

Tesis de Maestría

Utilización de luz ultravioleta de onda corta como tecnología de preservación de jugos frutales

Mytilinaki, Elisavet

2008

Tesis presentada para obtener el grado de Magister de la
Universidad de Buenos Aires en el área de Bromatología y
Tecnología de la Industrialización de Alimentos de la
Universidad de Buenos Aires

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 Master's and 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:

Mytilinaki, Elisavet. (2008). Utilización de luz ultravioleta de onda corta como tecnología de preservación de jugos frutales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4453_Mytilinaki

Cita tipo Chicago:

Mytilinaki, Elisavet. "Utilización de luz ultravioleta de onda corta como tecnología de preservación de jugos frutales". Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4453_Mytilinaki

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

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

UTILIZACIÓN DE LUZ ULTRAVIOLETA DE ONDA CORTA COMO TECNOLOGÍA DE PRESERVACIÓN DE JUGOS FRUTALES



78847

Tesis presentada para optar por el título de
Magister en Bromatología y Tecnología de la Industrialización de
Alimentos

Autora: *Elisavet Mytilinaki*
Directora de Tesis: *Dra. Sandra N. Guerrero*

Buenos Aires, Diciembre 2008

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Buenos Aires que hizo posible la realización de esta tesis.

A los directivos, docentes y personal del Departamento de Industrias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, por brindarme sus conocimientos e integrarme a su lugar de trabajo.

A la Dra. Sandra Guerrero por su excelente dirección, dedicación y comprensión.

A la Dra Stella Maris Alzamora por brindarme su apoyo y permitirme integrar su grupo de trabajo.

A mis compañeras de laboratorio Marcela y Cielo por su invaluable colaboración y por amenizar largas horas de trabajo.

A Mary por sus consejos y asistencia permanente.

.... *A mi familia*

INDICE

1-INTRODUCCIÓN, - 5 -

- 1.1. El mercado mundial de jugo de manzana, - 7 -
- 1.2 -Producción nacional de jugo de manzana, - 7 -
 - 1.2.1 -La materia prima, - 7 -
 - 1.2.2 -La producción industrial, - 10 -
- 1.3. Operaciones industriales para la obtención del jugo de manzana, - 11 -
- 1.4. Un plan HACCP, - 16 -
- 1.5. Ecología de los jugos frutales, - 17 -
 - 1.5.1 -*Escherichia coli*, - 18 -
 - 1.5.2 *Listeria* sp, - 19 -
 - 1.5.3- *Saccharomyces cerevisiae*, - 22 -
- 1.6 - Tecnologías emergentes para la preservación de alimentos, - 22 -
 - 1.6.1.- Luz ultravioleta, - 24 -
 - 1.6.1.1.- La naturaleza de la luz ultravioleta y el daño celular, - 24 -
 - 1.6.1.2.- La radiación ultravioleta en la tecnología de los alimentos, - 26 -
 - 1.6.1.3- Susceptibilidad de los microorganismos a la luz UV, - 28 -
 - 1.6.1.4-Fenómeno de reactivación, - 29 -
 - 1.6.1.5-Dosificación, - 30 -
 - 1.6.1.6-Fuentes de la luz UV, - 31 -
- 1.7.- La microbiología predictiva como herramienta de análisis, - 34 -
 - 1.7.1. - Modelo de distribución de frecuencias de resistencias - Weibull, - 37 -

2. OBJETIVOS, - 40 -

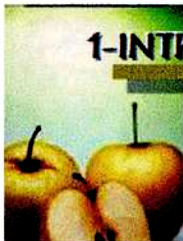
- 2.1 -Objetivos generales, - 41 -
- 2.2 -Objetivos específicos, - 43 -

3. MATERIALES Y MÉTODOS , - 44 -

- 3.1. Etapas del ensayo, - 45 -
- 3.2. Sistemas, - 45 -
- 3.3. Medios de cultivo, - 46 -
- 3.4. Microorganismos, - 47 -
- 3.5. Preparación de los inóculos, - 47 -
 - 3.5.1. Inóculos simples, - 47 -
 - 3.5.2. Inóculos mixtos, - 48 -
- 3.7. Obtención de jugo de manzana para el estudio de la flora nativa, - 49 -
- 3.8. Caracterización físico-química de los jugos utilizados, - 52 -
 - 3.8.1. Determinación de pH y sólidos solubles, - 52 -
 - 3.8.2. Determinación del coeficiente de absortividad de los jugos, - 52 -
- 3.9. Equipo de irradiación UV-C, - 52 -
- 3.10. Tratamiento de irradiación con Luz UV-C, - 53 -
- 3.11. Enumeración de microorganismos sobrevivientes, - 56 -
- 3.12. Representación gráfica de las curvas de supervivencia, - 58 -

