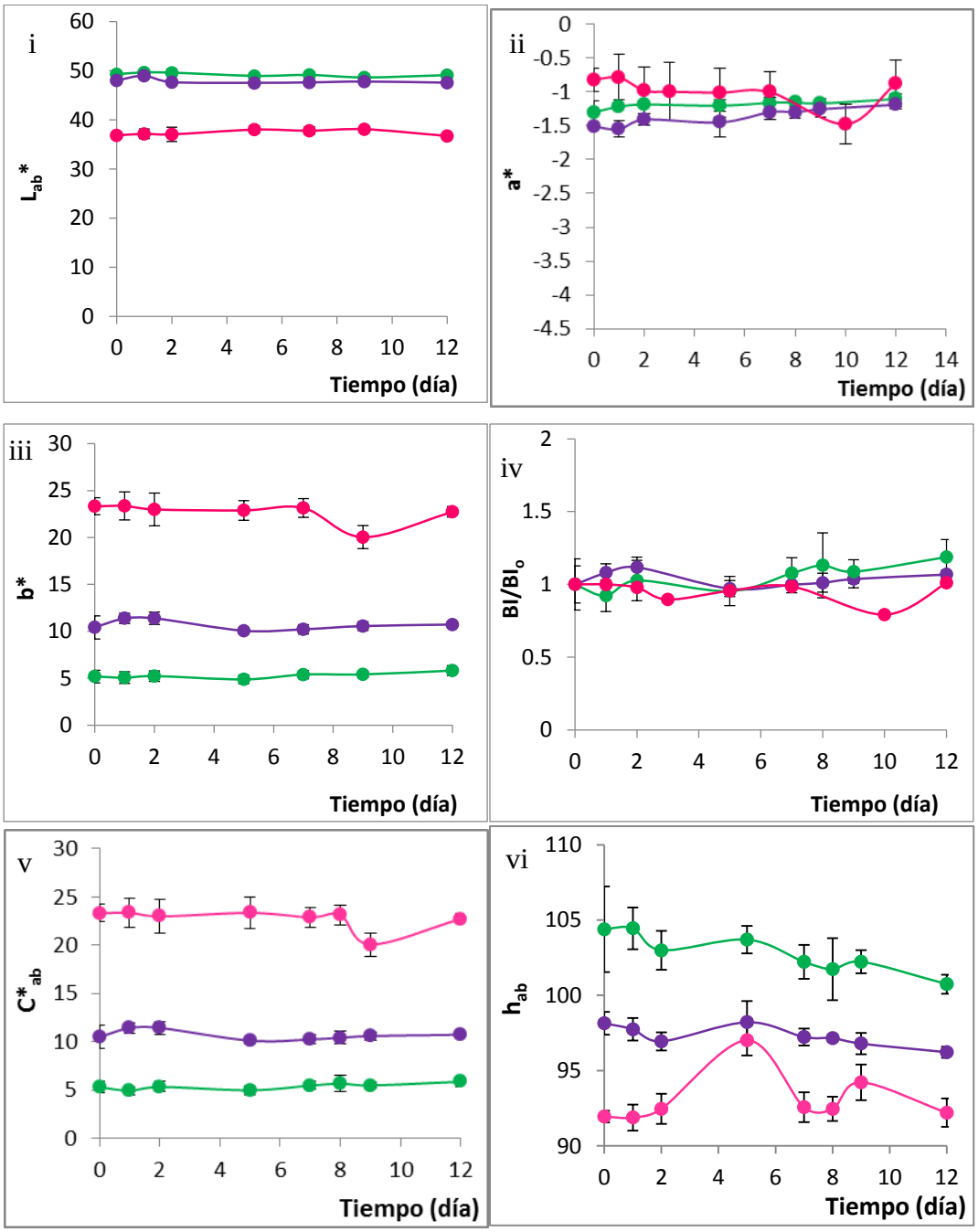


Tabla 4.5.1. Valores promedio y desvío estándar (±) de los parámetros L*, a*, b* y la función BI/BI_o correspondientes a diferentes procesamientos del jugo de manzana comercial (a) y natural (b) a lo largo del almacenamiento refrigerado.

a)

Tratamiento	*Tiempo (día)*	*L**	*a**	*b**	*BI/BI$_o$*	*ds*[1]
Control	0	42,8±0,6	-2,4±0,2	8,9±0,6	1,0±0,1	b
	2	49,4±0,7	-2,7±0,1	10,9±0,4	1,1±0,0	ce
	5	48,3±0,2	-2,8±0,1	10,9±0,5	1,1±0,0	cd
	7	49,2±0,4	-2,8±0,0	11,2±0,7	1,3±0,1	e
	12	47,7±0,3	-2,7±0,2	9,8±0,7	1,0±0,4	d
LP$_c$	0	41,7±0,4	-3,4±0,1	12,1±0,2	1,0±0,0	a
	2	49,0±0,4	-3,8±0,1	14,1±1,0	1,0±0,1	h
	5	48,9±0,7	-3,8±0,1	13,7±0,5	1,0±0,1	fh
	7	48,5±0,3	-3,8±0,1	13,7±0,5	1,0±0,0	h
	12	48,6±0,8	-3,6±0,1	11,8±0,4	0,9±0,0	f
US+LP$_c$	0	41,3±0,2	-3,3±0,1	14,0±0,9	1,0±0,1	g
	2	42,5±0,8	-3,3±0,1	11,8±0,9	0,8±0,1	i
	5	43,0±0,8	-3,2±0,1	11,2±0,7	0,7±0,1	i
	7	43,0±0,2	-3,3±0,1	12,4±0,3	0,8±0,0	l
	12	42,3±0,8	-3,4±0,1	12,7±0,4	0,9±0,0	gi

b)

Tratamiento	*Tiempo (día)*	*L**	*a**	*b**	*BI/BI$_o$*	*ds*[1]
Control	0	49,3±0,4	-1,3±0,2	5,19±0,7	1,00±0,2	fg
	2	49,6±0,2	-1,2±0,0	5,23±0,6	1,03±0,1	fg
	5	49,0±0,3	-1,2±0,1	4,88±0,5	0,95±0,1	fg
	7	49,1±0,6	-1,2±0,1	5,39±0,4	1,08±0,1	fg
	12	49,1±0,3	-1,1±0,1	5,81±0,5	1,19±0,1	f
LP$_c$	0	48,0±0,1	-1,5±0,1	10,43±1,2	1,00±0,1	de
	2	47,7±0,2	-1,4±0,1	11,40±0,7	1,12±0,1	d
	5	47,5±0,3	-1,5±0,2	10,06±0,3	0,97±0,1	e
	7	47,6±0,3	-1,3±0,1	10,21±0,5	1,00±0,1	e
	12	47,6±0,3	-1,2±0,1	10,72±0,3	1,07±0,0	de
US+LP$_c$	0	36,9±0,6	-0,8±0,1	23,33±0,9	1,00±0,0	bc
	2	37,1±1,5	-1,0±0,1	23,00±1,7	0,98±0,1	bc
	5	38,0±0,7	-1,0±0,1	22,90±1,0	0,96±0,1	c
	7	37,8±0,8	-1,0±0,1	23,15±1,0	0,99±0,1	c
	12	36,7±0,5	-1.0±0,1	22,73±0,6	1,01±0,2	b

[1] Letras diferentes indican diferencias significativas (ds) entre las muestras según el test de Hotelling corregido por Bonferroni.

En el caso del jugo de manzana natural, las muestras control exhibieron mayor L*, seguidas por las tratadas por LP_c y US+LP_c. Por otro lado, las muestras procesadas por LP_c presentaron los menores valores de a*, seguidas por las muestras control y las sometidas a US+LP_c (**Tabla 4.5.1b**). Las muestras correspondientes al tratamiento combinado presentaron el mayor valor de b*, seguidas por las muestras control y las tratadas por LP_c (**Tabla 4.5.1b**). En cuanto a los parámetros de C^*_{ab}, las muestras correspondientes al tratamiento combinado resultaron más saturadas o con colores más vívidos, que las muestras tratadas por LP_c y control; mientras que en lo referente a h_{ab}, las muestras procesadas por el tratamiento combinado resultaron más amarillas que las restantes. Es importante destacar, que las muestras sometidas a US+LP_c mostraron el menor valor de BI/BI_o a lo largo del almacenamiento en el jugo de manzana comercial y natural, lo que indica que el tratamiento combinado previno del pardeamiento de las muestras en el tiempo.

En la **Tabla 4.5.2** se ilustra un MANOVA de dos factores aplicado a los parámetros de color. El análisis encontró que la interacción tiempo*tratamiento resultó significativa para ambos sistemas ($p<0,001$), lo cual indica que la evolución del color del jugo dependió del tratamiento aplicado.

Tabla 4.5.2. Cuadro de MANOVA para los parámetros de color de los jugos de manzana comercial (a) y natural (b) control y procesados mediante LP_c y US+LP_c a lo largo del almacenamiento refrigerado.

a)

Fuente	Estadístico de Wilks	F
Día	0,02	21,24***
Tratamiento	0,0008	355,35***
Día*tratamiento	0,02	8,67***

b)

Fuente	Estadístico de Wilks	F
Día	0,55	1,70**
Tratamiento	0,0004	624,23***
Día*tratamiento	0,23	2,30***

*** significativo al 0,1 %; ** significativo al 1 %; * significativo al 5 %

Muñoz y col. (2012b) examinaron los cambios en los parámetros L*, a*, b* de jugo de manzana (pH: 3,6; 12 °Brix) tratados con (4-14 mL/min; 24 kHz, 40-50 °C) y LP en flujo continuo (13,4-17 mL/min; 4,0-5,1 J/cm^2). Estos autores reportaron que el tratamiento combinado disminuyó los valores de L*, a* y b* de las muestras respecto al control.

Por otra parte, Palgan y col. (2011b) no detectaron diferencias en el índice de browning ni en los parámetros L*, a*, b* de jugo de manzana (pH: 3,7; 11,8 °Brix) entre las muestras control y tratadas con LP estanco (0-28 J/cm^2).

El pardeamiento enzimático es provocado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) quien cataliza la oxidación de los compuestos fenólicos en quinonas, que sufren posteriores reacciones hasta convertirse en compuestos oscuros llamados melaninas. Oms-Oliú y col. (2010) reportaron que la exposición a dosis inferiores a 12 J/cm^2 previno del pardeamiento de hongos tratados respecto a los sin tratar, y estos autores sugirieron que la LP tendría un efecto inhibitorio sobre la PPO. Asimismo, el US (75-373 W/cm^2, 2-10 min) ha demostrado inactivar la PPO en jugo de melón (Vidal Fonteles y col., 2012). Estos autores demostraron que se produjo una mayor reducción de la actividad residual de la PPO al aumentar la intensidad del US, y reportaron que 373 W/cm^2 durante 10 min fue el tratamiento más efectivo en reducir la actividad de esta enzima (en el presente trabajo se aplicó una intensidad de 452 W/cm^2 durante 30 min). Por lo tanto, la combinación de US y LP$_c$ podrían haber contribuido en la inactivación de la PPO y por lo tanto prevenir del oscurecimiento de las muestras de jugo de manzana a lo largo del almacenamiento refrigerado.

Se realizó un PCA a modo de analizar las relaciones espaciales entre los parámetros L*, a*, b*, BI/BI$_o$ y opacidad de cada sistema y de ambas matrices. La tabla resultante y el gráfico bidimensional se ilustran en la **Tabla 4.5.3** y la **Figura 4.5.2,** respectivamente. EL *CCC* obtenido fue 0,96, indicando que se alcanzó una reducción adecuada con el análisis. El PCA mostró que las muestras almacenadas a distintos tiempos y sometidas al mismo tratamiento estuvieron agrupadas, por lo que el tipo de procesamiento tuvo mayor peso en la diferenciación de las muestras que el tiempo de almacenamiento. En particular, las muestras control para ambos jugos presentaron el mayor valor de L* (mayor luminosidad) y menor b* (muestras más azuladas), seguidas por las

muestras tratadas con LP_c y $US+LP_c$. Las muestras de jugo natural procesadas mediante el tratamiento combinado presentaron mayor opacidad y valor de b* que las restantes. Es importante destacar, que las muestras tratadas con $US+LP_c$ exhibieron el menor BI/BI_o, indicando que el tratamiento combinado previno del pardeamiento de las muestras. Las muestras tratadas con $US+LP_c$ en jugo comercial de manzana mostraron mayor L* y menor b* que las correspondientes al mismo tratamiento pero en jugo natural. Además, las muestras tratadas con LP_c en jugo exprimido estuvieron asociadas a mayores valores de a* y BI/BI_o respecto al jugo comercial. Estas diferencias pueden atribuirse a posibles cambios que pueden acontecer durante el procesamiento térmico al cual el jugo comercial fue previamente sometido.

Tabla 4.5.3. Autovalores (a) y correlaciones de las CP con las variables originales (b) correspondientes al análisis de PCA de los parámetros de color del jugo de manzana comercial y natural control y procesados mediante LP_c y $US+LP_c$ a lo largo del almacenamiento refrigerado. En verde se resalta el número de CP retenidas y la proporción de la variabilidad acumulada por dichas CP. En azul y rojo se resaltan las variables de mayor peso que presenta correlación negativa y positiva, respectivamente.

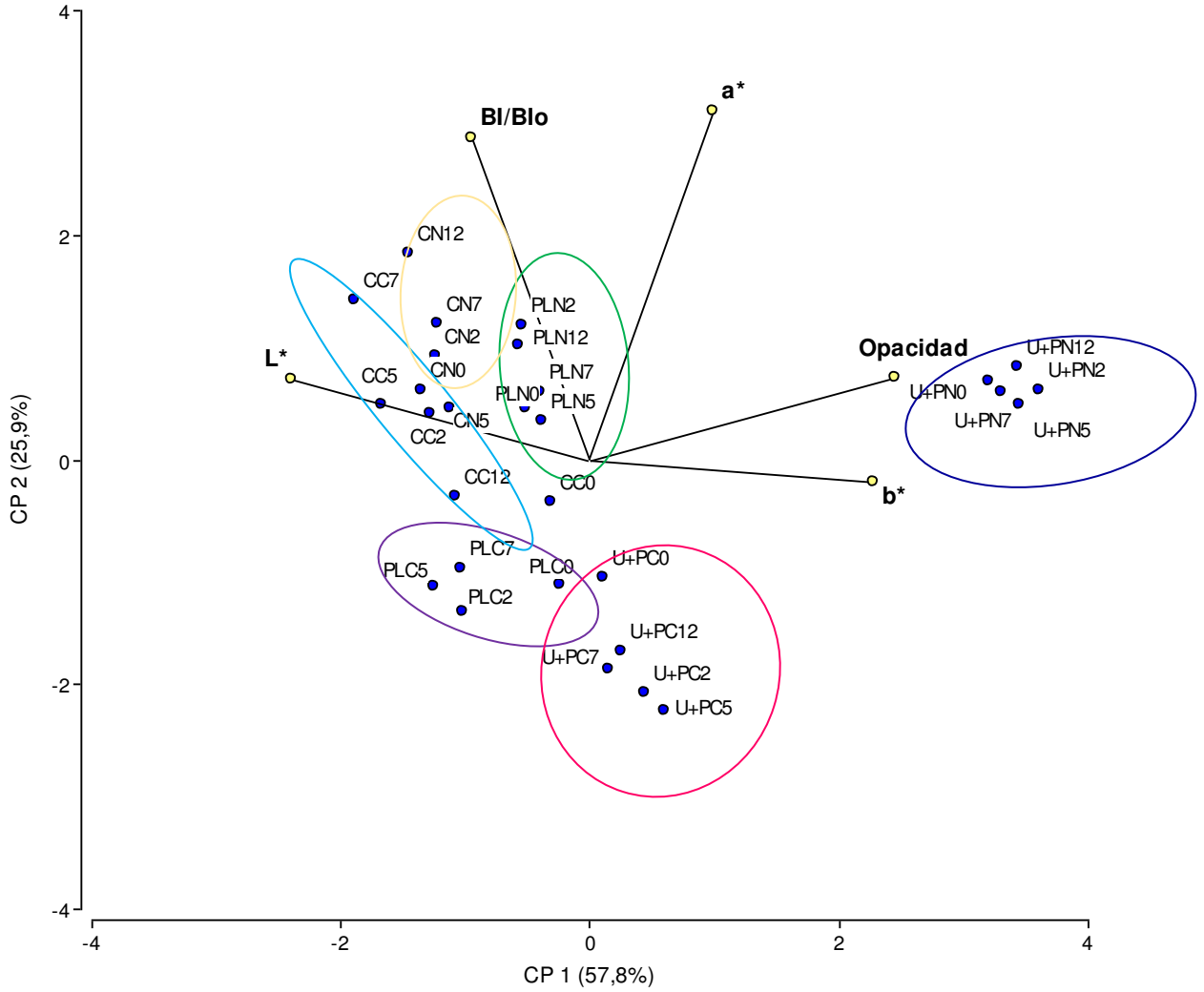
a

Autovalores		
λ	**Proporción**	**Proporción acumulada**
1	0,58	0,58
2	0,26	0,84
3	0,13	0,97
4	0,01	1,00
CCC	0,961	

b

Correlaciones con las variables originales		
Variables	**CP_1**	**CP_2**
L*	-0,94	0,19
a*	0,39	0,81
b*	0,89	-0,05
BI/BI_o	-0,37	0,75
Opacidad	0,96	0,19

Figura 4.5.2. Gráfico bidimensional del análisis de componentes principales (PCA) de los parámetros de color del jugo comercial (C) y natural (N) de manzana. Ctr, control; LP, tratamiento LP_c; U+P, combinación $US+LP_c$; almacenado 0, 2, 5, 7 o 12 días a 4 ± 1 ℃.



4.5.2 Apariencia del jugo de manzana procesado mediante LP_c y US+LP_c

La **Figura 4.5.3** muestra la variación de la opacidad calculada según la **ecuación 3.22 de Materiales y Métodos, apartado 3.12** para las muestras de jugo de manzana comercial y natural control y procesadas mediante LP_c y US+LP_c. Todas las muestras de jugo resultaron traslúcidas dado que presentaron valores de opacidad menores a 1, y estuvieron comprendidos entre 0,28-0,32 y 0,31-0,51 para los jugos comercial y natural, respectivamente.

En el caso del jugo comercial, la opacidad de la muestra control (0,28 ± 0.03) no difirió significativamente ($p > 0,05$; **Tabla 4.5.4a**) de la muestra tratada mediante LP_c (0,28 ± 0,03), pero sí ambas resultaron más traslúcidas que la tratada mediante US+LP_c (0,32 ± 0,02) (**Figura 4.5.4a**). La opacidad para cada muestra no varió con el tiempo de tratamiento ($p > 0,05$; **Tabla 4.5.4a**)

En el caso del jugo de manzana natural, la opacidad de la muestra control (0,31 ± 0,01) resultó significativamente menor a la procesada por LP_c (0,33 ± 0,01) y a su vez, ambas resultaron menores a la procesada mediante el tratamiento combinado (0,51 ± 0,01; $p < 0,0001$; **Tabla 4.5.4b**), manteniéndose el valor de opacidad a lo largo del almacenamiento La opacidad para cada muestra no varió con el tiempo de tratamiento ($p > 0,05$; **Tabla 4.5.4b**).