3.13. Modelado matemático, - 58 -	
3.14 Estudios de almacenamiento, - 59 -	
3.15 Evolución de la flora nativa de los jugos irradiados con luz UV-C, - 59 -	
3.16. Determinación de la dosis de radiación UV-C, - 60 -	
4-RESULTADOS Y DISCUSIÓN, - 63	
4.1. Caracterización físico-química de los jugos utilizados, - 64 -	
4.1.1. Determinación de pH y sólidos solubles, - 64 -	
4.1.2. Determinación del coeficiente de absortividad de los jugos, - 64 -	
4.2. Optimización del equipo de irradiación UV-C, - 67 -	
4.3. Determinación de la dosis de radiación UV-C, - 69 -	
4.4-Estudios de reto microbiano, - 73 -	
4.4.1- Sistema modelo, - 73 -	
4.4.1.1.- Curvas de inactivación, - 73 -	
4.4.1.2 -Utilización de la microbiología predictiva: Aplicación de un modelo de distribución de frecuencias de resistencias Weibulliano, - 76 -	
4.4.2 - Sistema modelo acidificado, - 87 -	
4.4.2.1.- Curvas de inactivación, - 87 -	
4.4.2.2. -Aplicación del modelo de distribución de frecuencias tipo Weibull, - 89 -	
4.4.3.- Jugo comercial, - 96 -	
4.4.3.1.- Curvas de inactivación, - 96 -	
4.4.3.2 -Utilización de la microbiología predictiva: Aplicación de un modelo de distribución de frecuencias de resistencias Weibulliano, - 100 -	
4.4.4- Jugo exprimido integral (JMI), - 113 -	
4.4.4.1.-Curvas de inactivación, - 113 -	
4.4.4.2.-Aplicación del modelo de distribución de frecuencias tipo Weibull, - 116 -	
4.5- Evolución de la población microbiana inoculada durante el almacenamiento refrigerado de jugo de manzana, - 125 -	
4.5.1.Evolución de la flora nativa, - 131 -	
4.5.1.Poblaciones mixtas, - 126 -	
-	
6- ÁPENDICE ESTADÍSTICO, - 141 -	
6.1.Definiciones y Fórmulas, - 142 -	
6.1.1- Población estadística, - 142 -	
6.1.2-Distribución normal, - 142 -	
6.1.3- Parámetros y estimadores, - 142 -	
6.1.4 - Significancia estadística, - 145 -	
6.2 - Análisis de varianza (ANOVA), - 147 -	
6.2.1- Test F de significación de la regresión, - 149 -	
6.2.2.-Coeficiente de determinación (R^2), - 151 -	
6.2.3.-Análisis de residuales, - 151 -	
7-BIBLIOGRAFIA, -162 -	

1-INTRODUCCIÓN



1.1. El mercado mundial de jugo de manzana

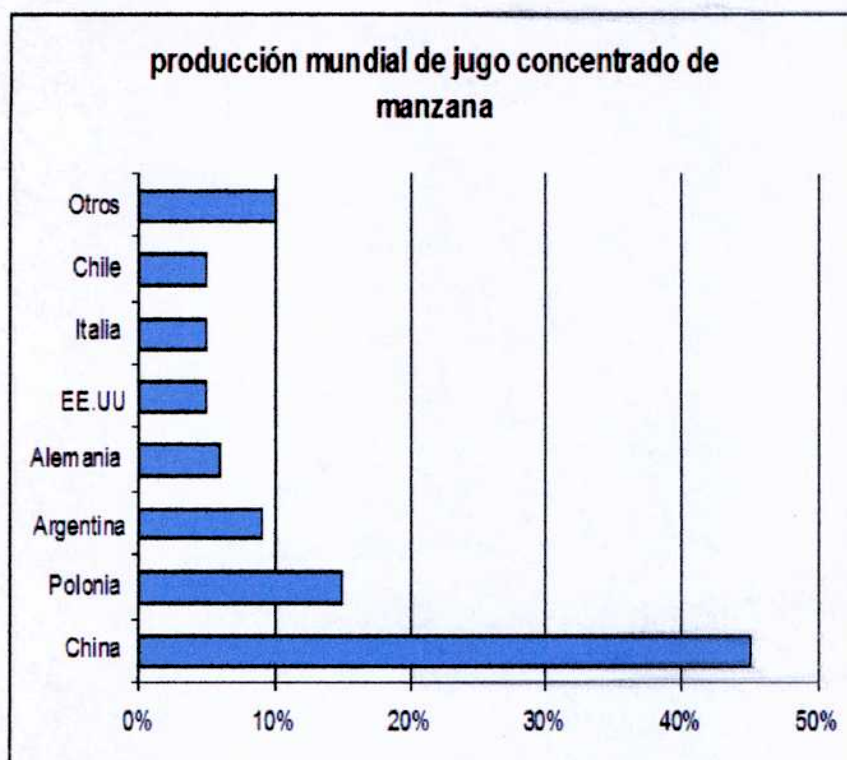
La producción mundial de jugo de manzana de los últimos años se calculó en 1,2 millones de toneladas con una demanda creciente y tendencia a incrementarse (Figura 1.1). Actualmente el país productor más importante en el mundo es China seguido por Polonia. China elabora casi la mitad del total mundial, lo cual corresponde a 614.000 toneladas de jugo concentrado. Su producción, crece a una tasa promedio anual de 30% (Bruzzone, 2008). Tanto el mercado de Japón como el de los países europeos demandan jugo de alto grado de acidez. El jugo procedente de China tiene insuficiente acidez, hecho que obliga a los importadores a comprar jugo de otras procedencias con acidez más elevada, dejando de este modo a otros países productores conquistar una parte del mercado. Finalmente, los jugos de diferentes procedencias se mezclan consiguiendo así las características organolépticas deseadas en el producto final (Bruzzone, 2008). En este contexto, Argentina es uno de los principales competidores de China especialmente en cuanto a las exportaciones dirigidas a EE.UU que absorben la mayoría de la producción del país. En 2006, las exportaciones argentinas totalizaron 49 millones de dólares y un volumen de 55.000 toneladas (Figura 1.1).

1.2. Producción nacional de jugo de manzana

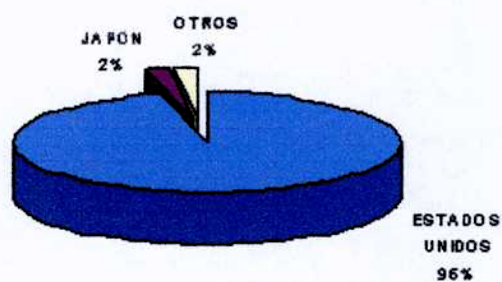
1.2.1. La materia prima

La producción argentina de manzana corresponde aproximadamente a un millón de toneladas que se cultivan en una superficie de 71.000 hectáreas. En cuanto a la ubicación de los cultivos, el protagonista es Río Negro ya que allí se produce el 65% de las manzanas del país mientras que en Neuquén se produce el 15%. Otras regiones de importancia son el Valle de El Uco en Mendoza; 25 de Mayo, en La Pampa y el Valle de Tulum en San Juan. Para la elaboración de jugo concentrado de manzana se usan principalmente las variedades Granny Smith (15%) y Red Delicious (80%).

Figura 1.1. La producción mundial de jugo concentrado de manzana (JCM)



**EXPORTACIONES ARGENTINAS DE JCM
1998**

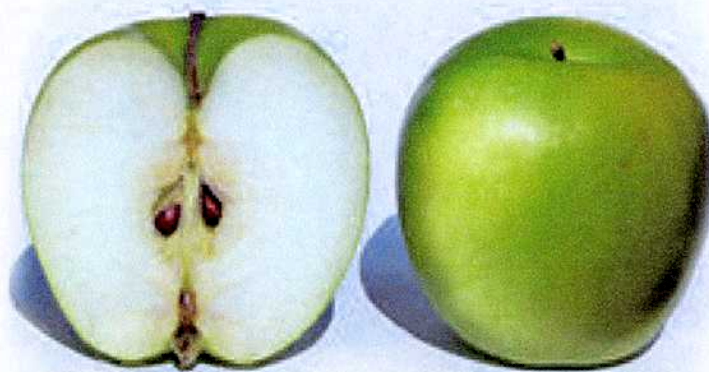


FUENTE: Deción. Nac. A Investacóns-SAG PyA, según datos de INDEC

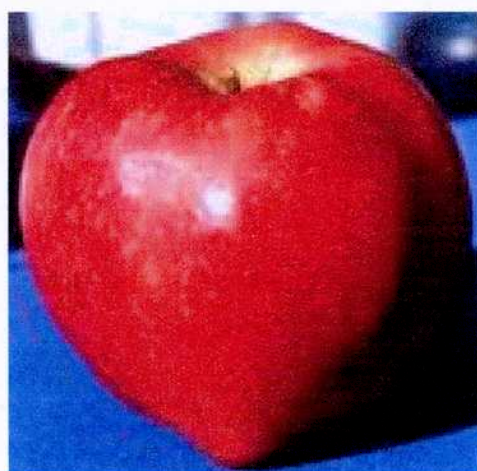
Fuente: SAGPyA y Boletín Oficial de la República Argentina -. Cámara Argentina de la Industria y Exportación de Jugos de Manzanas, Peras y Afines (CINEX)