Uno de los atributos de calidad más importantes considerado por los consumidores es la apariencia de los jugos. Los consumidores prefieren en general jugos opacos. La opacidad se atribuye a los sólidos en suspensión y a las moléculas de pectina disueltas y coloidales (Okoth y col., 2000).

Tabla 4.5.4. Cuadro de ANOVA correspondiente a la opacidad de las muestras de jugos de manzana comercial (a) y natural (b) procesados mediante LP_c y $US+LP_c$ y almacenados en refrigeración.

a)

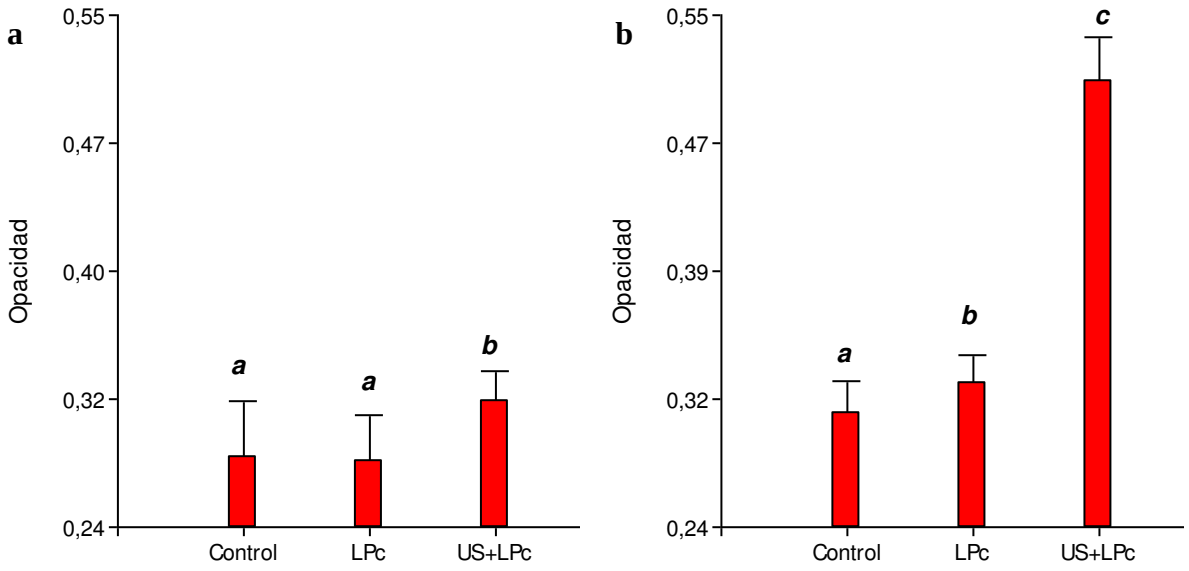
Fuente	GL	CM	F
Modelo	14	3e-3	4,36***
Tratamiento	2	0,01	14,69***
Día	4	3e-3	4,47***
Tratamiento*día	8	7e-4	$0,13^{ns}$
R^2_{aj}		0,85	

b)

Fuente	GL	CM	F
Modelo	14	0,04	72,85***
Tratamiento	2	0,25	497,31***
Día	4	1,9e-3	3,62*
Tratamiento*día	8	5,1e-4	$1,36^{ns}$
R^2_{aj}		0,94	

*** significativo al 0,1%; ** significativo al 1%.

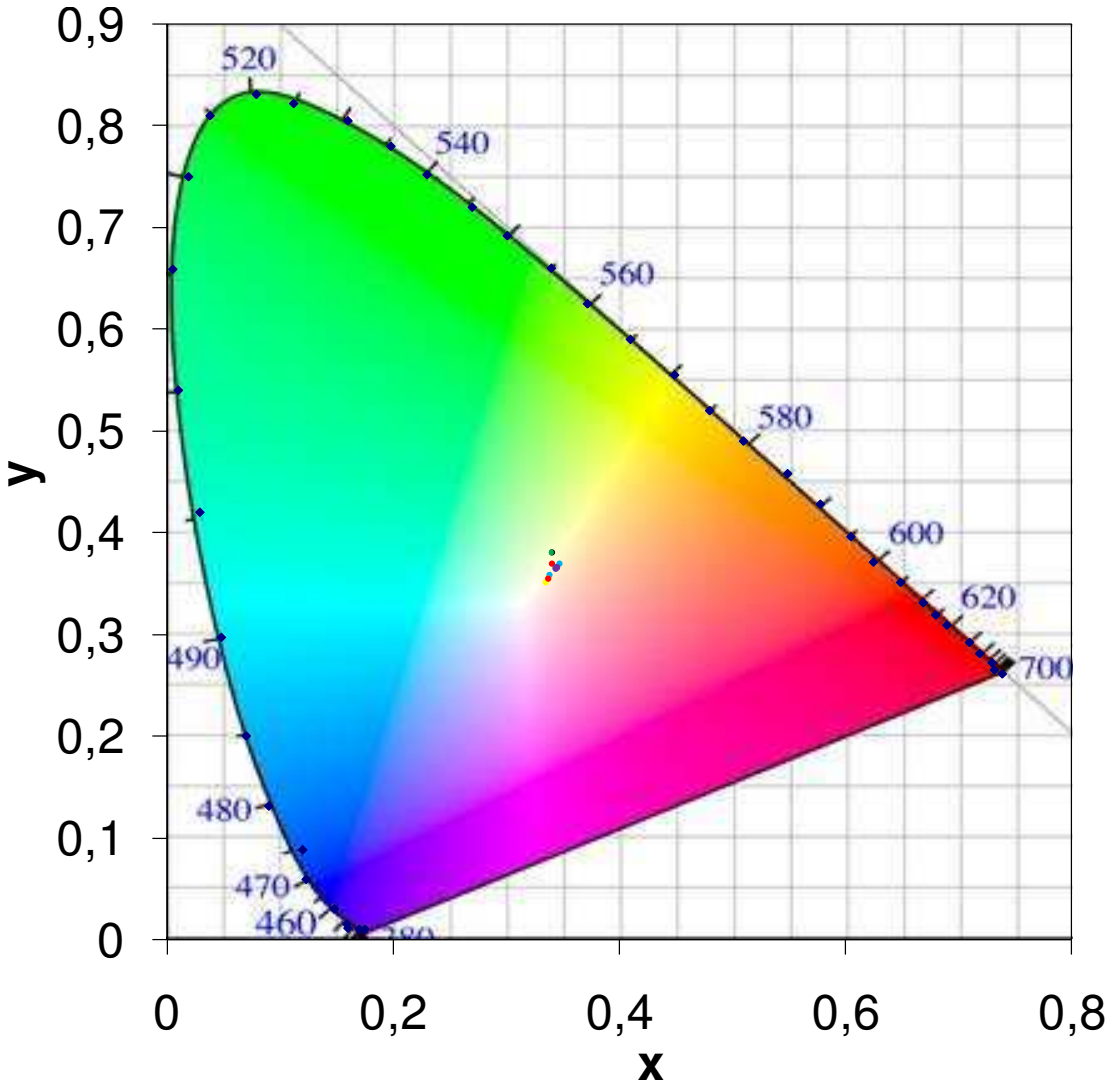
Figura 4.5.3. Opacidad de las muestras de jugo de manzana comercial (a) y natural (b) control, y procesadas mediante LP_c y $US+LP_c$ para el día 0 de almacenamiento.



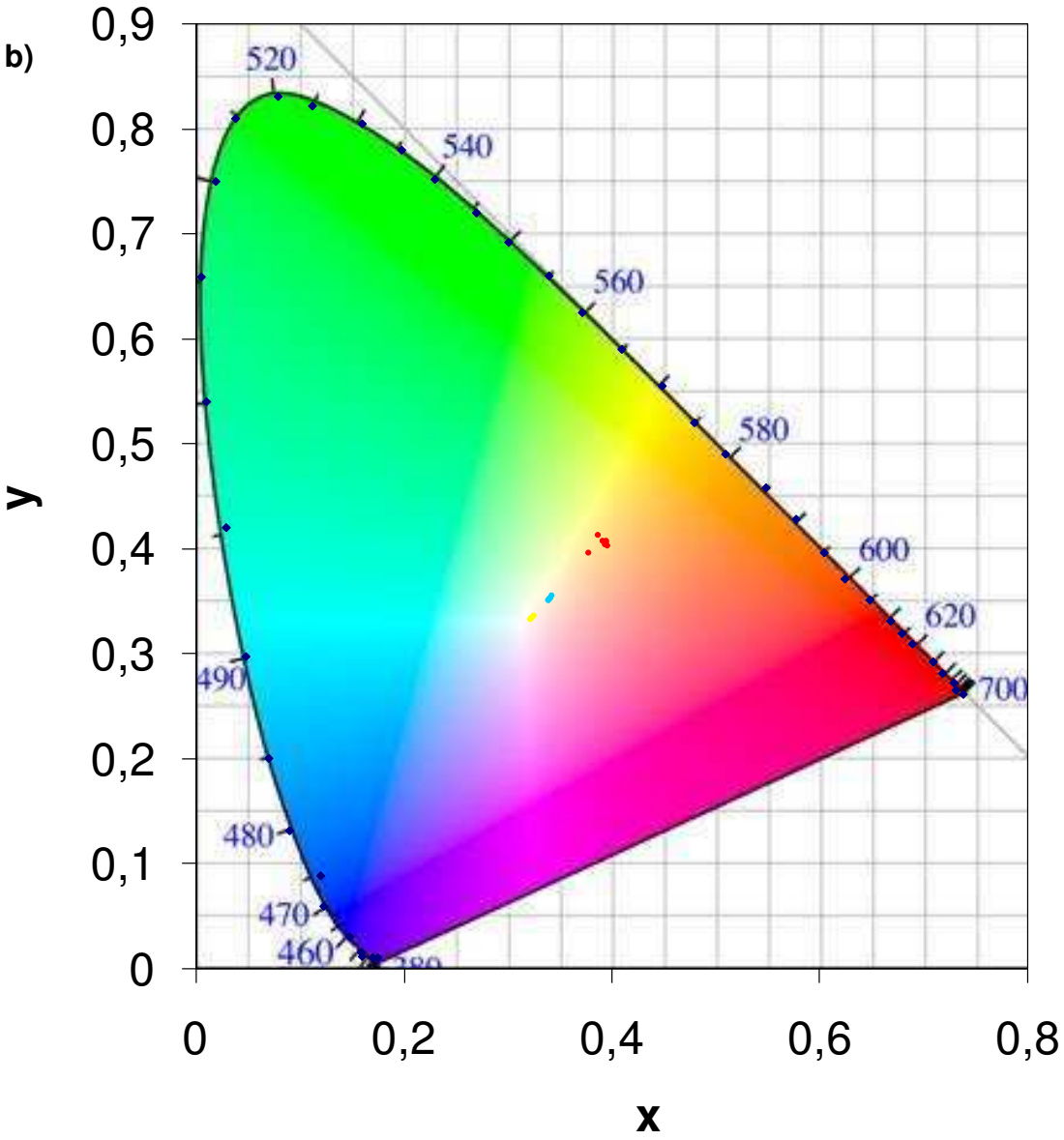
La evolución del color durante el almacenamiento de las muestras de jugo de manzana comercial natural control y tratadas puede ser apreciado en el diagrama de cromaticidad CIE x-y mostrado en la **Figura 4.5.4a** y **4.5.4b**, respectivamente, en donde se observa que el jugo comercial no presentó corrimiento en el espacio de color (Figura 4.4.7a), mientras que el jugo natural la muestra tratada por US+LP$_c$ sí presentó un importante corrimiento en el espacio de color hacia una región de mayor saturación respecto a las muestras control y tratadas por LP$_c$.

Figura 4.5.4. Evolución del color en el jugo de manzana comercial (a) y natural (b) control (●), procesados por LP$_c$ (●) y US+LP$_c$ (●)

a)



b)



4.5.3 Análisis sensorial

Se evaluaron los cambios sensoriales que los tratamientos LP_c y $US+LP_c$ introdujeron al jugo de manzana natural. Para ello, se llevaron a cabo distintas pruebas sensoriales como el test de diferencia contra control, el test de campo con consumidores y la vida útil sensorial del jugo de manzana, según se describió en **Materiales y Métodos, apartado 3.15.3 a 3.15.5.**

4.5.3.1 *Test de diferencia contra control*

En esta prueba los panelistas (consumidores) analizaron la magnitud de la diferencia global entre las muestras de jugo de manzana tratadas con LP_c y $US+LP_c$ como se detalla en **Materiales y Métodos, apartado 3.8**, respecto del jugo de manzana sin procesar o control.

Los sistemas comparados frente al control reconocido como tal (jugo de manzana sin procesar) fueron:

- Control camuflado (C)
- Jugo de manzana procesado por LP_c
- Jugo de manzana procesado por $US+LP_c$

Con los resultados obtenidos a partir de la escala numérica de categorías (desde 1: "ninguna" diferencia hasta 5: "diferencia muy grande"), se calculó la diferencia media correspondiente de cada sistema respecto del control identificado como tal.

Los sistemas C y LP_c recibieron una puntuación media de 2,27 y 2,13, respectivamente, lo cual corresponde a una "ligera diferencia". Esto indica que los consumidores no percibieron diferencias respecto del control cuando las muestras fueron procesadas por LP_c de manera individual. En cambio, para la condición de $US+LP_c$, las muestras recibieron una puntuación media de 3,93, correspondiéndose a la categoría "diferencia grande". Con el propósito de determinar si existen diferencias significativas entre los sistemas evaluados, se llevó a cabo un ANOVA de dos factores: muestra y sujeto, el cual se resume en la **Tabla 4.5.5.** El mismo indicó que los juicios emitidos por los sujetos no fueron significativamente diferentes ($F_{sujeto} < F_{crítico\ sujetos}$) a un nivel del 5 %, por lo que hubo coherencia entre las respuestas y los consumidores se comportaron como un grupo. El ANOVA también reveló que se encontraron diferencias significativas entre las muestras evaluadas ($F_{muestras} > F_{crítico\ muestras}$). Con el propósito de evaluar cuáles de los tratamientos fueron significativamente diferentes, se procedió a realizar el test de comparaciones múltiples de Dunnet según la **ecuación 6.21 del**

Apéndice. La diferencia crítica calculada fue de 0,46 (α: 0,05; Φ_{error}: 88; K: 2; n: 45). Las medias que difirieron de la media del control camuflado C, excediendo dicho valor, se consideraron estadísticamente diferentes a 5 % de significación (**Figura 4.4.9**). La diferencia calculada entre la media correspondiente a la muestra US+LP_c y el control (Δ: 1,84) excedió el valor crítico, con lo cual el procesamiento por el tratamiento combinado altera en cierta medida la impresión global del jugo de manzana. Mientras que las muestras procesadas por LP_c no presentaron diferencias significativas respecto a la muestra control (Δ: 0,31)

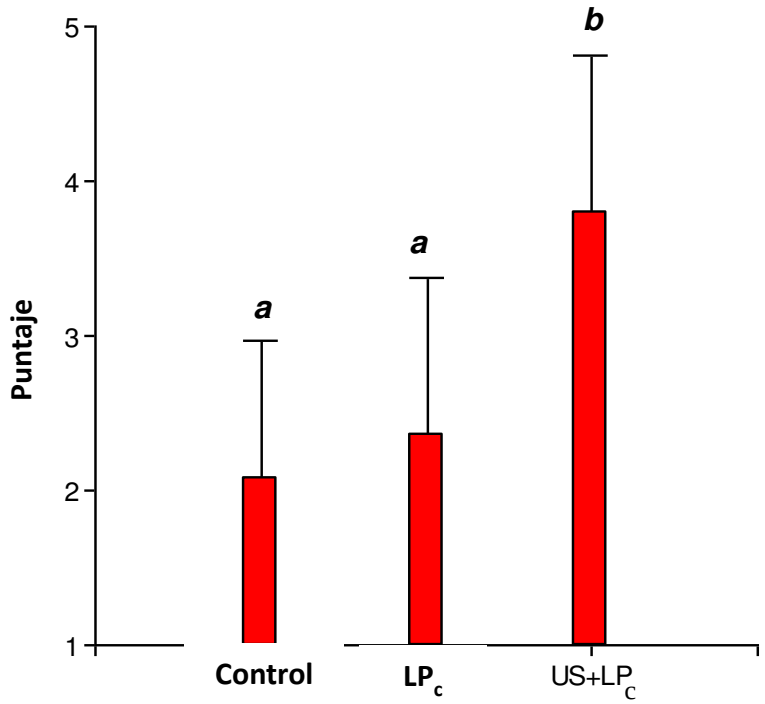
Tabla 4.5.5. Análisis de la varianza para las posiciones asignadas por los panelistas a las diferencias encontradas en las muestras de jugo de manzana procesados por LP_c y US+LP_c en un test de diferencia contra control.

Fuente	***Suma de cuadrados***	***GL***	***Media de cuadrados***	***F***	***F crítico***
Sujeto	1828,14	44	41,55	$0,93^{NS}$	1,47
Muestras	14108,91	3	4702,97	$104,86^{s}$	2,67
Error	5920,34	132	44,85		
Total	21857,39	179			

^{NS} No significativo, ^{S} significativo al 5 %.

Este estudio puso de manifiesto la importancia de la inclusión de un control camuflado para detectar el efecto placebo, especialmente cuando se trabaja con panelistas no entrenados.

Figura 4.4.9. Posiciones asignadas por los participantes a las diferencias encontrada en las muestras de jugo de manzana tratadas por LP_c y $US+LP_c$. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas entre las muestras de acuerdo al Test de Dunnet. desvío estándar (I).



4.5.4 Evaluación sensorial del jugo de manzana natural procesado mediante US+LPc

Se llevó a cabo un test campo con consumidores con el objeto de evaluar la aceptabilidad global (o impresión global) y algunas características del jugo de manzana natural procesado por $US+LP_c$, según la metodología descripta en **Materiales y Métodos, apartado 3.15.4**.