Figura 1.2. "Las dos variedades de manzana de uso industrial para elaboración de jugo concentrado"

Manzanas de la variedad "Granny Smith"



Manzanas de la variedad "Red Delicious"



1.2.2. La producción industrial

El jugo concentrado de manzana es un producto que se obtiene por el exprimido de distintas variedades de manzana y posterior concentración del jugo obtenido. En la industria, se necesitan aproximadamente 6,9 kg de manzana para obtener 1 kg de jugo. El producto final tiene que cumplir con las exigencias del Código Alimentario Argentino. La producción argentina se incrementó más del 50% en los últimos 20 años (Bruzzone, 2008). El aumento se debe fundamentalmente a una sostenida demanda internacional. La mitad de la producción argentina de manzanas va directamente a la industria ya que el producto fresco no cumple con los requerimientos de la comercialización internacional. El 80% de esta cantidad se destina a elaboración de jugo. El aumento de la oferta mundial, implica para Argentina mayores exigencias en cuanto a calidad; EE.UU exige trazabilidad, imposición de HACCP y Buenas Prácticas de Manufactura (BMP).

La comercialización del jugo de manzana concentrado se hace en dos tipos de jugo:

- 🍏 El jugo clarificado (71-70° Brix) que priormente se usa en la elaboración de jugos, bebidas y gaseosas
- 🍏 El jugo con pulpa o "cloudy" o integral (45°Brix) se usa para la elaboración de jugos y néctares.

La comercialización se realiza a granel, en tambores de plástico o de chapa de 300 kg, o en bins de madera en bolsa de polietileno doble con capacidad para 1500 kg de jugo concentrado. El producto se transporta en buques con bodegas a 0°C para el caso del jugo clarificado y a -20°C para el jugo con pulpa. El jugo concentrado que no se exporta se vende a fábricas locales, que lo diluyen lo mezclan para comercializarlo como jugo o usarlo como edulcorante en bebidas gaseosas (Bruzzone, 2008).

La elaboración de jugos da la oportunidad de aprovechar las frutas que no satisfacen las exigencias del mercado y no pueden ser vendidas como producto fresco. Muchas veces los defectos de estos productos son mínimos y con su procesamiento se puede conseguir jugo de buena calidad.

El jugo integral o pulposo es un producto cuyo mayor mercado lo constituyen los países europeos. Es un producto que mantiene mejor las propiedades organolépticas de la fruta, debido a la presencia de la pulpa. Sin embargo, su apariencia turbia y el sedimento que se tiende a formar con el tiempo pueden causar una impresión negativa al consumidor, el cual no está acostumbrado a ese tipo de producto (Moyano y col, 1981). El jugo clarificado, en cambio es un producto translúcido, de color caramelo claro.

De esta forma Argentina comercializa sobre todo el jugo que vende a los Estados Unidos. El mismo, sin embargo, debido a su claridad y la ausencia de la pulpa es percibido por algunos consumidores como un producto "poco natural".

1.3. Operaciones industriales para la obtención del jugo de manzana

Las operaciones básicas con fin de obtener el jugo de manzana son las siguientes:

1. Preparación para la extracción
2. Extracción del jugo
3. Operaciones post extracción de acuerdo al producto deseado

En los primeros pasos, se realiza el lavado y la selección de la fruta y a continuación, la fruta se dirige a la maquinaria de molienda. Las diferentes tecnologías utilizadas para la extracción del jugo de manzana incluyen:

-  Molinos A Martillo
-  Molinos Raspadores
-  Desintegradores Rietz
-  Rodajadores

Los molinos a martillo, los raspadores y los desintegradores de Rietz realizan la extracción por medio de prensado de la manzana triturada. Los desintegradores de Rietz normalmente son una unidad previa a la extracción, de centrifugación continua. Los rodajadores son aptos para obtención del jugo por difusión (Moyano y col, 1981).

El método de extracción del jugo depende de la capacidad de planta, la materia prima, la calidad del jugo, el rendimiento de extracción deseado y otros factores que tienen que

ver con la operación de la planta. La extracción se puede realizar de manera continua o discontinua.