Cada categoría de la escala hedónica balanceada de 9 puntos utilizada en la evaluación de la impresión global, fue convertida a una puntuación entre 1 y 9 puntos, desde 1: "me disgusta extremadamente" a 9: "me gusta extremadamente". La aceptabilidad global promedio fue de 6,1 puntos, correspondiente a la categoría "me gusta algo", en la escala de 9 puntos. La **Figura 4.5.10a** muestra la

distribución de frecuencias de los puntajes asignados por los panelistas. En la misma puede apreciarse que la distribución de puntajes presentó dos grupos mayoritarios, uno correspondiente a la categoría “me disgusta algo” (4 puntos en la escala hedónica), y el otro grupo correspondiente a la categoría “me gusta moderadamente” (7 puntos en la escala hedónica). Los puntajes asignados para la intensidad de sabor a manzana y el valor óptimo de acidez de los jugos procesados se muestran en la **Figura 4.5.10b y 4.5.10c**, respectivamente. Tomando en consideración las escalas 4 y 5 en conjunto, el 50,8 % de los consumidores detectaron una alta intensidad en el sabor a manzana del jugo

Figura 4.5.10. a) Distribución de frecuencias de los puntajes asignados por los panelistas para la evaluación de impresión global de jugo de manzana natural procesado por US+LP_c b) Evaluación del sabor a manzana y c) la acidez óptima del jugo de manzana natural tratado por US+LP_c

a)

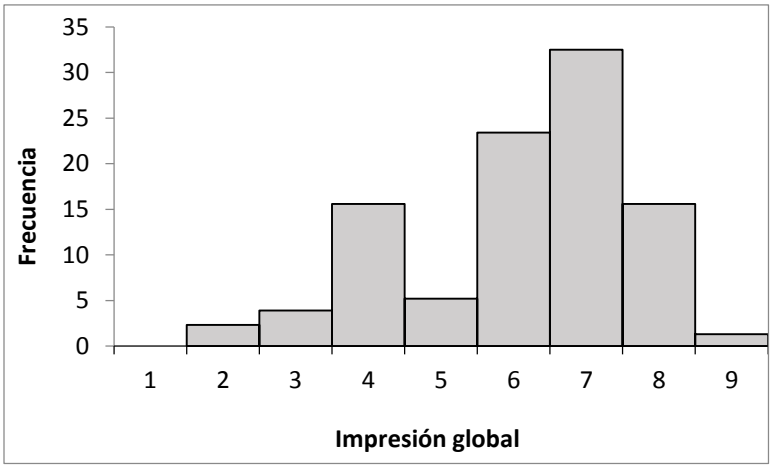
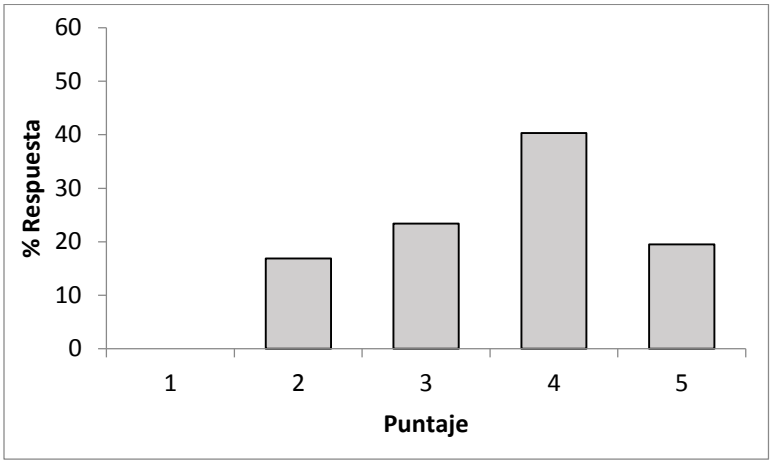
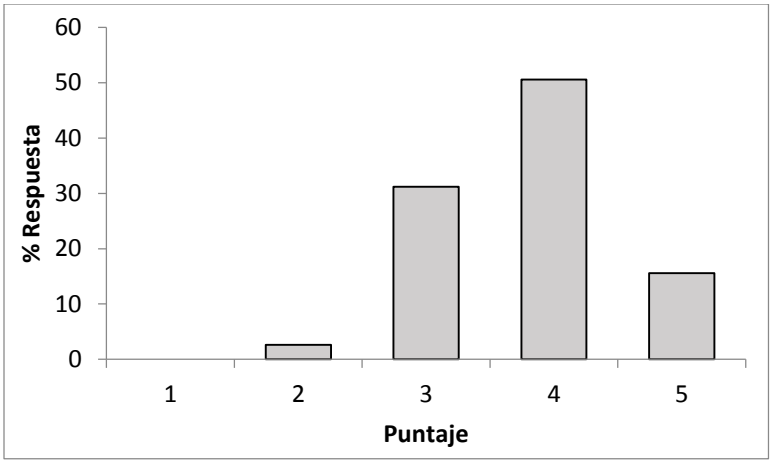


Figura 4.5.10. ***Continuación…***

b)



c)



procesado; mientras que el 66,2 % consideró que la acidez está por encima de su valor óptimo. Sólo el 16,9 % de los panelistas atribuyeron una baja intensidad de sabor a manzana (puntajes 1 y 2 de la escala; **Figura 4.5.10b**).

Si bien el jugo de manzana procesado mediante US+LP_c recibió un bajo puntaje en el test de impresión global, cuando los consumidores se segmentaron de acuerdo a sus preferencias, se encontraron 2 grupos: cluster 1 (C1), conformado por 22 consumidores, englobando las categorías 2 a 5 en la escala hedónica de 9 puntos, y el cluster 2 (C2), de 55 consumidores, incluyendo las categorías 6 a 9 (**Figura 4.5.11**). Si bien la decisión del corte en el dendograma puede ser un poco subjetivo, un criterio para el buen ajuste de las distancias en el dendograma es un valor de *CCC* mayor a 0,8 (Lawless, 2013). El *CCC* obtenido

resultó 0,84, lo cual indica un buen ajuste alcanzado con este análisis según el criterio adoptado por Everitt y col. (2001). El C2 mostró un fuerte interés en el producto dado que la media de la impresión global para el producto fue de 7.0 puntos, correspondiente a la categoría “me gusta moderadamente”. En la **Tabla 4.5.6a** se muestran la media de la percepción de acidez otorgado por cada cluster, en la que puede observarse que el C2 percibió la acidez del producto más cercano a su valor de punto justo. Se realizó un ANOVA con el objeto de detectar si estas diferencias eran significativas (**Tabla 4.5.6b**). El C2 percibió significativamente la acidez más cercano al punto justo ($p< 0,0001$) como se ilustra en la **Figura 4.5.12.**

Tabla 4.5.6. Valor promedio, mínimo y máximo de la percepción de acidez del jugo de manzana procesado por US+LP_c según cada cluster (a). Cuadro de ANOVA para la percepción del gusto ácido según el cluster (b).

a)

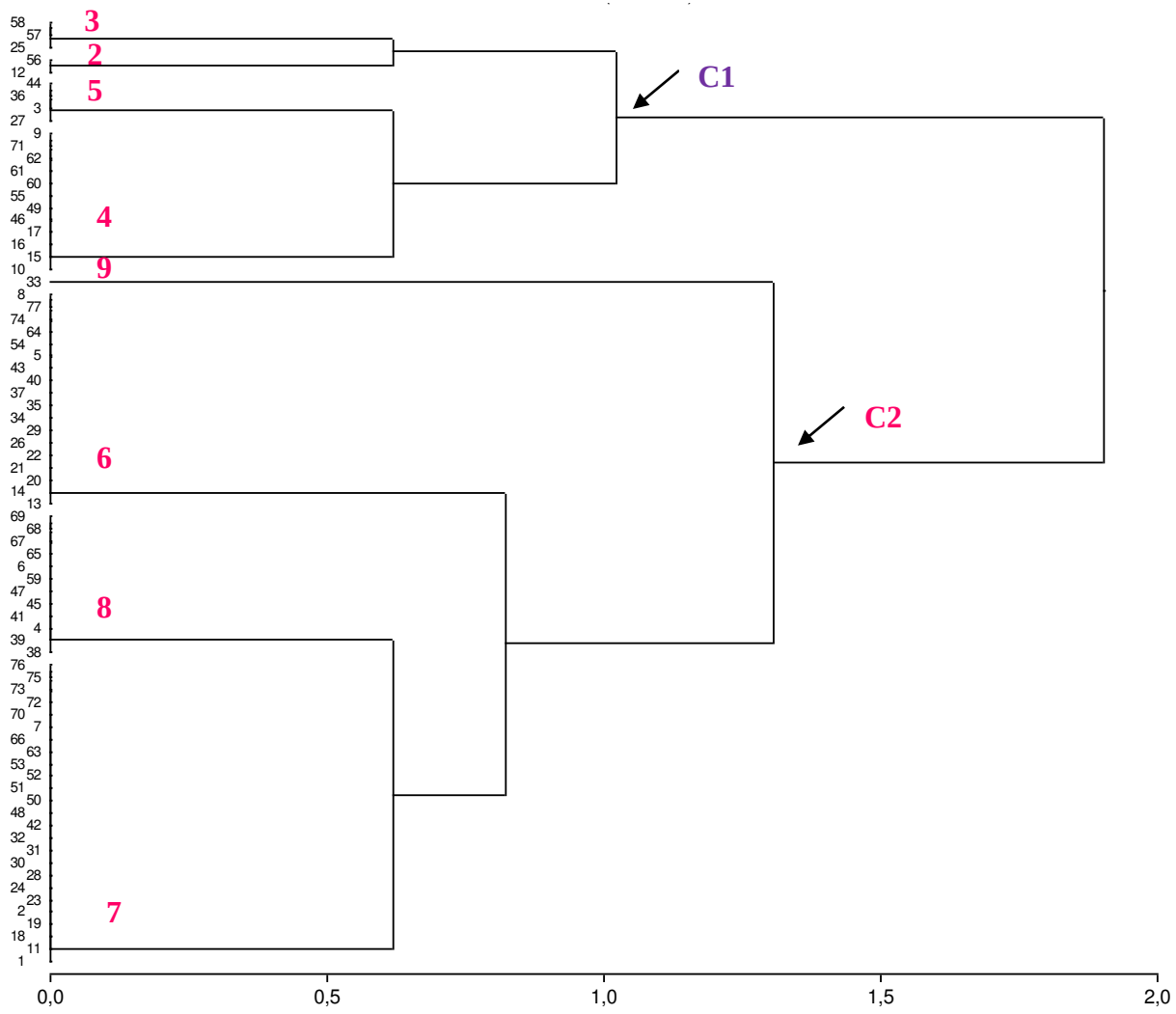
Cluster	n	Media	Mínimo	Máximo
C1	21	4,48±0,51	4,00	5,00
C2	54	3,59±0,57	3,00	5,00

b)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F
Modelo	11,80	1	11,80	11,80****
Cluster	11,80	1	11,80	38,69****
Error	22,28	73	0,31	
Total	34,08	74		

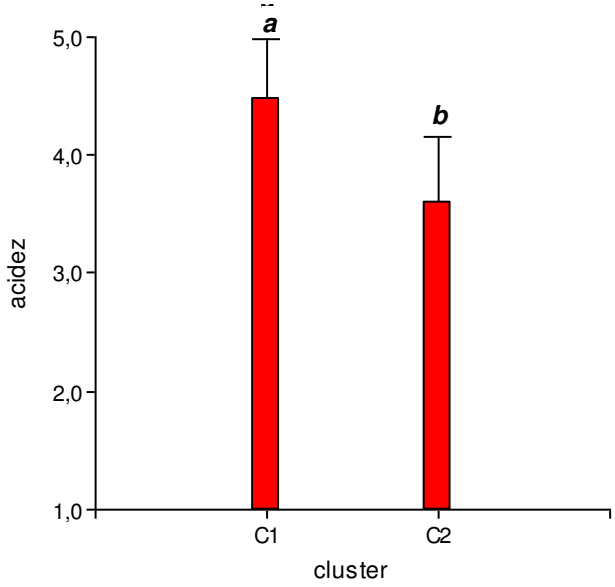
*** significativo al 0,1%; ** significativo al 1%; * significativo al 5 %

Figura 4.5.11. Dendograma basado en los puntajes asignados por los panelistas en el test hedónico mostrando los diferentes grupos según la preferencia de los consumidores. Los números indican los consumidores, mientras que los números en negrita simbolizan la puntuación otorgada por dichos consumidores en el test de impresión global. Las flechas marcan los clusters C1 y C2



CCC= 0,84

Figura 4.5.12. Media de la acidez según el cluster. Desvío estándar (I).



Resulta interesante destacar algunos comentarios realizados en las dos preguntas abiertas A y B del **Formulario Nº 2** (**Materiales y Métodos, apartado 3.15.4**) que se hicieron acerca de qué fue lo que gustó o no gustó del jugo de manzana. La información obtenida es de gran importancia para futuras investigaciones, ya que se buscara mejorar algunas cualidades sensorialess del producto final.

Lo que gustó del producto:

- Sabor intenso a manzana
- Sensación de jugo natural, fresco, sin procesamiento.

Lo que no gustó del producto:

- Fuerte acidez
- Gusto metálico

Adicionalmente, se llevó a cabo un PCA a modo ilustrativo con el objeto de encontrar las relaciones entre los puntajes asignados en la escala hedónica y el

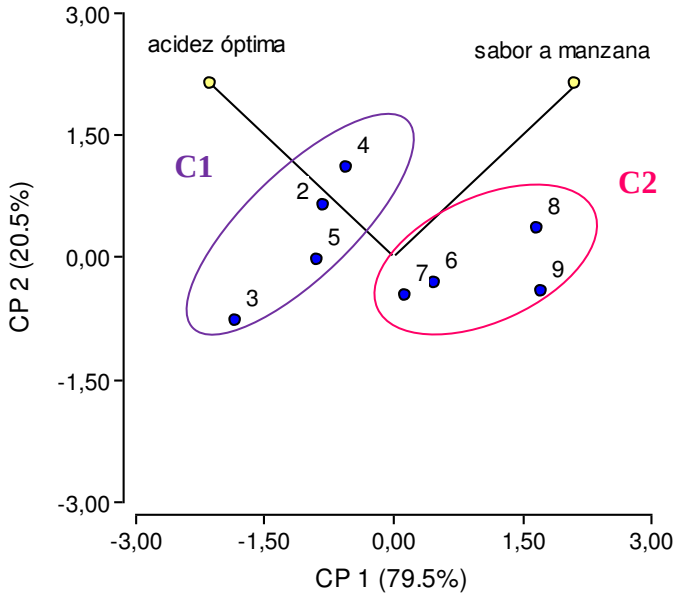
porcentaje de los puntajes asignados en la escala de intensidad de sabor a manzana y de la acidez óptima del jugo de manzana natural procesado por US+LP$_c$ (**Figura 4.5.13**). La **Tabla 4.5.7** muestra los autovalores y las correlaciones de las CP con las variables originales resultantes del análisis. El *CCC* obtenido fue 1,0, indicando que se alcanzó una reducción adecuada con el análisis. Se retuvieron las dos primeras componentes principales (CP$_1$ y CP$_2$) que explicaron el 100 % de la varianza. La CP$_1$ (**Figura 4.5.13**) explicó el 79,5 % y se encontró asociada positivamente con la intensidad del sabor a manzana y negativamente con la acidez óptima; mientras que la CP$_2$ se asoció de manera positiva con ambas variables y explicó el 20,5 % de la varianza. El análisis mostró que los bajos puntajes de la escala hedónica (2 a 5 puntos) estuvieron asociados a valores de acidez por encima de su punto justo y bajos valores de intensidad de sabor a manzana. Por otra parte, los altos valores asignados por los panelistas en la escala hedónica (6 a 9 puntos) estuvieron asociados con alta intensidad y valores de acidez más cercanos al óptimo.

Tabla 4.5.7. Autovalores y correlaciones de las CP con las variables originales correspondientes al análisis de PCA de los atributos sensoriales y la aceptabilidad global del jugo de manzana natural procesados mediante US+LP$_c$. En verde se resalta el número de CP retenidas y la proporción de la variabilidad acumulada por dichas CP. En azul y rojo se resaltan las variables de mayor peso que presenta correlación negativa y positiva, respectivamente.

Autovalores		
λ	**Proporción**	**Proporción acumulada**
1	0,80	0,80
2	0,20	1,00
CCC	1,00	

Correlaciones con las variables originales		
Variables	**CP$_1$**	**CP$_2$**
Sabor a manzana	0,90	0,45
acidez	-0,90	0,45

Figura 4.5.13. Gráfico bidimensional correspondiente al análisis de componentes principales (PCA) de los puntajes asignados por los panelistas en el test de impresión global y durante la evaluación de intensidad de sabor a manzana y acidez óptima del jugo de manzana natural procesado con US+LP$_c$.



4.5.5 Estimación de la vida útil sensorial del jugo de manzana natural procesado por US+LP$_c$

Se llevó a cabo el estudio de vida útil sensorial con el fin de estimar el tiempo en el cual un dado porcentaje de los consumidores rechaza el jugo de manzana natural procesado por US+LP$_c$ y almacenado a 5±1 ºC, como se detalló en **Materiales y Métodos, apartado 3.19.5**. Para ello, se aplicó la distribución de Weibull según la **ecuación 3.25** como de describió en **Materiales y Métodos**, **apartado 3.15.5**. La distribución ajustó adecuadamente los datos sensoriales dado que presentó el mayor likelihood (Hough, 2010; **Tabla 4.5.8**). En la **Tabla 4.5.8** se muestran los parámetros de las distribuciones del modelo y la vida útil sensorial estimada para el jugo de manzana natural tratado US+LP$_c$. En La **Figura 4.5.14** se muestra el porcentaje de rechazo de los consumidores en función del tiempo de almacenamiento del jugo de manzana procesado con US+LP$_c$, en base a los parámetros obtenidos y aplicando la **ecuación 3.14**. La estimación de la vida útil

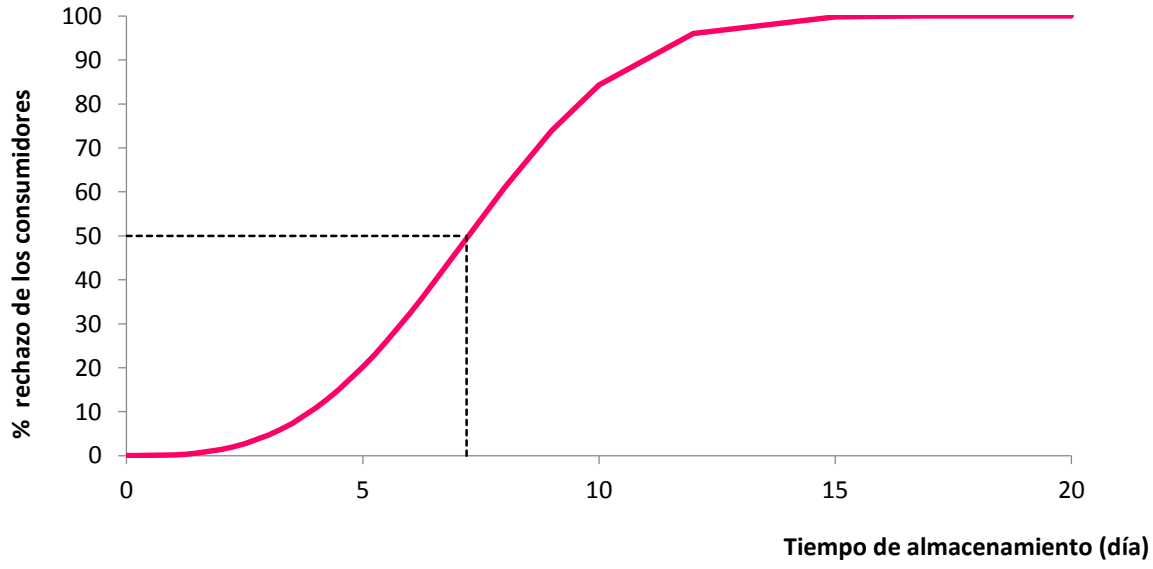
sensorial para P_{25} fue de 6 días con bandas de confianza (95 %) de 5 y 7 días; mientras que para P_{50}, fue de 7 días con bandas de confianza (95 %) de 6 y 8 días.