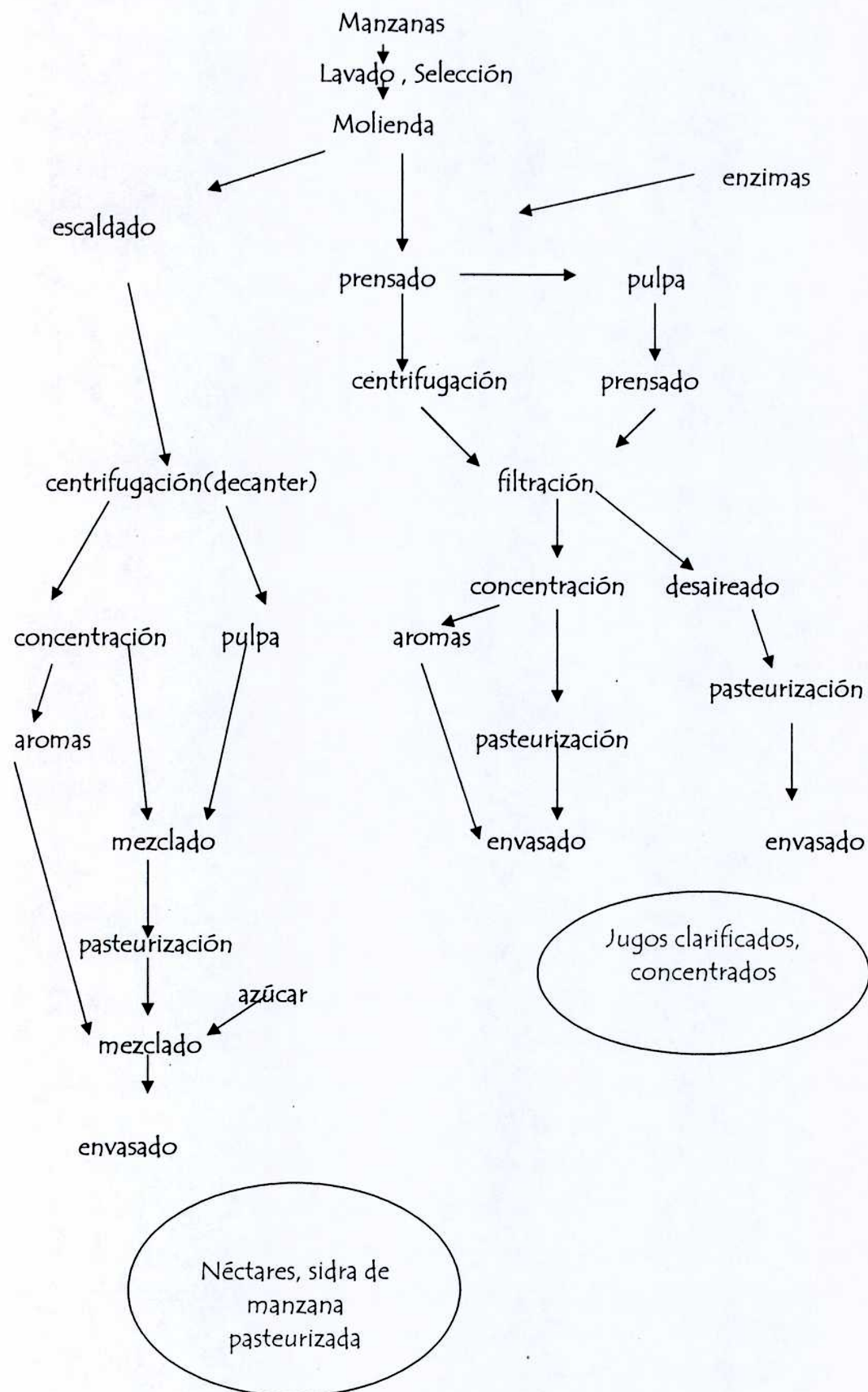
La obtención del jugo puede hacerse mediante uso de prensas, centrífugas tamizadoras o decanter. La prensa puede ser la maquinaria principal o auxiliar para el prensado del jugo remanente en la pulpa. Recientemente, se ha comenzado a usar un método de extracción que se basa en la difusión del jugo mediante agua caliente. Este último método se usa en combinación los rodajadores mencionados al principio del parrafo.

Operaciones post extracción: En esta etapa se realizan los procesos necesarios para la preservación del producto y responsables de los distintos tipos de jugo. Incluyen: clarificación enzimática, centrifugación, filtración, homogeneización, desaireación, concentración, recuperación de aromas, pasteurización, almacenamiento y envasado (Figura 1.3).

1.4. 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 1.4.a se muestra la diferencia en la apariencia de los dos productos, siendo evidente la turbidez de la sidra de manzana.