Tabla 4.5.8 Valores de los parámetros, porcentajes de rechazo y likelihood de la distribución de Weibull para estimar la vida útil sensorial del jugo de manzana natural procesado con US+LP$_c$.

		Weibull	
Parámetro	*Límite inferior*[1]	*Valor estimado*	*Límite superior*[1]
μ	1,91	2,00	2,01
σ	0,08	0,17	0,38
P_{25}*	5,24	5,97	6,80
P_{50}*	6,36	6,95	7,58
Loglikelihood[2]		32,57	

P_{25}*, porcentaje de rechazo al 25 %; P_{50}*, porcentaje de rechazo al 50 %; [1] 95 % de confianza; [2] el menor likelihood indica mejor ajuste.

Figura 4.5.14. Probabilidad de los consumidores de rechazar el jugo almacenado en refrigeración de manzana natural procesado con US+LP$_c$, estimado por la distribución de Weibull



Por lo tanto, este estudio reveló que los consumidores no rechazarían el jugo de manzana procesado por 30 min US (T_{US}: 25 ºC) y 10 min LP_c ($T_{LPcfinal}$: 25 ºC, 155 mL/min) durante todo el período de vida útil determinado en los estudios microbiológicos previos.

5. Conclusiones

5 *Conclusiones*

Este estudio permitió aportar información cuantitativa relevante acerca de la utilización de una tecnología combinada de preservación de jugos frutales innovadora, la cual involucra la utilización de luz pulsada en los modos estanco y continuo y temperatura moderada, asistida por un pre-tratamiento con ultrasonido de alta intensidad, con el propósito de reemplazar los procesos térmicos tradicionales que deterioran la calidad del producto.

La aplicación de diferentes técnicas de análisis (citometría de flujo, microbiología predictiva y microscopía electrónica de transmisión) de la respuesta microbiana a las tecnologías empleadas, permitió conocer más en profundidad el modo de acción de las mismas, diseñando así de un modo más racional el proceso de preservación de un jugo de manzana. Este estudio, también proveyó valiosa información acerca de sus consecuencias en la calidad microbiológica, sensorial y la vida útil sensorial de jugo de manzana procesado por la tecnología propuesta.

El estudio detallado de las cinco etapas de investigación permitió arribar a las siguientes conclusiones:

Parte I Tratamiento por LP_e de jugos frutales

- En este estudio se demostró que la efectividad del tratamiento por luz pulsada en sistema estanco y con refrigeración ($T_{LPe\ final}$: 12 °C) depende de manera significativa de la absorbancia de los jugos en el rango de luz UV, mientras que la turbidez y el tamaño de partícula no cumplen un rol igual de importante. Otras variables como el pH y °Brix, no parecieron jugar un rol importante en la inactivación por esta tecnología.

- En los estudios de reto microbiano referidos a la utilización de luz pulsada en modo estanco, todas las curvas de inactivación estuvieron caracterizadas por una reducción pronunciada durante los primeros 10 s de tratamiento de LP_e (fluencia $\leq$ 12 J/cm^2) seguidas de una segunda etapa

donde la población disminuyó más lentamente con el tiempo de tratamiento, a excepción de algunas curvas que resultaron sigmoideas. Este comportamiento, condujo a la necesidad de aplicar modelos matemáticos no lineales que permitieron una mejor comprensión y cuantificación del efecto de LP_e.

- Las curvas de inactivación correspondientes a LP_e resultaron en muchos casos, cóncavas hacia arriba, lo que indicaría que el proceso se vuelve menos efectivo a dosis más elevadas. En varios casos se observó presencia de cola, lo que puede atribuirse, entre otras causas, a la existencia de miembros de la población resistentes al tratamiento y/o alta absorbancia de las muestras en la región UV. Este hecho ratificó la necesidad de utilizar esta tecnología en una estrategia combinada de preservación con otros factores de stress tradicionales y/o emergentes, con el propósito de obtener mayor reducción en la población microbiana, además de optimizar la aplicación de LP_e evitando el sobre-tratamiento.

- Las curvas de supervivencia resultantes de la aplicación de LP_e, fueron ajustadas por tres modelos matemáticos conceptualmente diferentes: el modelo de Weibull, el modelo bifásico de Cerf y el modelo de doble Weibull propuesto por Coroller. Los modelos bifásico y de Weibull constituyeron buenas alternativas representando adecuadamente la inactivación por LP_e en diferentes jugos frutales naturales y comerciales mientras que, el modelo propuesto por Coroller no representó adecuadamente todas las curvas de inactivación. Los parámetros obtenidos explicaron, de distintos puntos de vista, la influencia de esta tecnología en la inactivación microbiana. El modelo de Weibull permitió conocer las distribuciones de frecuencias de resistencias y así detectar las distintas subpoblaciones, mientras que el modelo bifásico, las tasas de inactivación de las subpoblaciones sensibles y resistentes al tratamiento.

- El estudio de la utilización de diferente concentración de esporas de *A. acidoterrestris* ATCC 49025 en jugo de manzana para determinar la

influencia en la eficiencia del tratamiento por LP_e, permitió establecer que no solo la carga inicial de esporas influye en el tiempo de procesamiento por LP y en la eficacia del proceso sino también la reducción de esporas requerida como factor clave de influencia.

- La exposición a bajas temperaturas durante el almacenamiento, luego del tratamiento por LP_e de algunos microorganismos relevantes inoculados en jugos naturales, mejoró la inactivación lograda por LP_e. En particular, se observó un decrecimiento de la población de *L. innocua* ATCC 33090 tratada con LP_e y almacenada en baja temperatura en los jugos de manzana, naranja y frutilla, alcanzándose entre 3,9 y 7,8 reducciones logarítmicas y de *S.* Enteritidis MA44 de más de 8 ciclos de reducción en jugo de manzana luego de 12 días. Por lo que, este posterior decrecimiento se debería probablemente a que las poblaciones tratadas por LP_e estarían más sensibilizadas a las condiciones de alta acidez y bajas temperaturas. En otros casos, se observó un retardo en el crecimiento y/o recuperación de las poblaciones tratadas con LP_e de *S. cerevisiae* KE 162 en los jugos de alta acidez (manzana, frutilla y naranja), de *S*. Enteritidis MA44 en melón, frutilla y naranja y en *E. coli* ATCC 35218 en todos los jugos ensayados. Por otra parte, la sola aplicación de LP_e no fue lo suficientemente efectiva para prevenir la recuperación de la flora nativa de los jugos frutales evaluados, lo cual motivó a combinarlo con otras tecnologías.

- Los estudios de citometría de flujo revelaron que la exposición de células de *S. cerevisiae* a LP_e, desestabilizó la integridad de la membrana conduciendo a la inactivación celular. Asimismo, mediante esta técnica, se confirmó que la permeabilización de la membrana de *S. cerevisiae* KE 162 presente en jugo de manzana tratado por LP_e fue considerablemente menor que en los sistemas de agua peptonada a igual dosis aplicada. Esto corrobora la dependencia de la efectividad del tratamiento con la absorbancia de la matriz. Esta técnica también permitió detectar a bajas

dosis de LP_e (hasta 12 J/cm^2, 10 s) la presencia de subpoblaciones de *S. cerevisiae* KE 162 con daño sub-letal.

- Por otra parte, al evaluar el daño de células de *S. cerevisiae* KE 162 mediante microscopía electrónica de transmisión, se detectaron cambios en la estructura celular adicionales al daño en la membrana y en la pared celular, entre ellos, se visualizaron células más redondeadas, vacuolas expandidas, pérdida del contenido intracelular por sitios de punción, coagulación del contenido intracelular, menor densidad electrónica.

Parte II- Tratamiento por LP_e asistida por otras tecnologías de jugo de manzana.

- Se comprobó el efecto beneficioso del aumento de temperatura generado durante el mismo procesamiento LP_e al mejorar la efectividad de la inactivación de *S. cerevisiae* KE 162 y esporas de *A. acidoterrestris* ATCC 49025 en jugo de manzana. La diferencia más notoria ocurrió a los 40 s de tratamiento (47,76 J/cm^2) en los sistemas de mayor temperatura de salida ($T_{LPe\ final}$: 56 °C) comparados con los de menor aumento de temperatura ($T_{LPe\ final}$: 12 °C), obteniéndose un incremento en la inactivación de las esporas y de las células de *S. cerevisiae* de hasta 1,3 y 2,4 reducciones logarítmicas, respectivamente. Desafortunadamente, no fue posible encontrar un modelo matemático que caracterice adecuadamente las curvas de inactivación por LP_e en condiciones no isotérmicas en un rango de temperatura donde la misma pudiese tener un efecto adicional en la inactivación observada.

- Se encontró que la aplicación de ultrasonido de alta intensidad (US) en combinación con LP_e y temperatura moderada, mostró efecto aditivo en la inactivación de *S. cerevisiae* KE 162 en jugo de manzana; mientras que la sonicación no mejoró la inactivación por LP_e de esporas de *A. acidoterrestris* ATCC 49025. El tratamiento que resultó más efectivo fue la aplicación de 30 min de US seguido de 60 s de LP_e, con una temperatura

final de muestra de 56 °C, alcanzándose entre 5,8 y 6,4 reducciones logarítmicas de *S. cerevisiae*, dependiendo del tipo de jugo de manzana considerado.

- Los estudios de citometría de flujo revelaron que la exposición de células de *S. cerevisiae* a 30 min US, 10 min US+LP_e y 30 min US+LP_e desestabilizó en mayor proporción la integridad de la membrana que los sistemas procesados por LP_e y 10 min US. Asimismo, se confirmó que el incremento de temperatura inicial del sistema de 44 °C- respecto del de menor temperatura, aceleró la permeabilización de la membrana para algunos sistemas como por ejemplo, el tratamiento 10 min-US. Esta metodología puso en evidencia la presencia de subpoblaciones de *S. cerevisiae* KE 162 con daño sub-letal en jugo natural de manzana procesadas por LP_e en las dos condiciones de temperatura evaluadas.

- Al evaluar el daño de células de *S. cerevisiae* KE 162 con tratamiento 60 s LP_e ($T_{LPe\ inicial}$: 44 ºC), US (T_{US}: 44 ºC) y 10 min US+LP_e (T: 44 ºC); y esporas de *A. acidoterrestris* ATCC 49025 tratadas 60 s LP_e ($T_{LPe\ inicial}$: 44 ºC) mediante microscopía electrónica de transmisión, pudo observarse un daño mayor que para el tratamiento LP_e simple analizado en la **Parte I**. Para ambos microorganismos se observó coagulación del material intracelular con la imposibilidad de distinguir estructuras internas observándose también, restos de células o esporas que perdieron su contenido intracelular. Particularmente, en el caso de las esporas también se visualizó la separación del exosporio de la capa de la espora, mientras que para *S. cerevisiae*, se observó engrosamiento de la pared y cambio de la forma celular.

Parte III - Tratamiento por LP_c

- Se diseñó exitosamente un equipo a escala laboratorio de LP en flujo continuo por recirculación (LP_c) para el procesamiento de alimentos líquidos. Se optimizaron: el sistema de refrigeración a modo de lograr que

no aumente considerablemente la temperatura del sistema, el tiempo de procesamiento y el caudal.

- El tratamiento por LP_c (0,018 J/mL, 0,73 J/cm^2) fue más efectivo en la inactivación de algunos microorganismos de relevancia que LP_e (2,4 J/cm^2 correspondiente a menor dosis evaluada), dado que se obtuvo un incremento entre 1,4-2,5 reducciones logarítmicas en jugo de manzana al procesarlos por el sistema continuo.
- Por otra parte, la energía eléctrica por orden, $E_{EO,}$ obtenida para LP_e resultó $4x10^3$-$9x10^3$ veces mayor a la calculada para LP_c por lo que el tratamiento de luz pulsada en flujo continuo resultaría más eficiente dado que requiere menor consumo energético. Es importante destacar, que el cálculo de E_{EO} es frecuentemente reportado en sistemas con presencia de contaminantes procesados por UV-C, pero no había sido reportado hasta la fecha en la inactivación de microorganismos en matrices alimentarias ni por radiación UV-C ni LP.

Parte IV- Tratamiento combinado US y LPc de jugo de manzana. Estudios microbiológicos

- El tratamiento combinado US (30 min, T_{US}: 25 °C, estanco) y LP_c en sistema continuo (0,73 J/cm^2, 155 mL/min, $T_{LPc\ final}$: 25 °C) resultó efectivo en la inactivación de microorganismos de relevancia en jugo de manzana, alcanzándose entre 3,7 y 6,3 reducciones logarítmicas de *S. cerevisiae* KE162, *E. coli* ATCC30218 y *S*. Enteritidis MA44. Por otra parte, el tratamiento propuesto previno de la recuperación de la flora nativa durante 7 días en almacenamiento refrigerado.

Parte V- Tratamiento combinado US y LPc de jugo de manzana. Estudios Estudios de calidad sensorial

- Si bien el tratamiento combinado ultrasonido y luz pulsada en sistema continuo, disminuyó la luminosidad de las muestras de jugo de manzana respecto de las muestras sin tratamiento alguno, el mismo exhibió menor incremento del índice de browning a lo largo del almacenamiento refrigerado.

- El sabor a manzana y la acidez del producto procesado por el tratamiento combinado fueron intensamente percibidos por los consumidores.

- La segmentación de consumidores a través del análisis de conglomerados permitió discriminar un grupo de consumidores que presentó un fuerte interés en el jugo de manzana procesado por ultrasonido y luz pulsada en sistema continuo, quienes valoraron positivamente el intenso sabor a manzana y la acidez del producto.

- La vida útil sensorial del jugo de manzana procesado fue estimada en 6 días teniendo en cuenta un 25 % de probabilidad de rechazo por parte de los consumidores.

- Los resultados satisfactorios obtenidos en los estudios microbiológicos, de color y pruebas sensoriales, permitieron afirmar que los cambios organolépticos introducidos en el jugo de manzana natural procesadas por la combinación ultrasonido y luz pulsada en sistema continuo, fueron leves durante el tiempo de vida útil propuesto, y que el mismo puede considerarse un producto innovador.

Investigaciones futuras

Se espera, en un futuro cercano, continuar esta línea de investigación para avanzar en la definición de los siguientes aspectos, no dilucidados hasta el momento:

- Con el objeto de obtener un producto de aplicación industrial, es necesario abordar investigaciones futuras que incluyan la aplicación de US en combinación con LP ambos en sistema continuo y que involucren mayores volúmenes de procesamiento. Al mismo tiempo es necesaria la

combinación con otras tecnologías emergentes a modo de lograr una extensión mayor de la vida útil.

- Estudiar otros factores de calidad del producto procesado mediante e tratamiento combinado que involucren el contenido de vitamina C, capacidad antioxidante, polifenoles y actividad enzimática de polifenoloxidasa, pectinmetilesterasa y peroxidasa.

- Evaluar la efectividad del tratamiento combinado sobre otros microorganismos de relevancia no estudiados en esta tesis como hongos deteriorativos de jugo de manzana *(p.e. Penicillium*, *Botrytis*, *Colletetrichum*, *Mucor* y *Monilinia).*

6. Apéndice: Procedimientos estadísticos

6 *Apéndice*

Esta sección presenta algunos métodos que fueron utilizados para realizar el análisis estadístico de la información que surgió de las investigaciones realizadas en esta tesis.

6.1 Definiciones

Una *población estadística* se define como un conjunto completo de elementos de interés. Las medidas tomadas sobre los elementos de una población están gobernadas por una distribución de probabilidad, usualmente expresada en forma de ecuación matemática, la cual relaciona la ocurrencia de un valor específico con la probabilidad de dicha ocurrencia.

La *distribución normal* es el tipo de distribución que más comúnmente se encuentra. En general cuando se procesan los datos estadísticamente se asume que su distribución es normal. La siguiente fórmula es la función de la distribución normal y se puede usar para verificar si realmente una serie de mediciones sigue tal distribución

$$f(x) = \left(1/\sqrt{2\pi\sigma}\ \right) * \exp\left[\ (Y-\overline{Y})^2 / 2\sigma^2\ \right] \qquad (6.1)$$

donde:

exp = función exponencial con base e

Y= medición realizada

$\overline{Y}$ = media del total de las mediciones

σ = desviación estándar

σ^2 = varianza

6.1.1 Parámetros y estimadores

Un *parámetro estadístico* es una función definida sobre los valores numéricos de la población. Es un valor representativo de una población que provee información sobre su distribución como la media aritmética o su desviación típica.

En estadística aplicada se asume que la forma de la distribución aplicada es conocida pero no así los parámetros que la representan. Los mismos deben ser estimados mediante la aplicación de funciones matemáticas a las mediciones obtenidas. Los datos estadísticos extraídos de dichas funciones se denominan *estimadores***.**

Media de la distribución ($\overline{Y}$); es el promedio aritmético de las mediciones realizadas:

$$\overline{Y} = \frac{\sum_{i=1}^{N} Y_i}{N} \qquad (6.2)$$

donde,

Y_i : valor individual del sistema i

N: número total de datos

Desviación estándar (σ) o desviación típica; es una medida de dispersión de las variables con respecto a su media y es de gran utilidad en la estadística descriptiva. Es en realidad la raíz cuadrada de la varianza:

$$\sigma = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^{N} (Y_i - \overline{Y})^2}}{\sqrt{(N-1)}} \qquad (6.3)$$

Varianza (σ^2); la varianza de una variable es una medida de la dispersión. Corresponde al promedio del cuadrado de la distancia de los distintos valores de la variable con respecto a su media.

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^{N} (Y_i - \overline{Y})^2}{N-1} \qquad (6.4)$$

Error estándar de la media (SE); está relacionado a la desviación estándar y el número de los casos con los cuales se trabaja. Su fórmula es:

$$SE = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \qquad (6.5)$$

Intervalos de confianza; es siempre aconsejable que un analista determine los intervalos de confianza de los parámetros que determina. Los intervalos de confianza dan información sobre la precisión de los cálculos realizados. Habitualmente se utiliza el intervalo de confianza a dos colas, es decir el que precisa el límite superior e inferior. Se calcula con la siguiente formula utilizando la media $\overline{Y}$:

$$\overline{Y} \pm t_{\alpha/2,n-1} \cdot \sqrt{\frac{\sigma^2}{N}} \qquad (6.6)$$

donde:

$t_{\alpha/2,n-1}$ = el estadístico **t** de Student de nivel de confianza α/2 y de n-1 grados de libertad del sistema.

Grados de libertad (gl); se usan para estimar el número de categorías independientes en un test o experimento. Por ejemplo, en la expresión A+B=0, A y B son funciones dependientes, ya que al fijar el valor de uno de ellos se está

fijando el valor del otro. Así, cuando “n” medidas se expresan como desviaciones de la media muestral, todas las medidas menos una pueden variar libremente si colocamos la restricción sobre los datos de que la suma de desviaciones debe ser igual a cero. Los gl se calculan como:

$$gl=n-r \qquad (6.7)$$

donde:

n= el número de sujetos en la muestra

r= el número de sujetos estadísticamente dependientes.