Figura 1.3. Esquema que resume la elaboración de distintos tipos jugo de manzana



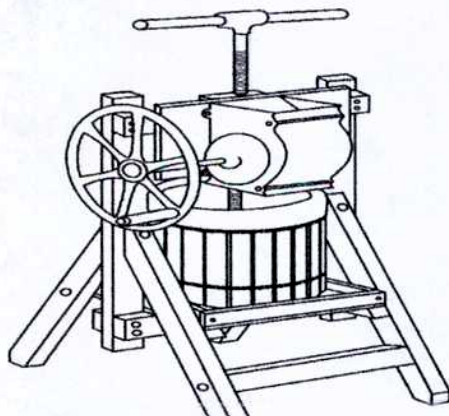
La sidra de manzana se elabora artesanalmente o en pequeñas unidades, con un proceso bastante simple, el cual consiste en un primer paso de lavado, cortado y maceración de las manzanas. Luego, se emplea una tela en la cual se envuelve el procesado de manzana. A continuación, una prensa hidráulica exprime 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 Figura 1.4.b muestra un esquema de un equipo utilizado para elaboración de sidra de manzana y también el producto terminado listo para su comercialización. En las provincias del norte de los Estados Unidos y de Canadá, donde hay producción de manzana, en la época de la cosecha, se encuentran puestos en las carreteras cercanas a los huertos de manzanos donde los productores elaboran y venden este producto.

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 como sidra o "Hard Cider" (EE.UU) y que no corresponde a las características del producto descrito 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 (ver Tabla 1.1) y se empezaron a tomar medidas adicionales para asegurar su inocuidad. La FDA (1999a) ha recomendado la aplicación de un sistema HACCP para todos los elaboradores de jugos frutales y un rótulo para los productos no sometidos a pasteurización, el cual advierta sobre la posibilidad de presencia de patógenos y el peligro que acarrea para ciertos grupos de riesgo. Las Buenas Prácticas de Manufactura de este producto incluyen la exclusión del proceso a las manzanas caídas en el suelo, el empleo de fertilizantes químicos en lugar de orgánicos, la perfecta higiene de la maquinaria, empleados y edificios donde se elabora sidra de manzana y la realización de estudios microbiológicos para bacterias coliformes, coliformes fecales y *E.coli* en toda partida de sidra elaborada (FDA, 1999b).

Figura 1.4.a. Jugo de manzana clarificado (derecha) y Jugo de manzana integral o sidra de manzana (izquierda)



Figura 1.4.b. Equipo para elaboración de sidra de manzana y producto terminado



1.5. Un plan HACCP

Los programas HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point o Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control) se focalizan en la prevención de riesgos biológicos, químicos y físicos que pueden afectar la seguridad alimentaria mediante el control de las partes críticas del procesamiento de los alimentos. 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 *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 industria juguera en los Estados Unidos fue una de las últimas en aplicarse la obligatoria implementación del sistema *HACCP* después de la de procesadora de pescados y mariscos en 1995 y la de carnes y aves en 1998. Los jugos se identificaron como vehículo de transmisión de varios brotes en todo el mundo. Los brotes más importantes se atribuyeron entre otros a *E.coli* O157:07, *Cryptosporidium parvum* y *Salmonella*. En los EE.UU en 1998 FDA propuso la implementación de un sistema HACCP que asegure una reducción de 5 ciclos logarítmicos para los elaboradores de jugos. En 2001 la implementación de HACCP para los grandes procesadores de frutas se hizo obligatoria (FDA, 2001).

1.6. Ecología de los jugos frutales

Distintas investigaciones sobre la flora natural de frutas y vegetales frescos demuestran que existe un potencial de una contaminación microbiológica amplia, inclusive por patógenos, a una amplia gama de productos. Brotes de enfermedades gastrointestinales han sido reportados para productos enteros, frutos y vegetales cortados, feteados y pelados, brotes de semillas, jugos frutales y vegetales sin pasteurizar. Los productos más implicados son los brotes de semillas y jugos sin pasteurizar (Alzamora y col., 2003).

Las frutas y los vegetales normalmente llevan una microflora epífita, no patógena. La mayoría de esta flora es superficial y se constituye a partir de hongos, levaduras y bacterias Gram negativas del grupo *Pseudomonas* o de la familia *Enterobacteriaceae*. Los dos tercios de la flora contaminante se constituye de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Sclerotinia* y *Botrytis*. De los mismos *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7 son los que causan más preocupación, especialmente en productos tales como los jugos frutales. Los virus involucrados en los brotes tienen reservorio humano (por ejemplo el virus Norwalk y el de hepatitis A) y los vehículos más frecuentemente son moluscos provenientes de aguas contaminadas o también otros alimentos que se infectan directamente a partir de personas infectadas en contacto con ellos (Cliver, 1997).