6.1.2 Significancia estadística

Un resultado se denomina estadísticamente significativo cuando no es probable que haya sido debido al azar. Una "diferencia estadísticamente significativa" significa que hay evidencias estadísticas de que hay una diferencia. El nivel de significación muchas veces se asocia con los test a los cuales se someten los datos con fin de verificar una hipótesis. En cuanto al test de la hipótesis nula, el nivel de significación es nada más que la probabilidad de tomar la decisión de rechazar la hipótesis nula cuando ella es verdad (cometiendo el error tipo I o α) o de aceptar la hipótesis nula cuando la última no es cierta (cometiendo el error tipo II o β). En la toma de esa decisión muchas veces se usa el valor P donde P= 1-α. Entonces el valor experimental se compara con el valor correspondiente a la tabla (para dado nivel de significación y dados grados de libertad). Si el valor experimental es superior al número de la tabla, la hipótesis nula se rechaza, en cambio, al ser superior el número de la tabla la hipótesis nula se tiene que aceptar para dado nivel de significación. Cuanto mayor sea el valor experimental, más significativo será el resultado y más fuerte será la evidencia de que el resultado no se debe a una mera coincidencia. El nivel de significación es comúnmente representado por el símbolo griego α (alpha). Cuando se hacen este tipo de comparaciones es importante tener en cuenta si el ensayo es unilateral o

bilateral. Por ejemplo si el ensayo es unilateral y se trabaja en un nivel de significación α = 0,05 en realidad 5 valores en cada cien se pueden dar por azar y entonces la probabilidad de que sean no debidos al azar es P= 1-0,05=0,95. Si en cambio, el ensayo es bilateral en el mismo caso P= 1-2α = 0,90.

En muchos trabajos el nivel de significación se denota con una, dos o tres estrellitas. Existen tres niveles; cuando $P \geq 0,95$ ($\alpha \leq 0,05$); $P \geq 0,99$ ($\alpha \leq 0,01$) y $P \geq 0,999$ ($\alpha \leq 0,001$) cuya mención indica la significación de las conclusiones que se formulan. Cuando el valor experimental obtenido es inferior al tabulado se concluye que "no hay significación" y se indica con (-) o (NS); cuando dicho valor supera al valor tabulado para $P \leq 0,95$ y no al tabulado para $P \geq 0,99$ se indica con (*); si el valor experimental es mayor que el tabulado para $P \geq 0,99$ la conclusión es (**) y para $P \geq 0,999$ (***). Cuando:

VE < VT	(NS)/(-)
VE> VT (P 0,95)	*
VE > VT (P 0,99)	**
VE > VT (P 0,999)	***

Siendo VE= valor experimental; VT= valor tabulado

Generalmente, en el caso de los alimentos los niveles (*) y (**) se consideran suficientes.

6.2 Análisis de varianza (ANOVA)

Análisis de varianza (ANOVA) compara las medias de varias muestras y verifica si todas ellas pertenecen a la misma población, o si una o más son significativamente diferentes y provienen de poblaciones diferentes.

La variación total que existe en una distribución global de valores o medidas puede ser segregada en categorías representando por un lado los efectos identificables y por otro lado la variación debida a causas no identificables. La variación total del conjunto de datos es llamada ***Suma de Cuadrados Totales*** **(SST)**. Dicha suma puede dividirse en dos contribuciones: una **Suma de**

Cuadrados debida a la Regresión (SSR) y una **Suma de Cuadrados Residual (SSE).**

Suma de Cuadrados Totales (SST) se obtiene sumando los cuadrados de las desviaciones del valor observado en cada sistema Yi respecto de la media $\overline{Y}$.

$$SST = \sum_{i=1}^{N} \left(Y_i - \overline{Y}\right)^2 \qquad (6.8)$$

La SST tiene asociados N-1 grados de libertad ya que existe la restricción

$$\sum_{i=1}^{N} Y_i - \overline{Y} = 0 \qquad (6.9)$$

Suma de Cuadrados debida a la Regresión (SSR) es una expresión de la variación que resulta tomando en cuenta por un lado la relación de la variable independiente con la dependiente a partir del modelo de regresión aplicado y por otro lado la medición de la variable dependiente que se obtiene experimentalmente. En otras palabras es la suma para N elementos de la población de los cuadrados de la diferencia entre la media $\overline{Y}$ muestral y el valor predicho del modelo $\hat{Y}_i$ para una corrida i.

$$SSR = \sum \left(\hat{Y}_i - \overline{Y}\right)^2 \qquad (6.10)$$

Los grados de libertad en este caso se definen a partir del número de parámetros p que usa el modelo para relacionar la variable medida y las variables independientes del experimento. Esta suma de cuadrados tiene asociados p-1 grados de libertad.

Dividiendo la SSR por p-1 obtenemos la Media de Cuadrados debida a la Regresión (MSR):

$$\mathrm{MSR} = \frac{\mathrm{SSR}}{\mathrm{p}-1}$$

(6.11)

Suma de Cuadrados Residual (SSE) es la variación debida a causas no identificables y representa el error observado de las variables medidas (dado que el modelo es correcto). Se define como la suma de los cuadrados de las diferencias entre los valores medidos de N elementos de la población y los valores de los mismos elementos tal como son predichos por el modelo.

$$SSE = \sum_{i=1}^{N} \left(Y_i - \hat{Y}_i \right)^2 = \sum_{i=1}^{N} r_i^2 \qquad (6.12)$$

En el caso de la Suma de Cuadrados Residual se asocian N-p grados de libertad.

La SSE se usa para calcular la Media de Cuadrados Residual (MSE) al dividirla por los grados de libertad asociados a ella, según la siguiente fórmula:

$$MSE = \frac{SSE}{N - p} \qquad (6.13)$$

Los residuales se usan para evaluar el ajuste del modelo a los valores experimentales. La suma de los residuales de cada corrida teóricamente es siempre cero, sin embargo, en la práctica puede no serlo exactamente pero debería aproximarse.

Modelo de los parámetros de un ANOVA

Fuente	*gl*	*Suma de Cuadrados*	*Media de cuadrados*
DEBIDO A LA REGRESIÓN	p-1	SSR	$MSR = \frac{SSR}{p-1}$
RESIDUAL	N-p	SSE	$MSE = \frac{SSE}{N-p}$
TOTAL	N-1	SST	

6.2.1 Test F de significación de la regresión

Un test que comúnmente se realiza para verificar la significancia de la regresión es el test F. Si el valor calculado de $F > F_{tablas}$ nos permite inferir que la variación de la información explicada por el modelo o relación propuestos es significativamente mayor que la variación debida a causas no identificables (residuales) y que el efecto observado no se debió al azar.

Según el test F, la hipótesis nula propone que todos los parámetros son nulos mientras que la hipótesis alternativa nos dice que al menos un parámetro es diferente al cero.

$$H_o = \beta_1 = \beta_2 = \ldots = \beta_k = 0$$

H_a por lo menos un parámetro $\beta_j \neq 0$

Si la hipótesis nula es verdad ($\beta_j = 0$), el valor del estadístico F sigue una distribución con (p-1) y (N-p) grados de libertad en el numerador y denominador de la expresión respectivamente:

$$F = \frac{MSR}{MSE} = \frac{SSR/(p-1)}{SSE/(N-p)} \qquad (6.14)$$

Una vez calculado el F se busca en las correspondientes tablas el valor de F para el nivel de significación con el cual se trabaja para grados de libertad p-1 y N-1.

El F de las tablas se compara con el F calculado. Si el valor del F calculado es mayor que el de las tablas la hipótesis nula se rechaza para α nivel de significación, y significa que por lo menos un parámetro de los que describen la regresión tiene efecto sobre la respuesta. Cuanto más grande sea el F calculado mejor describirá la regresión el modelo propuesto ya que también significa que aumenta la razón de la varianza debida a la regresión sobre la varianza debida a causas no identificables.

6.3 Coeficiente de determinación (R^2)

El coeficiente de determinación nos informa sobre la proporción de la variación que existe entre los valores experimentales y lo propuesto por el modelo. Es un estadístico que evalúa cuán bien se ajusta el modelo estadístico aplicado. En la regresión, en particular, el coeficiente de determinación es una medida de cuánto la línea de regresión se aproxima a los datos experimentales. Su expresión porcentual se da por la fórmula:

$$R^2 = \frac{SSR}{SST} \cdot 100 \qquad (6.15)$$

También se usa el coeficiente de determinación ajustado por los grados de libertad del modelo:

$$R^2_{aj} = 1 - \frac{SSE/(N-p)}{SST/(N-1)} \qquad (6.16)$$

Siempre se busca que tanto R^2 como R^2_{adj} se acerquen lo más posible al 100 ya que es una medida del ajuste del modelo. Cabe añadir que por mucho que se acerque el coeficiente de determinación al cien nunca lo será, ya que en este caso se trabajaría sin error.

Otros criterios para la comparación de modelos alternativos de regresión no buscan que la raíz cuadrada de los cuadrados medios del error (RMSE) sea lo menor posible, que el número de parámetros del modelo sea lo menor posible (principio de simplicidad), que el error estándar de las estimaciones de los parámetros sea lo más pequeño posible y que los coeficientes estimados no se encuentren altamente correlacionados (Di Rienzo y col., 2008).

El RMSE, mide la desviación media entre los valores observados y los predichos, mientras que los criterios de Akaike (AIC) y Bayesiano (BIC) son empleados para detectar la sobreestimación de los modelos. De acuerdo a las teorías del criterio de Akaike y el Bayesiano, el modelo más adecuado y parsimonioso conlleva los valores más pequeños de AIC y BIC (Quinn y Keough, 2002). Ambos criterios están muy relacionados y si bien ambos miden la eficiencia del modelo en predecir los datos, el criterio de BIC es un poco más conservativo ya que en este caso el término de penalización es más largo. Las correspondientes ecuaciones se detallan a continuación.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum\left(\mu_{observedos} - \mu_{predichos}\right)^2}{n}} \qquad (6.17)$$

$$AIC = N\left[ln\left(\frac{2\pi\sigma^2}{N} \right) + 1 \right] + 2 \qquad (6.18)$$

$$BIC = N\left[ln\left(\frac{2\pi\sigma^2}{N} \right) + 1 \right] + P \cdot ln(N) \qquad (6.19)$$

donde, N es el número de observaciones; μ es el valor respuesta; *P* es el número de parámetros del modelo; σ^2 es la varianza calculada a partir de los cuadrados medios del error (CM); *SSE* corresponde a la suma de cuadrados residual; *SST* es la suma de cuadrados totales y *p* es el número de parámetros del modelo.

6.4 Análisis de residuales

En el análisis de los residuales siempre se asume que los errores:

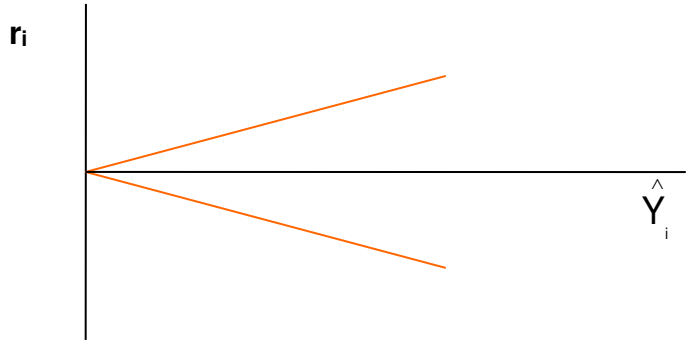
- son normalmente distribuidos con media igual a cero
- tienen varianza constante
- son independientes entre ellos

Existen herramientas gráficas y pruebas estadísticas que se usan con el fin de comprobar la validez de las suposiciones recién mencionadas.

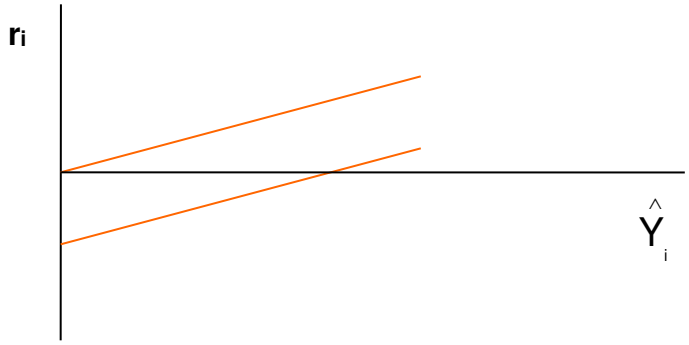
6.4.1 **Versus valores predichos,** $\hat{Y}_i$

Se grafican los valores de los residuales (r_i) versus los valores predichos por el modelo. Dichos residuales no se grafican en función de los valores observados (Y_i) debido a que ambos grupos de valores están correlacionados. Debe observarse una distribución uniforme horizontal de los residuales en torno a los valores predichos, $\hat{Y}_i$ (homocedasticidad). Pueden manifestarse algunos comportamientos anormales tales como los que se describen a continuación.

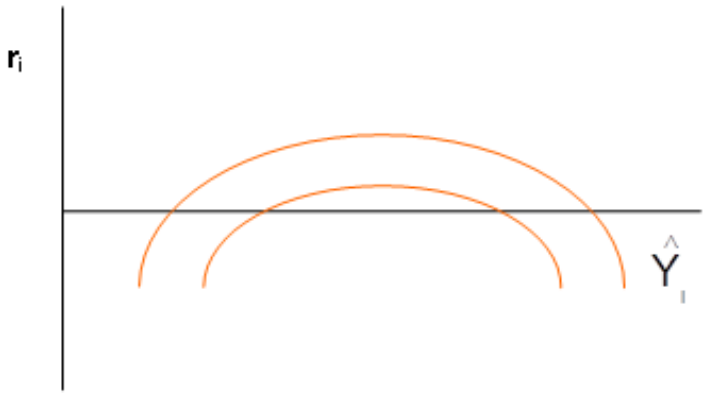
- Si la varianza del modelo no es constante y se incrementa, es necesario realizar un análisis de cuadrados mínimos especial o bien una transformación (Ln (Y); $\sqrt{Y}$; 1/Y; etc.) en la respuesta de interés:



- Si el término independiente β_0 no fue incluido en el análisis, la banda se desplaza:



- Si falta incluir algunos términos lineales y/o cuadráticos en el modelo postulado la banda se curva:



Estas desviaciones, además de detectarse visualmente, pueden medirse mediante parámetros definidos, los cuales no se detallarán en este apéndice (Draper, 1963).

6.5 Métodos de comparaciones múltiples por mínima diferencia significativa

Un análisis de varianza solo informa si existen diferencias entre medias pero no informa acerca de cuáles medias son las que difieren. Una vez que el ANOVA ha demostrado, mediante el test F, que existen diferencias significativas se recurre a los test de comparaciones múltiples (Zar, 1999).

Cuando se desean hacer comparaciones entre las medias desarrolladas en un experimento que involucra más de dos muestras se origina un problema porque se alteran las probabilidades. A medida que aumenta el número de medias, aumenta la probabilidad que la diferencia entre las medias mayor y menor sea igualada o excedida solamente por el azar.

Todos los procedimientos de comparaciones múltiples se basan en calcular un rango el cual es comparado con la diferencia entre medias. Si el rango es mayor, no existe diferencia significativa entre las medias.

La diferencia entre los mismos reside en como calcular el rango crítico y de ello resultan procedimientos más o menos conservativos y poderosos, según determinen rangos críticos más o menos estrechos. Algunos de ellos se enumeran aquí, de más a menos conservadores (O´Mahony, 1986):

- Test Sheffé
- Test Tukey (HSD)
- Test Newman-Keuls
- Test de rango múltiple de Duncan
- Test Fisher (MDS)
- Test de Dunnett

Se describirán los test que se utilizaron en esta tesis.

6.5.1 Mínima diferencia significativa de Fisher (MDS)

Es un test muy potente ya que de todos los test de comparaciones múltiples es el que determina el rango más estrecho de valores, hecho que facilita encontrar diferentes a dos medias, resultando ser uno de los test menos conservativo. Debe utilizarse para comparar pocas medias ya que como es realmente un test t-Student modificado existe el riesgo de cometer error tipo I. Antes de ser aplicado debe verificarse que existan diferencias significativas entre medias mediante test F de un ANOVA.

Se calcula:

$$MDS = t_{\alpha/2,glE} \cdot \sqrt{\frac{2MSE}{n}} \qquad (6.20)$$

donde:

$t_{\alpha/2,\ glE}$= mayor $\alpha/2$ por ciento de puntos que siguen la distribución t-Student con glE grados de libertad.

glE = grados de liberad del residual obtenido en ANOVA.

n = número de medidas.

Cualquier par de medias cuya diferencia exceda a dicho valor para α-nivel de significación es considerado estadísticamente diferente.

6.5.2 Test de Dunnett

El test de Dunnett se aplica al caso especial donde uno de los tratamientos es un control y se desea saber cuál de las muestras difiere significativamente respecto del control.

Se desea comparar las medias de varios grupos de tratamientos con la media de un grupo control.

Define un estadístico $d = d(\alpha; \Phi_{error}; k-1)$

$$\Delta_{Dunnett} = d\,(\alpha, \Phi_{error}).\ S_{error}.\ (2/n)^{1/2} \qquad (6.21)$$

La **Tabla 6.3** muestra los valores de d para α nivel de significación, υ grados de libertad del error (ϕerror) y k tratamientos, siendo s= $\sqrt{}$MSE y n = número de comparaciones.

H_0: $\tilde{y}_i = \tilde{y}_{control}$ para i ≠ control

H_1: $\tilde{y}_i \neq \tilde{y}_{control}$

Si $\left|\tilde{y}_i - \tilde{y}_{control}\right| \geq \Delta_{Dunnett} \longrightarrow$ las medias difieren al nivel de significación α

Tabla 6.3 Valoras críticos del test de Dunnett

α = 0,10

K / f	1	2	3	4	5	6	8	10	12	15	20
3	2,35	2,91	3,23	3,45	3,62	3,76	3,96	4,12	4,24	4,39	4,58
4	2,13	2,60	2,86	3,05	3,19	3,30	3,47	3,60	3,70	3,82	3,98
5	2,02	2,43	2,67	2,83	2,96	3,06	3,21	3,32	3,42	3,52	3,66
6	1,94	2,33	2,55	2,70	2,82	2,91	3,05	3,15	3,24	3,34	3,47
7	1,90	2,26	2,47	2,61	2,72	2,81	2,94	3,04	3,12	3,22	3,34
8	1,86	2,22	2,41	2,55	2,65	2,73	2,86	2,96	3,03	3,12	3,24
9	1,83	2,18	2,37	2,50	2,60	2,68	2,80	2,89	2,97	3,06	3,17
10	1,81	2,15	2,34	2,46	2,56	2,64	2,76	2,84	2,92	3,00	3,11
11	1,80	2,13	2,31	2,43	2,53	2,60	2,72	2,81	2,88	2,95	3,06
12	1,78	2,11	2,29	2,41	2,50	2,57	2,69	2,77	2,84	2,92	3,03
15	1,75	2,07	2,24	2,36	2,44	2,51	2,62	2,70	2,77	2,85	2,95
20	1,73	2,03	2,19	2,30	2,39	2,46	2,56	2,64	2,70	2,77	2,87
25	1,71	2,00	2,17	2,27	2,36	2,42	2,52	2,60	2,66	2,73	2,82
30	1,70	1,99	2,15	2,25	2,34	2,40	2,50	2,57	2,63	2,70	2,79
40	1,68	1,97	2,12	2,23	2,31	2,37	2,47	2,54	2,60	2,67	2,75
60	1,67	1,95	2,10	2,21	2,28	2,34	2,44	2,51	2,57	2,63	2,72
∞	1,65	1,91	2,06	2,16	2,23	2,29	2,38	2,45	2,51	2,58	2,67

α = 0,05

K / f	1	2	3	4	5	6	8	10	12	15	20
3	3,18	3,87	4,26	4,54	4,75	4,92	5,18	5,37	5,53	5,72	5,95
4	2,78	3,31	3,62	3,83	4,00	4,13	4,33	4,48	4,61	4,75	4,94
5	2,57	3,03	3,29	3,48	3,62	3,73	3,90	4,03	4,14	4,26	4,42
6	2,45	2,86	3,10	3,26	3,39	3,49	3,64	3,76	3,86	3,97	4,11
7	2,36	2,75	2,97	3,12	3,24	3,33	3,47	3,58	3,67	3,78	3,91
8	2,31	2,67	2,88	3,02	3,13	3,22	3,35	3,46	3,54	3,64	3,76
9	2,26	2,61	2,81	2,95	3,05	3,14	3,26	3,36	3,44	3,53	3,65
10	2,23	2,57	2,76	2,89	2,99	3,07	3,19	3,29	3,36	3,45	3,57
11	2,20	2,53	2,72	2,84	2,94	3,02	3,14	3,23	3,30	3,39	3,50
12	2,18	2,50	2,68	2,81	2,90	2,98	3,09	3,18	3,25	3,34	3,45
15	2,13	2,44	2,61	2,73	2,82	2,89	3,00	3,08	3,15	3,23	3,33
20	2,09	2,38	2,54	2,65	2,73	2,80	2,90	2,98	3,05	3,12	3,22
25	2,06	2,34	2,50	2,61	2,69	2,75	2,85	2,93	2,99	3,06	3,15
30	2,04	2,32	2,47	2,58	2,66	2,72	2,82	2,89	2,95	3,02	3,11
40	2,02	2,29	2,44	2,54	2,62	2,68	2,77	2,85	2,90	2,97	3,06
60	2,00	2,27	2,41	2,51	2,58	2,64	2,73	2,80	2,86	2,92	3,00
∞	1,96	2,21	2,35	2,44	2,51	2,57	2,65	2,72	2,77	2,83	2,91

6.1 Regresión múltiple/Método de superficies de respuesta

El análisis de la varianza es una herramienta básica y de uso muy extendido para el planteo de modelos matemáticos que vinculan una variable medible (variable de respuesta) con los factores experimentales (variables independientes), los cuales resultan preponderantes en el comportamiento de dicha variable.

De hecho puede existir una relación funcional simple entre las variables, tal como ocurre en algunos sistemas físicos, por ello no constituye la generalidad. La relación entre las variables suele ser complicada como para ser explicada en términos sencillos. En este caso se debe aproximar esa relación a alguna función matemática simple, tal como una relación polinomial, que contenga las variables apropiadas (de las cuales se sospecha que influyen en mayor grado a la respuesta) y se aproxime lo mejor posible a una función real, en un determinado rango de las variables en estudio. Esto sólo es posible mediante un análisis de varianza.

Los factores antes mencionados son las condiciones de proceso o variables independientes cuyos valores o niveles son controlados en la experiencia. Se eligen presumiendo que los mismos afectan en mayor medida a la variable de interés. Los niveles de los factores elegidos se seleccionan para realizar la experiencia, teniendo en consideración el proceso en estudio. Los factores se denotan generalmente como X_1, X_2,...X_k, siendo k: número de variables independientes, designadas en forma genérica como X_μ.

La respuesta es una cantidad medible cuyo valor se asume que varía conforme cambian los niveles de los factores en estudio, es decir que existe una función φ de X_1, X_2,...X_k variables que genera el valor real de la respuesta (Ω) tal que:

$$\Omega = \varphi\ (X_1, X_2,...,X_k) \qquad (6.22)$$

φ es una función continua de X_μ y puede ser aproximada a una función polinomial (por expresión de series de Taylor).

La forma exacta de φ es generalmente desconocida y se aproxima por una ecuación polinomial o algún tipo de modelo empírico. Los pasos para aproximar el modelo consisten en:

1°) Asumir una forma de modelo que involucre a X_1, X_2,...,X_k factores. En ausencia de suficiente conocimiento de la forma en que varía la respuesta, en general se comienza postulando un modelo de primer orden en función de k variables. Pero si el mismo sufre falta de ajuste debido a una curvatura en la superficie de respuesta se agregan términos de órdenes mayores. El modelo siguiente a ensayar es un modelo de segundo orden:

$$Yi = \beta o + \sum_{\mu=1}^{k} \beta_\mu X_\mu + \sum_{\mu=1}^{k} \beta_{\mu\mu} X_\mu^2 + \sum_{\mu=1}^{k} \sum_{j=\mu+1}^{k} \beta_{\mu j} X_\mu X_j + \varepsilon_i \qquad (6.23)$$

donde,

Y_i= valor de la variable respuesta

$X_{\mu j}$= variables independientes (μ, j= 1…k).

ε_i= error experimental en la corrida i.

β_o= término constante

β_μ, $\beta_{\mu\mu}$ y $\beta_{\mu j}$ = coeficientes regresionales

Los parámetros β_μ, $\beta_{\mu\mu}$ y $\beta_{\mu j}$ son llamados coeficientes regresionales y son determinados por cuadrados mínimos. La suma de cuadrados de las desviaciones respecto de la recta real será:

$$S= \sum_{i=1}^{N} \varepsilon i^2 \qquad (6.24)$$

donde ε_i se despeja a partir de la **ecuación 6.23**. De esta forma, se eligen los estimadores de los coeficientes regresionales de manera de minimizar S.

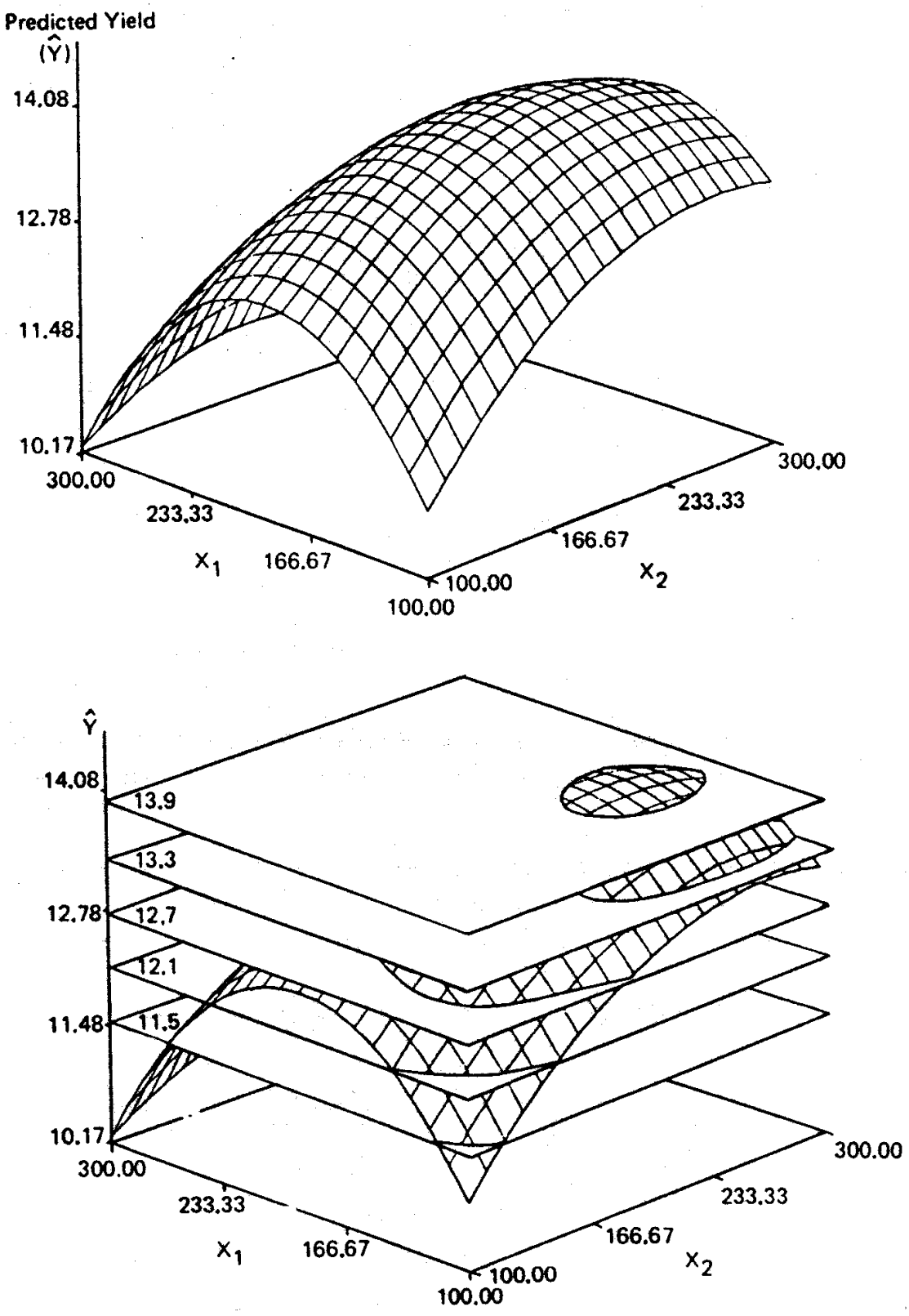
2°) En asociación con el modelo propuesto seleccionar combinaciones de los niveles de los factores involucrados y para cada combinación medir la respuesta deseada.

3°) Las mediciones de la respuesta son utilizadas en un análisis de regresión para obtener los estimadores de los parámetros del modelo propuesto y también obtener un estimador de la varianza del error experimental.

4°) Aplicar tests sobre las magnitudes de los estimadores y sobre el ajuste del modelo mismo.

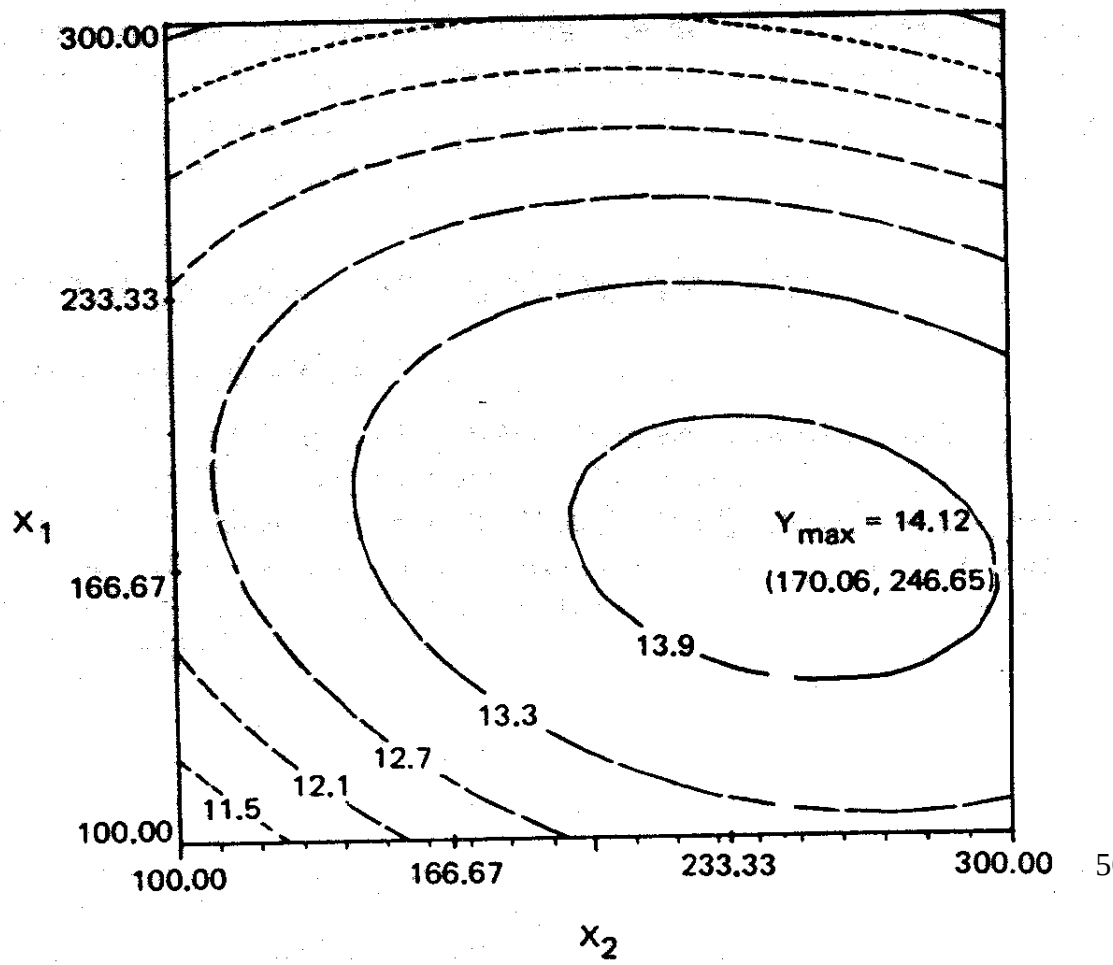
Con la utilización de “k” factores se genera una superficie de respuesta Y en un espacio k+1 dimensional. Así por ejemplo, si se consideran tres variables independientes es posible generar una superficie en función de dos de ellas (las de mayor significación), mientras la tercera variable permanece constante a distintos niveles preseleccionados. La **Figura 6.1** muestra un ejemplo de dicha superficie.

Figura 6.1. Superficie de respuesta y obtención de gráficos de contorno a partir de la misma.



Otra forma de visualizar la información es a través de los **gráficos de contorno**, construidos a partir de la superficie de respuesta correspondiente. En los mismos, se dibujan líneas o curvas de Y constante en un plano cuyas coordenadas representan los niveles X_1 y X_2. Cada contorno es una proyección en el plano X_1 X_2 de una sección transversal de la superficie de respuesta y representa infinitas combinaciones de X_1 y X_2 que generan el mismo valor de Y. Es posible localizar en estos gráficos zonas de mínima (o máxima) respuesta, es decir, la combinación de X_1 y X_2 que genera un valor mínimo (o máximo) de la variable dependiente de interés. La **Figura 6.2** muestra claramente los "cortes" en la superficie que generan gráficos de contorno. Todos los resultados obtenidos mediante este análisis se limitan a una región de interés o región experimental (ξ) totalmente contenida dentro de una región de operación y la extensión de dichos resultados fuera de la zona de interés puede resultar arriesgado.

Figura 6.2. Gráficos de contorno obtenidos a partir de una superficie de respuesta.



6.1.1 Selección de la mejor ecuación de regresión

En general existe una situación de compromiso entre seleccionar la mayor cantidad de variables y/o combinaciones de ellas que generen una ecuación lo más útil posible con fines predictivos e involucrar el menor número de variables por la labor requerida para obtener información de las mismas.

Existen varios métodos para seleccionar la mejor ecuación de regresión. Aquí se menciona el *Método de Eliminación Retrospectiva*, el cual tiende a eliminar todas las variables innecesarias sin incrementar sustancialmente el valor estimado de la varianza, s^2. Los pasos básicos de este método son:

- Se computa una ecuación de regresión que contenga todas las variables.
- Se realiza un test F-parcial para cada parámetro considerando que el mismo fue incorporado al modelo en último lugar.
- Se selecciona el menor valor de los F-parciales obtenidos y se compara con un F_o para un nivel de significación especificado.
- Si $F<F_o$ se remueve el parámetro en cuestión y se realiza una nueva regresión con los parámetros restantes. Si $F>F_o$ se adopta la ecuación tal como se planteó.

6.2 Análisis multivariado

El análisis multivariado involucra una serie de técnicas de análisis apropiadas para tablas de datos que contienen dos o más variables (V_j) respuesta por cada caso (observaciones o individuos) como se ilustra en la **Tabla 6.1**. Cuando se tienen 2 variables aleatorias (por ejemplo altura y peso) registradas sobre cada uno de los individuos se puede hacer una representación gráfica de las observaciones bivariadas. Sin embargo, cuando más de tres variables son relevadas para cada caso la visualización directa de las observaciones no es posible, por ello se utilizan técnicas de reducción de dimensión (Di Rienzo y col., 2008). Luego, la organización de datos para un análisis multivariado se realiza en

forma de una matriz con *n* filas (casos) conteniendo las *p* características (variables) registradas sobre un mismo individuo (datos de *p* variables observadas en cada uno de *n* casos, se colectan en una matriz **X**, *n* x *p*).

Tabla 6.1. Organización de datos para análisis multivariado.

Individuos	V_1	V_2	V_j	V_p
1	X_{11}	X_{12}	X_{1j}	X_{1p}
2	X_{21}	X_{22}	X_{2j}	X_{2p}
…	…	…	…	…
n	X_{n1}	X_{n2}	X_{nj}	X_{np}

6.2.1 Análisis de la varianza multivariado

El análisis de la varianza multivariado (MANOVA) examina la relación entre más de una variable dependiente cuantitativa Y en función de una o más variables independientes X medidas sobre una misma unidad experimental. El objetivo consiste en comparar la respuesta multivariada entre los grupos. El análisis si los centroides poblacionales (medias poblacionales de las p variables o medias multivariadas) de los k grupos son iguales o no ente sí. Si bien existen 4 estadísticos para evaluar la significación, en la presente tesis se utilizó el test de Hotelling corregido por Bonferroni. No se aconseja aplicar múltiples ANOVAs univariados (por separado) dado que en ese caso aumenta la tasa de error global (error de tipo I) y además, el MANOVA permite analizar las asociaciones entre las variables respuesta y detectar diferencias que en el caso de aplicar ANOVA no se visualizarían.

6.2.2 Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (PCA) permite analizar la interdependencia de variables métricas y encontrar una representación gráfica óptima de la variabilidad de los datos de una tabla de *n* observaciones y *p*

columnas o variables. El PCA trata de encontrar, con pérdida mínima de información, un nuevo conjunto de variables (componentes principales, CP) no correlacionadas que expliquen la estructura de variación en las filas de la tabla de datos.

La j-ésima componente principal (CP_j) es algebraicamente una combinación lineal de las *p* variables originales obtenida como $Y_j = \mathbf{e}_j \mathbf{X} = e_{1j} X_1 + e_{2j} X_2 + ... + e_{pj} X_p$ con $j=1,...,p$ donde $\mathbf{e}_j$ representa el j-ésimo autovector. Las nuevas variables, CP, usan información contenida en cada una de las variables originales, algunas variables pueden contribuir más a la combinación lineal que otras, por lo que los autovectores representan el peso de cada variable en la combinación lineal para cada componente (Di Rienzo y col., 2008). Cuanto mayor sea el módulo del coeficiente, mayor es la contribución de la variable para ese componente. La carga o loading de un componente representa las correlaciones de Pearson entre los componentes y las variables originales. Se consideran que tienen mayor peso aquellos loadings cuyo módulo es mayor a 0,5, mientras que el signo indica si la correlación con la variable ortogonal es positiva o negativa (Quinn y Keough, 2002). Los loadings y los coeficientes de los autovectores muestran un patrón similar aunque difieren en sus valores. La interpretación de la correlación es más confiable que la interpretación de los coeficientes que conforman los autovectores, ya que la correlación tiene en cuenta diferencias en las varianzas de las variables originales y consecuentemente elimina el sesgo de interpretaciones causadas por diferentes escalas de medición (Di Rienzo y col., 2008).