La contaminación puede ser también resultado del tratamiento de la tierra con abono o/y la contaminación de las aguas de irrigación. Cabe añadir que el procesamiento de estos alimentos frescos como es el pelado, el cortado o el exprimido destruyen las barreras naturales de las frutas y permiten la contaminación y la rápida proliferación de los microorganismos que normalmente constituyen la flora superficial en todo el alimento (Nguyen, 1994; Brackett, 1994). También durante el lavado es posible introducir microorganismos patógenos en el interior de los frutos, dependiendo siempre del estado sanitario del agua de lavado. Para evitar la contaminación de dichos alimentos es necesario tomarse medidas adicionales durante la producción. Estas medidas adicionales pueden ser tanto pre-cosecha, como también de descontaminación posterior o prevención del crecimiento de los microorganismos.

Los jugos son bebidas de naturaleza ácida (pH 3-4) con alto contenido de azúcares (aprox. 15 °Brix). Las levaduras, flora natural de la mayoría de las frutas, predominan en el deterioro de este tipo de alimentos debido a su alta tolerancia ácida y la capacidad de la mayoría de ellas de crecer aeróbicamente (Oteiza, 2007). Las levaduras son los microorganismos que mejor se proliferan en condiciones altamente osmóticas y acídicas, mientras que su capacidad de crecer a temperaturas de refrigeración hace que dicho grupo de microorganismos sean los principales alterantes para los jugos frutales (Hatcher y col., 2000; Parish y Higgins, 1989). Los géneros de levaduras más frecuentemente aislados a partir de jugos pasteurizados son *Rhodotula*, *Pichia*, *Candida* y *Saccharomyces*. Las especies más importantes incluyen: *Candida parapsilosis*, *Candida stellata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii* y *Zygosaccharomyces bailii* (Mendoza, 1982).

El jugo de manzana fresco, integral, elaborado sin remoción de la pulpa y sin pasteurizar comercializado como "apple cider" en América del Norte ha sido considerado como un producto estable debido a su naturaleza ácida. En los últimos años, sin embargo, la sidra de manzana ha actuado como vehículo no solamente para *E.coli* O157:H7, sino también para *Cryptosporidium* y *Salmonella* (Golden, 2000). Durante los últimos años varios brotes se han atribuido al consumo de sidra de manzana sin pasteurizar (Kushad, 1997). En la Tabla 1.1 se enumeran los brotes más importantes asociados con jugo de manzana y jugo integral (sidra) de manzana los últimos años. A continuación, se describen brevemente las especies utilizadas en este estudio.

1.6.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y se presenta en forma de cuerdas. Por primera vez en 1940, dicha bacteria, aparece como agente etiológico de enfermedad causada en humanos y en 1982 se aísla *E.coli* O157:H7 se caracteriza muy tóxica para el hombre y "ácidotolerante". La severidad de la enfermedad, la falta de tratamientos adecuados y los brotes potenciales a

gran escala a través de alimentos contaminados han disparado la investigación sobre la patogenicidad, la detección y los tratamientos tecnológicos adecuados con respecto a esta bacteria.

E.coli pertenece a la flora intestinal de hombres y animales y se encuentra en los alimentos como resultado de la contaminación fecal. La principal fuente parece ser el ganado aunque la bacteria se ha aislado también a partir de cerdos, ovejas y ciervos (Doyle, 1991). Muchos brotes están asociados con ingesta de carne bovina; quesos y alimentos de origen vegetal. De los alimentos de origen vegetal se ven con frecuencia involucrados, lechuga y jugo de manzana sin pasteurizar. El microorganismo se disemina tanto a través de aguas contaminadas (agua potable/ de uso doméstico, agua de piscinas o de lagos) como a través del abono o también por el personal que maneja los alimentos. La fuente de la contaminación del jugo de manzana con *E.coli* es atribuida al contacto de los frutos con materia fecal de origen animal. Habitualmente la contaminación ocurre en la huerta donde entran animales de producción o animales salvajes y después las manzanas caen en el suelo. Si estas manzanas en continuación se recogen para la producción de jugo *E.coli* se puede introducir en el jugo.

1.6.2. *Listeria* sp

Listeria es un bacilo Gram positivo, móvil, microaerófilo o anaerobio facultativo ampliamente distribuido en la naturaleza. No forma esporas. Es saprofita y por ello, sus principales reservorios son el suelo y la materia orgánica. Se aísla a partir de suelo y vegetación, materia fecal humana y animal, alimentos crudos, alimentos listos para consumir, aves, mariscos, lácteos y vegetales. *Listeria* sp puede sobrevivir condiciones extremas tales como las altas concentraciones de sal, el alto pH y muy bajas o altas temperaturas.