La proporción de la variabilidad explicada por cada uno de los CP viene dada por los autovalores, λ. La varianza de la j-ésima componente principal es $Var(Y_j) = e_j \sum e_j = \lambda_j$ donde el j-ésimo λ es el autovalor asociado al j-ésimo autovector (Di Rienzo y col., 2008).

7. Bibliografía

7 Bibliografía

Agencia de Protección de la Salud (1999). Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods. London: Health Protection Agency. Available at: http://www.salford.gov.uk/d/Ready_to_Eat_Food_Guidelines_Dec_09_HPA.pdf.

Aguiló-Aguayó, I., Soliva-Fortuny, R., y Martín-Belloso, O. (2012). High-intensity pulsed electric field applications in fruit processing. En: S. Rodigues y F. Fernandes (Eds.). *Advances in fruit processing technologies*. CRC press Taylor y Francis Group, Florida, EE.UU., pp. 149-184.

Akaike, H. (1973). Proceedings of the 2nd International Symposium of Information. En: B.N. Petrov, y F. Cza'ki (Eds.)**.** *Information theory and extension of the maximum likelihood principle.* Akademiai Kiado, Budapest, pp. 267–281.

Alimentos argentinos (2008). Manzana y pera, pp. 19-24. http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/revista/ediciones/47/cadenas/r47_05_ManzanaPera.pdf

Alzamora, S.M., Cerrutti, P., Guerrero, S., y López-Malo, A. (1995). Minimally processed fruits by combined methods. p 463-493. En: J. Welti Chanes y G. Barbosa Cánovas (Eds.). *Food Preservation by Moisture Control. Fundamentals and Applications*. ISOPOW Practicum II. Technomic Pub. Co., ISBN 1-56676-358-4, Technomic, Lancaster, EE.UU.

Alzamora, S.M., Guerrero, S.N., Nieto, A.B., y Vidales, S. (2004). Conservación De Frutas y Hortalizas Mediante Tecnologías Combinadas .Manual de Capacitación. Revisado y refereado por Danilo Mejía (AGST officer). *67 p.*

Publishing and Multimedia Service, Information Division, Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO de N.U.), Roma, Italia.

Alzamora, S.M., Guerrero, S., Viollaz, P., y Welti, J. (2005a). Novel Food Processing. En: G. Barbosa-Cánovas (Eds.). *Experimental protocols for modeling the response of microbial populations exposed to emerging technologies: Some points of* concern. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 591-607.

Alzamora, S.M., Guerrero, S., López-Malo A., Welti-Chanes, J. Palou, E., y Argaiz, A. (2005b). Combined preservation techniques for fresh fruits. En: W. Jongen (Ed.). *Improving the Safety of Fresh Fruits and Vegetables*, WoodHead Publishing Limited Cambridge, England y CRC Press LLC, Florida, EE.UU., pp 599-630.

Alzamora, S.M., Guerrero, S., Schenk, S., Raffellini, S. y López-Malo, A. (2011). Inactivation of microorganisms. En: H. Feng, G. Barbosa-Canovas, J. Weiss (Eds.). *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Springer, New York, pp. 321-343.

Alzamora, S.M., Guerrero, S., Raffellini, S., Ferrario, M. y Schenk, M. (2015). Hurdle technology in fruit processing. En: S. Pareek. (Ed.). *Advances in Postharvest Biology and Technology of Horticultural Crops*. Apple Academic Press, Canadá y CRC Press: Taylor and Francis Group, Florida, EE.UU, pp. 102-131.

Alzamora, S.M., López-Malo, A., Tapia de Daza, M.S., y Guerrero, S.N. (2015). The hurdle concept in fruit processing. En: A. Rosenthal, R. Deliza, G. Barbosa-Cánovas y J. Welti-Chanes (Eds.). *Fruit Preservation: Novel and Conventional Technologies*. Springer-Verlag New York, EE.UU, pp 555.

Ananta, E., Voigt, D., Heinz. V., y Knorr, D. (2005). Cellular injuries upon exposure of *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* to high-intensity ultrasound. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 271-278.

Anderson, J.G., Rowan, N.J., MacGregor, S.J., Fouracre, R.A., y Farish, O. (2000). Inactivation of food-borne enteropathogenic bacteria and spoilage fungi using pulsed-light. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 28, 83-88.

Arias, C., Burns, J., Friedrich, L., Goodrich, R., y Parish, M.. (2002). Yeast species associated with orange juice: evaluation of different identification methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1955–1961.

Aronsson, K., Rönner, U., y Borch, E. (2005). Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to membrane permeabilization and subsequent leakage of intracellular compounds due to pulsed electric field processing. *International Journal of Food Microbiology,* 99, 19-32.

ASTM. (1981). Correlating sensory objective measurements. ASTM, EE.UU.

Awad, T., Moharram, H.A., Shaltout, O.E., Asker, D., y Youssef, M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: a review. *Food Research International*, 48, 410-427

Baranyi, J., y Roberts, T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277-294.

Barth, M., Hanckinson, T., Zhuang, H., Breidt, F. (2009). Microbiological spoilage of fruits and vegetables. En *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages*. W. Sperber y M.P. Doyle (Eds.). Springer, New York, EE.UU., pp. 135-183.

Baumann, A.R., Martin, S.E., Feng, H. (2005). Power ultrasound treatment of Listeria monocytogenes in apple cider. *Journal of Food Protection*, 68, 2333-2340.

Bagheri, M., y Mohseni, M. (2015). Impact of hydrodynamics on pollutant degradation and energy efficiency of VUV/UV and H2O2/UV oxidation processes. *Journal of Environmental Management*, 164, 114-120.

Behnajady, M.,Vahid, B., Modirshahla, N., y Shokri, M. (2009). Evaluation of electrical energy per order (EEO) with kinetic modeling on the removal of Malachite Green by US/UV/H2O2 process. *Desalination*, 249, 99-103.

Beltrán, D., Selma, M., Tudela, J.A., y Gil, M. (2005). Effect of different sanitizers on microbial and sensory quality of fresh-cut potato strips stored under modified atmosphere or vacuum packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 37, 37-46.

Beuchat, L.R., y Ryu, J.H. (1997). Produce handling and processing practices. *Emergent Infection Diseases*, 3, 459-465.

Bevilacqua, A., Corbo, M.R., y Sinigaglia, M. (2010). Combining eugenol and cinnamaldehyde to control the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Control*, 21, 172-177.

Bialka, K., Demirci, A., y Puri, V. (2008). Modeling the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on raspberries resulting from exposure to ozone or pulsed UV-light. *Journal of Food Engineering*, 85, 444-449.

Bolondi, A., Gaggino, O., y Monesiglio, J. (1995). Microscopía electrónica. Técnicas generales, C.I.C.V., INTA, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina.

Bolton, J., Bircher, K., Tumas, W., y Tolman, C. (2001). Figures-of-merit for the technical development and application of advanced oxidation technologies for both electric- and solar-driven systems. *International Union of Pure and Applied Chemistry, 73*, 627-637.

Bozzola, J., y Russell, L. (1999). Electron Microscopy. Principles and Tecniques for Biologists. Jones and Bartlett Publishers, Londres, Reino Unido, pp. 2- 36.

Buchanan, R.L. (1995). The roles of microbiological criteria and risk assessment in HACCP. *Food Microbiology*, 12, 421-424.

Buchanan, R.L., y Whiting, R.C. (1996). Risk assessment and predictive microbiology. *Journal of Food Protection*, 59, 31-36.

Buchanan, R.L., y Phillips, J.G. (1990). Response surface model for predicting the effects of temperatura, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 35, 370-376.

Bunthof, C., Braak, S., Breeuwer, P., Rombouts, F., y Abee, T. (2000). Fluorescence assessment of *Lactococcus lactis* viability. *International Journal of Food Microbiology, 55*, *291–294*

Campos, M., Nebbi, F., Sarquis, M.A., y Ciani, R. (2006). Perfil de mercado de melón, situación nacional. Secretaría de Agricultura, ganadería, pesca y alimentos. Dirección de mercados alimentarios. Gacetilla informativa del sector agrolaimentario.

Carter, K., y Riskey, D. (1990). The role of sensory research in bringing a product to a market. *Food Technology*, 43, 160-162.

Ceballos Guzmán, C. (2010). Jugo de fruta argentinos. Informe frutihortícola, Semanario Rural. En: http://infofrut.com.ar/index.php?option=com_content&view=article&id=1133:jugo-de-fruta-argentinos&catid=7.

Cerf, O. (1977). Tailing of survival curves of bacterial spores. *Journal of Applied Microbiology*, 42, 1-19.

Chaine, A., Levy, C., Lacour, B., Riedel, C., y Carlin, F. (2012). Decontamination of sugar syrup by pulsed light. *Journal of Food Protection*, 75, 913-917.

Char, C., Guerrero, S., y Alzamora, S.M. (2009). Survival of *Listeria innocua* in thermally processed orange juice as affected by vanillin addition. *Food Control*, 20, 67-74.

Char, C., Mitilinaki, E., Guerrero, S., y Alzamora, S.M. (2010). Use of high intensity ultrasound and UV-C light to inactivate some microorganisms in fruit juices. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 797, 803.

Cheigh, C., Park, M., Chung, M., Shin, J., y Park, Y. (2012). Comparison of intense pulsed light- and ultraviolet (UVC)-induced cell damage in *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli O157:H7*. *Food Control*, 25, 654-659.

Choi, M., Cheigh C., Jeong E., Shin J., y Chung M. (2010). Nonthermal sterilization of *Listeria monocytogenes* in infant foods by intense pulsed-light treatment. *Journal of Food Engineering*, 97*,* 504-509.

CODEX Alimentarius. (2005). Norma general del codex para zumos (jugos) y néctares de frutas. Codex Stan 247-2005. En: www.codexalimentarius.org/input/download/standards/.../CXS_247s.pdf

Condón, S., Raso, J., y Pagán, R. (2005). Microbial Inactivation by Ultrasound, en: Barbosa-Cánovas, G., Tapia, M. y Cano, M.P. (Eds.), *Novel Food Processing Technologies,* CRC Press, Madrid, pp. 435-455.

Coroller, L., Leguerinel, I., Mettler, E., Savy, N., y Mafart, P. (2006). General model, based on a two mixed Weibull distributions of bacterial resistance, for describing various shapes of inactivation curves. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 6493-6502.

Corredig, M., Kerr, W., y Wicker, L. (2001). Particle size distribution of orange juice cloud after addition of sensitized pectin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 2523−2526.

Dansa, A. (2004). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Ministerio de Producción, República Argentina.

Davies-Colley, R.J., y Smith, D.G. (2001). Turbidity, suspended sediement, and water clarity: a review. *Journal of the American Water Resources Association*, 37, 1085-1101.

Deliza, R., Rosenthal, A., Abadio, F.B.D., Silva, C., y Castillo, C. (2005). Application of high pressure technology in the fruit juice processing: benefits perceived by consumers. *Journal of Food Engineering*, 67, 241-246.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., y Robledo C.W. (2008). *InfoStat, versión 2008,* Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Djas, M., Bober, M. y Henczka, M. (2011). New methods for inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice concentrate. *Challenges in Modern Techonology*, 2, 46-49.

Espinosa Manfugás, J. (2007). Evaluación Sensorial. J. Espinosa-Manfugás (Ed.). Editorial Universitaria, Ciudad de La Habana, Cuba.

Everitt, B.S., Landau, S., y Leese, M. (2001). Cluster Analysis. John Wiley & Sons, Oxford, Gran Bretaña.

Facultad de Agronomía, Universidad Nacional del Centro (FAA). (2010). Cultivo de frutilla: nuevas técnicas de cultivo y alternativas de procesado i y iii gama. En: http://www.faa.unicen.edu.ar/crescaa/Frutilla.pdf

FAO Agricultural Servicies Bulletin (2001). Unit operations applied to juice. En Principles and practices of small - and medium - scale fruit juice processing. R.P. Bates, J.R. Morris y P.G. Crandall (Eds.). Florida, EEUU. En: http://www.fao.org/docrep/005/y2515e/y2515e00.htm#toc

Famworth, E.R., Lagacé, M. Couture, R., Yaylayan, V., y Stewart, B. (2000). Thermal processing, storage conditions, and the composition and physical properties of orange juice. *Food Research International,* 34, 25–30.

FDA. (1996). Code of Federal Regulations. 21CFR179.41.

FDA. (1998). La FDA propone nuevas reglas para aumentar la seguridad de los jugos de frutas y vegetales. PB98-13. Oficina de Prensa Administración de Drogas y Alimentos. Departamento de Salud y Servicios Sociales. En: http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/spanish/span0635.html.

FDA. (2000). 21 CFR Part 179. Irradiation in the production, processing and handling of food. Fed. Regist. 65, 71056-71058.

FDA. (2001). Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition Analytical Bacteriological Manual. FDA editions.

FDA. (2002). Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. Guidance for Industry.

FDA. (2014). Irradiation in the production, processing and handling of food. Pulsed light for the treatment of food. *Code of Federal Regulation*, Title 21, Volume 3.En: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=179.41

Ferrante, S., Guerrero, S., y Alzamora, S.M. (2007). Combined use of ultrasound and natural antimicrobials to inactivate *L. monocytogenes* in orange juice. *Journal of Food Protection*, 70, 1850-1857.

Ferreyra, M. (2004). Microbiología de cítricos. Apuntes del III curso de tecnología de citrus. Biblioteca de Ciencias de la Alimentación, Universidad Nacional de Entre Ríos, Concordia.

Gibson, A.M., y Hocking, A.D. (1997). Advances in predictive modeling of fungal growth in food. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 353-358.

Gómez, P., Salvatori, D., García Loredo, A., y Alzamora, S.M. (2011). Pulsed light treatment of cut apple: dose effect on color, structure and microbiological stability, *Food and Bioprocess Technology*, 5, 2311-2322.

Gómez-López, V., Devlieghere, F., Bonduelle, V., Debevere, J. (2005). Factors affecting the inactivation of microorganisms by intense light pulses. *Journal of Applied Microbiology, 99*, 460-470.

Gómez-López, V., Ragaert, P., Debevere, J., y Devlieghere, F. (2007). Pulsed light for food decontamination: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 464-473.

Guerrero, S., López-Malo, A., y Alzamora, S.M. (2001). Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae:* influence of temperature, pH and amplitude. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2, 31-39.

Guerrero, S., Tognon, M., y Alzamora, S.M. (2005). Response of *Saccharomyces cerevisiae* to the combined action of ultrasound and low weight chitosan. *Food control*, 16, 131-139.

Helms, E. (2014). Welcome to the juice generation. *The juice generation. 100 recipies for fresh juices and superfood smoothies*. Simon and Schuster, EE.UU., pp. 27-30.

Hoffmans, C.M., Fung, D.Y.C., y Kaster, C.L. (1997). Methods and resuscitation environments for the recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*: a review. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 5, 249-268.

Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., y Van Impe, J.F. (2005). GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology,* 102, 95– 105.

Givan, A. (2011). Flow cytometry. En: Hawley**,** Teresa S., Hawley, Robert G. (Eds.). *Flow Cytometry Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer, New York, EE.UU., pp. 1-20. Springer.

Gould, G.W., y Jones, M.V. (1989). Combination and synergistic effects. En: G.W. Gould (Ed.). *Mechanisms of action of food preservation procedures*, Elsevier Science Publishers Ltd, Essex, Gran Bretaña, pp. 401-421.

Gould, G.W. (1995). Homoestatic mechanisms during food preservation by combined methods. En: G.V. Barbosa-Cánovas y J. Welti-Chanes (Eds.). *Food*

preservation by moisture control. Fundamentals and applications. ISOPOW PRACTICUM II. G. Technomic Publication. Pennsylvania, EE.UU., pp. 397-410.

Graumlich, T.R., Marcy, J.E., y Adams, J.P. (1986). Aseptically packaged orange juice and concentrate: a review of the influence of processing and packaging conditions on quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24, 402-405.

Guererro S., Tognon, M., y Alzamora, S.M. (2005). Modeling the response of *S. cerevisiae* to the combined action of ultrasound and low weight chitosan. *Food control*, 16, 131-139.

Guerrero, S., Alzamora, S.M., y Ferrario, M. (2014). The use of pulsed light technology in a hurdle preservation strategy. En: G. Pataro y J. Lyng (Eds.). *High intensity pulsed light in processing and preservation of foods*. Nova Publishers EE.UU., en prensa.

Hewitt, C., y Nebe Von Caron, G. (2004). The application of multi-parameter flow cytometry to monitor individual microbial cell physiological state. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 89, 197-223.

Ho, J.L., y Shands, K.N. Friedland, G., Eckind, P. y Fraser, D.W. (1986). An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Archives of International Medicine*, 146, 520-524.

Hogan, E., Kelly, A., y Sun, D.W. (2005). High pressure processing of foods: an overview. En: Da-Wen Sun (Ed.), *Emerging technologies for Food Processing*. Elsevier, San Diego, USA., pp. 1-27.

Hogan, E., Kelly, A., y Sun, D.W. (2005). High pressure processing of foods: an overview. En: Da-Wen Sun (Ed.), *Emerging technologies for Food Processing*. Elsevier, San Diego, USA., pp. 1-27.

IRAM 20005-1 (1996). Análisis sensorial, guía para la selección, entrenamiento y seguimiento de los evaluadores. Parte I: evaluadores seleccionados. Instituto Argentino de Normalización.

IRAM 20005-2 (1996). Análisis sensorial, guía para la selección, entrenamiento y seguimiento de los evaluadores. Parte II: expertos. Instituto Argentino de Normalización.

IRAM 20013. (2001). Análisis sensorial, metodología. Perfil de textura. Instituto Argentino de Normalización.

ISO. (1988). Sensory analysis: General guidance for the design of test rooms, ISO 8589, International Organization for standardization, Geneva, Suiza.

Izquier, A., y Gómez-López, V. (2011). Modeling the pulsed light inactivation of microorganisms naturally occurring on vegetable substrates. *Food Microbiology*, 28, 1170-1174.

Janisiewicz, W.J., Conway, W.S., Brown, M.W., Sapersa, G.M., Fratamico, P., y Buchanan, L.R. (1999). Fate of *Escherichia coli* 0157-H7 on fresh-cut apple tissue and its potential for transmission by fruit flies. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1-5.

Jordán, M.J., Gonder, K.L., y Laencina, J. (2003). Dearation and pasteurization effects on the orange jucie aromatic fraction. *Swiss Society for Food Science Technology*, 36, 391-396.

Joux, F., y Lebaron, P. (2000). Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes Infection*, 2, 1523-1535.

Katsuragi, T., y Tani, Y. (2000). Screening for microorganisms with specific characteristics by flow cytometry and single-cell sorting. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89, 217-222.

Kelly, K.L. (1943). Color designations for lights. *Journal of the Optical Society of America*, 33, 627-631.

Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., y Lee, D. (2004). Applications and potential of ultasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 261-266.

Komitopoulou, E., Boziaris, I.S., Davies, E.A., Delves-Broughton, J., y Adams, M.R. (1999). Alicyclobacillus acidoterrestris in fruit juices and its control by nisin. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 81-85.

Koutchma, T., y Parisi, B. (2004). Biodosimetry of *Escherichia coli* UV inactivation in model juices with regard to dose distribution in annular UV reactors. *Journal of Food Science,* 69, 14-22.

Koutchma, T., Keller, S., Chirtel, S., y Parisi, B. (2004). Ultraviolet disinfection of juice products in laminar and turbulent flow reactors. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 179-189.

Koutchma, T., Forney, L., y Moraru, C. (2009). Microbial Inactivation by UV Light. In Da-Wen Sun (Ed.), *Ultraviolet Light in Food Technology Principles and Applications*. Taylor and Francis Group, New York, USA., pp. 69-99.

Koutchma, T. (2009). Advances in ultraviolet light technology for non-thermal processing of liquid foods. *Food and Bioprocess Technology,* 2, 138-155.

Krishnamurthy, K., Demirci, A., y Irudayaraj, J. (2007). Inactivation of *Staphylococcus aureus* in milk using flow-through pulsed UV light treatment system. *Journal of Food Science*, 72, 233-239.

Krishnamurthy, K., Tewari, J., Irudayaraj, J., y Demirci, A. (2010). Microscopic and spectroscopic evaluation of inactivation of *Staphylococcus aureus* by pulsed light and infrared heating. *Food and Bioprocess Technology,* 3, 93-104.

Lawless, H., y Heymann, H. (1999). *Sensory evaluation of food. Principles and practices*. Ed. H.T. Lawless y H. Heymann. Aspen Publishers, Maryland, USA.

Lawless, H., y Heymann, H. (2010). *Sensory evaluation of food.* En: Lawless, H., y Heymann, H. (Eds.). *Principles and practices*. Springer, New York, USA.

Lawless, H. (2013). Segmentation. En: Lawless, H. (Ed.), *Quantitative Sensory Analysis. Psychophysics, Models and Intelligent Design*. Wiley Blackwell, Oxford, Gran Bretaña, pp. 323-338.

Lee, H., y Coates, G. (2003). Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. *LWT - Food Science and Technology,* 36, 153–156.

Leitsner, L. Hurdle effect and energy saving (1978). En W.K. Downey (Ed.). *Food Quality and Nutrition.* Applied Science Publishers, Londres, Reino Unido. pp. 553-557.

Leistner, L. (1992). Food preservation by combined methods. *Food Research International*, 25, 151-158.

Linton, R.H., Carter, W.H., Pierson, M.D. y Hackney, C.R. (1995). Use of a modified Gompertz equation to model nonlinear survival curves for *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection,* 58, 946-954.

López-Gómez, A., Fernández, P.S., Palop, A., Periago, P.M., Martínez-López, A., Marin-Iniesta, F. y Barbosa-Cánovas, G. (2009). Food safety engineering: an emergent perspective. *Food Engineering Reviews*, 1, 84-104.

López-Malo, A. (2000). La preservación multiobjetivo de alimentos: efecto de factores tradicionales y emergentes en la respuesta de *Aspergillus flavus*. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires.

Lozano, R.D. (1978). El Color y su Medición. Ed. Amercia Lee, Buenos Aires.

Malvern Instruments. (2004). Size theory. En*: Zetasizer Nano Series User Manual.* pp. 199-203. Worcestershire, Reino Unido. En: http://www.biozentrum.unibas.ch/fileadmin/redaktion/Forschung/Research_Groups/BF/instruments/zetasizer_manual.pdf

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente (Magrama). (2000). Manzana. Gobierno de España. En: http://www.magrama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/manzana_tcm7-315337.pdf

Mason, T., Riera, E., Vercet, A. y Lopez-Buesa, P. (2005). Application of ultrasound. En*:* Da-Wen Sun (Ed.). *Emerging Technologies for Food Processing.* Elsevier, San Diego, USA., pp., 323-345.

Mazzotta, A.S. (2001). Thermal inactivation of stationary-phase and acid-adapted *Escherichia coli* 0157-H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *Journal of Food Protection*, 64, 315-320.

Mc Meekin, T.A., Olley, J.N., Ross, T. y Ratkowsky, D. (1993). Predictive microbiology. Theory and application. Research Studies Press Ltd. Y John Wiley and Sons Inc., Reino Unido.

Mc Meekin, T.A, Olley, J., Ratkowsky, D.A. y Ross, T. (2002). Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 395-407.

McMeekin TA, Hill C, y Wagner M. (2010). Ecophysiology of food-borne pathogens: Essential knowledge to improve food safety. *International Journal of Food Microbiology* 139, S64-S68.

Meilgaard, M.; Civille, G. y Carr, B. (1999). *Sensory Evaluation Techniques*. 3ra edición CRC Press, Inc., Florida, EE.UU., pp. 1-453.

Miller, F., y Silva, C. (2012). Thermal treatment effects in fruit juices. En: S. Rodrigues y F.A.N. Fernandes (Eds.). *Advances in fruit processing technologies.* CRC Press, Taylor and Francis Group, Florida, USA, pp. 363-386.

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (Minagri). (2013a). Perfil de mercado de cítricos. En:
http://www.minagri.gob.ar/dimeagro/frutas/perfil_c%C3%ADtricos_2013.pdf

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (Minagri). (2013b). Perfil de Mercados de Manzana y Pesca. En:
http://www.minagri.gob.ar/DIMEAGRO/frutas/perfil_manzanas_peras.pdf

Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (Mincyt) (2007). Debilidades y desafíos tecnológicos del sector productivo. Frutas tropicales: Formosa, Salta y Santiago del Estero. En:
http://www.cofecyt.mincyt.gov.ar/pcias_pdfs/salta/UIA_frutas_trop_08.pdf

Ministerio de Salud (Msal). (2010). Se lanza la campaña nacional para la promoción del consumo de frutas y verduras. En:

http://www.msal.gob.ar/argentina-saludable/news/consumo_frutas_verduras.html

Ministerio de Salud y Protección Social- Colombia. (2013). Resolución número 003929. En:
http://www.mincit.gov.co/descargar.php?id=73797

Moreiras, O., Carvajal, A., Cabrera, L., y Cuadrado, M. (2001). Tablas de Composición de Alimentos. Ediciones Pirámide. Madrid, España.

Muñoz, A., Palgan, I., Noci, F., Morgan, D., Cronin, D., Whyte, P. y Lyng, J. (2011). Combinations of high intensity light pulses and thermosonication for the inactivation of *Escherichia coli* in orange juice. *Food Microbiology*, 28, 1200-1204.

Muñoz, A., Caminiti, I., Palgan, I., Pataro, G., Noci, F., Morgan, D., Cronin, D., Whyte, P., Ferrari, G., y Lyng, J. (2012a). Effects on *Escherichia coli* inactivation and quality attributes in apple juice treated by combinations of pulsed light and thermosonication. *Food Research International,* 45, 299-305.

Muñoz, A., Palgan, I., Noci, F., Cronin, D., Morgan, D., Whyte, P., y Lyng, J. (2012b). Combinations of selected non-thermal technologies and antimicrobials for microbial inactivation in a buffer system. *Food Research International,* 47, 100-105.

Murakami, E.G., Jackson, L., Madsen, K., y Schickedanz, B. (2006). Factors affecting the ultraviolet inactivation of *Escherichia coli* K12 in apple juice and a model system. *Journal of Food Process Engineering,* 29, 53–71.

NACMCF (2004) Requisite scientific parameters for establishing the equivalence of alternative methods of pasteurization. En:
www.fsis.usda.gov/ophs/nacmcf/2004/nacmcf_pasteurization_082704.pdf

Okoth, M.W., Kaahwa, A.R, y Imungi, J.K. (2000). The effect of homogenisation, stabiliser and amylase on cloudiness of passion fruit juice. *Food control*, 11, 305-311.

Organización Mundial de la Salud. (2003). Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Informe de una Consulta Mixta de Expertos OMS/FAO. En: http://www.fao.org/3/a-ac911s.pdf

Oms-Oliu, G., Aguiló-Aguayo, I., Martín-Belloso, O., y Soliva-Fortuny, R. (2010). Effects of pulsed light treatments on quality and antioxidant properties of fresh-cut mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Postharvest Biology and Technology,* 56, 216-222.

Oteiza, J.M. (2011). *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Revista Argentina de Microbiología, 43, 67.

Oyarzábal, O.A., Nogueira, M.C.L., y Gombas, D.E. (2003). Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in juice concentrates. *Journal of Food Protection*, 66, 1595-1598.

Palmieri, L., y Cacace, D. (2005). High intensity pulsed light technology. En: Da-Wen Sun (Ed.), *Emerging Technologies for Food Processing*. Elsevier, San Diego, USA., pp. 279-304.

Palgan, I., Caminiti, I., Muñoz, A., Noci, F., Whyte, P., Morgan D., Cronin, D., y Lyng, J. (2011a). Effectiveness of high intensity light pulses treatments for the control of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice, orange juice and milk. *Food Microbiology*, 28, 14-20.

Palgan, I., Caminiti, I., Muñoz, A., Noci, F., Whyte, P., Morgan, D., Cronin, D., y Lyng, J. (2011b). Combined effect of selected non-thermal technologies on

Escherichia coli and *Pichia fermentans* inactivation in an apple and cranberry juice blend and on product shelf life. *International Journal of Food Microbiology*, *151*, 1-6.

Parish, M.E., y Higgins, D.P. (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. *Journal of Food Protection*, 52, 144-147.

Parrish, M.E. (1998). Food and Drug Administration Docket #97N-0511, Comment #60, Dockets Management Branch (HFA-305), Food and Drug Administration, Rockville, EE.UU.

Pataro, G., Muñoz, A., Palgan, I., Noci, F., Ferrari, G., y Lyng J. (2011). Bacterial inactivation in fruit juices using a continuous flow Pulsed Light system. *Food Research International*, 44, 1642-1648.

Peleg, M., y Cole, M. B. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science*, 38, 353-380.

Pitt, J.L., y Hocking, A.D. (1997). Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic and Professional, Londres, Reino Unido.

Piyasena, P., Mohareb, E., y McKellar, R. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound. A review. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 207-216.

Podolak, R., Elliott, P., Taylor, B., Khurana, A., y Black, D. (2009). Destruction of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice on stainless steel surfaces by chemical desinfectants. *Journal of Food Protection*, 72, 510-514.

Quinn, G., y Keough, M. (2002). Generalized linear models and logistic Regression. En: G. Quinn y M. Keough, M. *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, pp. 359-380.

Rajkovic, A., Smigic, N., y Devlieghere, F. (2010). Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. *International Journal of Food Microbiology,* 141, S29-S42.

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

Renard, C., y Maingonnat, J.F. *(2012).* Thermal Processing of Fruits and Fruit Juices. En: Da Wen Sun (Ed.). *Thermal Food Processing: New Technologies and Quality Issues.* CRC Press, Taylor and Francis Group, Florida, USA., pp. 424-426.

Rice, J.K., y Ewell, M. (2001). Examination of peak power dependence in the UV inactivation of bacterial spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5830-5832.

Riera, N., Galassi, N., y Felippo, M. (2008). Introducción a la citometría de flujo. Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.

Roberts, T.A., e Ingram, M. (1973). Inhibition of growth of *C. botulinum* at different pH values by sodium chloride and sodium nitrite. *Journal of Food Technology*, 8, 467-470.

Root, W., y Barrett, D (2005). Apples and apples processing. En: D.Barrett, L. Somogyi y H. Ramaswamy (Eds.) *Processing fruits*. Science and Technology, CRC Press, Florida, USA., pp. 460-470.

Ross, A. Griffiths, M., Mittal, G, y Deeth, H. (2003). Combining nonthermal technologies to control. *International Journal of Food Microbiology*, 89, 125-138.

Rowan, N., MacGregor, S., Anderson, J., Fouracre, R., McIlvany, L., y Farish, O. (1999). Pulsed light inactivation of food related microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1312-1315.

Rowan, N., Valdramidis, V., y Gómez-López, V. (2015). A review of quantitative methods to describe efficacy of pulsed light generated inactivation data that embraces the occurrence of viable but non culturable state microorganisms. *Trends in Food Science and Technology*, *44*, 79-92.

Sado, P.N., Jinneman, K.C., Husby. G.J., Sorg, S.M., y Omiecinsky, C.J. (1998). Identification of Listeria monocytogenes from pasteurized apple juice using rapid test kits. *Journal of Food Protection*, 61, 1199-1202.

Schenk M., Guerrero, S. y Alzamora, S. (2008). Response of some microorganisms to ultraviolet treatment on fresh-cut pear. *Food and Bioprocess Technology,* 1, 384–392.

Sampedro, F., McAloon, A., Yee, W., Fan, X., Zhang, H.Q., y Geveke, D.J. (2013). Cost analysis of commercial pasteurization of orange juice by pulsed electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17, 72-78.

Sauer, A., y Moraru, C. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice and apple cider using pulsed light treatment. *Journal of Food Protection*, 72, 937-944.

Schenk M., Raffellini, S., Guerrero, S., Blanco, G., y Alzamora, S. (2011). Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* by UV-C light: study of cell injury by flow cytometry. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology*, 44,191-198.

Sentrandeu, E., Carbonell, L., Carbonell, J.V., e Izquierdo, L. (2005). Effects of heat treatment conditions on fresh taste and pectimethylesterase activity of chilled mandarin and orange juices. *Food Science and Technology International*, 11, 217-222.

Silva, F., y Gibbs, P. (2001). *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes. *Trends in Food Science and Technology,* 12, 68-74.

Sivapalasingam, S., Friedman, C., Cohen, L., y Tauxe, R. (2004). Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *Journal of Food Protection, 67, 2342–2353.*

Smit, Y., Cameron, M., Venter, P., y Witthun, C. (2011). *Alicyclobacillus* spoilage and isolation – A review. *Food Microbiology*, 28, 331-349.

SPE (2010). Secretaría de Política Económica, Subsecretaría de Programación Económica Dirección Nacional de Programación Económica Regional, Ministerio de Economía y Finanzas Públicas. En: http://librozilla.com/doc/916990/complejo-frut%C3%ADcola--manzana-y-pera.

Splittstoesser, D.F., McLellan, M.R., y Churey, J.J. (1995). Heat resistance of *Escherichia coli* 0157:H57 in apple juice. *Journal of Food Protection*, 28, 24-28.

Stone, H., y Sidel, J. (1993). *Sensory Evaluation Practices*, 2ª ed., Elsevier, San Diego, USA.

Stratford, M., Hofman, P., y Cole, M. (2000). Fruit juices, fruit drinks, and soft drinks. En: B.M. Lund, T.C. Baired Parker, G.W. Gould (Eds.). *Microbiological Safety and Quality of Food.* Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, USA, pp. 836-850.

Suslick, K.S. (1990). Homogeneous sonochemistry. En: K.S. Suslick (Ed.), *Ultrasound. Its Chemical, Physical and Biological Effects.* VCH Publishers, Inc.: New York, USA, pp. 123–163.

Takeshita, K., Shibato, J., Sameshima, T., Fukunaga, S., Isobe, S., e Itoh, M. (2003). Damage of yeast cells induced by pulsed UV light irradiation. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 151-158.

Toepfl, S., Heinz, V., y Knorr, D. (2007). High intensity pulsed electric fields applied for food preservation. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46, 537-546.

Tournas, V.H., y Katsoudas, E. (2005). Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. *International Journal of Food Microbiology*, 15, 11-17.

Ueckert, J., Breeuwer, P., Abee, T., Stephens, P., Nebe von Caron, G., y Steeg, P. (1995). Flow citometry applications in physiological study and detection of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology, 28*, 317-326.

Uesugui, A., Woodling S., y Moraru, C. (2007). Inactivation kinetics and factors of variability in the pulsed light treatment of *Listeria innocua* cells. *Journal of Food Protection*, 70, 2518-2525.

Union, E. (1997). Regulation (EC) No258/97 of the European Parliaments and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients. En:
http:/europex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31997RO258

Vercammen, A., Vivijs, B., Lurquin, I., y Michiels, C. (2012). Germination and inactivation of *Bacillus coagulans* and *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by

high hydrostatic pressure treatment in buffer and tomato sauce. *Internantional Journal of Food Microbiology*, 152, 162-167.

Vidal Fonteles, T., Garcia Maia Costa, M., Tibério de Jesus, A.L., Alcántara de Miranda, M.R., Fernandes, F.A., y Rodrigues, S. (2012). Power ultrasound processing of cantaloupe melon juice: Effects on quality parameters. *Food Research International*, 48, 41–48.

Vives-Rego, J.; Lebaron, P. y Nebe-Von Caron, G. (2000). Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 429-448.

Vojdani, J., Beuchat, L.y Tauxe, R. (2008). Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. *Journal of Food Protection,* 71, 356–364.

Wallace, C., Sperber, W., Mortimore, S. (2010). Food Safety for the 21st Century: Managing HACCP and Food Safety Throughout the Global Supply Chain. Wiley-Blackwell. USA., pp. 1-50,

Wang, T., MacGregor, S., Anderson, J., y Woolsey, G. (2005). Pulsed ultraviolet inactivation spectrum of *Escherichia coli*. *Water Research*, 39, 2921-2925.

Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, P., Fox, G.E., Deinhard, G., y Poralla, K. (1992). Comparative sequence analysis on the 16sRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, Alicyclobacillus gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 263-269.

Whiting, R.C. (1995). Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 467-494.

Woodling, S., y Moraru, C. (2007). Effect of spectral range in surface inactivation of *Listeria innocua* using broad-spectrum pulsed light. *Journal of Food Protection*, 70, 909-916.

Wekhof, A. (2000). Desinfection with flash lamps. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology,* 54, 264-275.

Wu, V.C.H. (2008). A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology*, 25, 735-744.

Xiong, R., Xie, G., Edmondson, A., y Sheard, M. (1999). A mathematical model for bacterial inactivation. *Internantional Journal of Food Microbiology*, 46, 45–55.

Yaun, B.R., Sumner, S.S., Eifert, J.D., y Marcy, J.E. (2003). Response of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 to UV energy. *Journal of Food Protection,* 66, 1071-1073.

Yaun, B.R., Sumner, S.S., Eifert, J.D. y Marcy, J.E. (2004). Inhibition of pathogens on fresh produce by ultraviolet energy. *International Journal of Food Microbiology,* 90, 1-8.

Yousef, A.E., y Marth, E.H., 1988. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by ultraviolet energy. *Journal of Food Science,* 53, 571–573.

Yúfera, E.P. (1998). Química de los alimentos. Ed. E.P. Yúfera. Editorial Síntesis S.A., Madird, España.

Yuste, J. y Fung, D.Y. (2002). Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A 49594 in apple juice supplemented with cinnamon*. Journal of Food Protection*, 65, 1663-1666.

Zhao, W, Yang, R., Zhang, H., Zhang, W., Hua, X., y Tang, Y. (2011). Quantitative and real time detection of pulsed electric field induced damage on *Escherichia coli* cells and sublethally injured microbial cells using flow cytometry in combination with fluorescent techniques. *Food Control,* 2, 566-573.