Tabla 1.1 Principales brotes asociados con jugo de manzana

Año	Microorganismo	Alimento Involucrado	Número De Casos	País	Referencia
1923	<i>Salmonella Typha</i>	Sidra	24	EE.UU	Parish, 2000
1974	<i>Salmonella Typhi</i>	Sidra	300	EE.UU	Anonymous, 2000
1980	<i>E. coli O157:H7</i>		14	Canadá	
1993	<i>Cryptosporid. spp</i>		213	EE.UU	
1996	<i>E.coli O157:H7</i>	Jugo	71	EE.UU	Clarke, 1996
1996	<i>E.coli O157:H7</i>	Jugo	14	EE.UU	Anonymous, 2000
1996	<i>E.coli O157:H7</i>	Sidra	6		
1996	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Sidra	32		
1998	<i>E.coli O157:H7</i>	Sidra	14	Canadá	Anonymous, 1999
1999	<i>E.coli O157:H7</i>	Sidra	5	EE.UU	Anonymous, 2000

En particular, *Listeria innocua* tiene características muy similares con la pariente patógena, *Listeria monocytogenes*. Se utiliza en su lugar como subrogante con fines de investigación justo por la falta de patogenicidad y respuesta semejante. Hay numerosos estudios que confirman la aptitud del uso de *L. innocua* en lugar de *L. monocytogenes*. Char (2006), utilizó un proceso de preservación para jugo de naranja que contemplaba la aplicación de un tratamiento térmico suave y agregado de antimicrobianos naturales (vainillina y/o citral) y demostró que *L. innocua* fue aún más resistente que la especie patógena. Lo mismo se demostró estudiando la inactivación de las dos especies durante la pasteurización de leche (Piyasena y col., 1998) y también estudiando su capacidad de recuperación tras inactivación térmica en distintos caldos nutritivos (Busch y Donnelly, 1992).

En los EE.UU la industria alimentaria se rige por una estrategia de tolerancia cero con respecto de *L. monocytogenes* en alimentos listos para consumir (Gailunas, 2003) porque la dosis infecciosa es aún desconocida. La listeriosis se manifiesta esporádicamente pero también puede causar epidemias debidas a la ingesta de alimentos contaminados. *Listeria monocytogenes* ha sido asociada con alimentos tales como la leche cruda, leche inadecuadamente pasteurizada, quesos frescos, helados, vegetales crudos, jugos sin pasteurizar, embutidos crudos fermentados, aves, carne cruda, y pescado ahumado. 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°C (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 col., (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°C y de 5 días a 30°C. 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.

1.6. 3. *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae es un microorganismo ubicuo y un alterante muy común para frutas y granos. Este microorganismo ha sido utilizado por el hombre desde la antigüedad en la fermentación del mosto para la producción del vino, la elaboración de la cerveza y la elevación del pan. Es el primer microorganismo que se produjo a nivel masivo para uso industrial y domestico. Por todas estas razones es un microorganismo cuyas características están muy bien definidas y suma las siguientes ventajas como "microorganismo modelo" para uso en investigación con diversa orientación científica.

-  Tiene una proliferación celular rápida
-  No es patógeno
-  Es fácil de cultivar en placas Petri
-  Da la posibilidad de aislar los mutantes si esto se considera necesario
-  Tiene un sistema genético bien definido
-  Es disponible a grandes cantidades
-  Tiene versatilidad con respecto a las técnicas de manipulación genética

1.7. Tecnologías emergentes para la preservación de alimentos

La seguridad alimentaria parece ser hoy en día, una consideración de primordial importancia para los consumidores y la preocupación más grande de la industria alimentaria y los servicios gastronómicos en todo el mundo. La demanda creciente de comidas preparadas fuera del hogar, compradas en los supermercados "casi listas" y refrigeradas para que sean consumidas en domicilio, requiere de medidas adicionales en cuanto a la preservación de su calidad microbiológica y organoléptica.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) constituyen una causa de muerte o enfermedad grave que en la mayoría de las veces afectan personas con sistema inmune débil y pocas veces a individuos sanos. La implementación del sistema HACCP, los tratamientos térmicos y la cadena de frío ayudan reducir la incidencia de ETAs. Sin embargo, las infecciones e intoxicaciones alimentarias debidas a distintos microorganismos siguen afectando la salud de la población y siguen causando grandes pérdidas económicas en la industria. Los últimos años, inclusive se ve un aumento en los casos documentados de enfermedades asociadas con el consumo de frutas y verduras frescas (Center for Disease Control and Prevention, 1999 y 2000). Además, dado el tamaño de la producción del alimento involucrado, pueden constituir "brotes" y afectar gran parte de la población.

La tendencia actual se dirige a alimentos que requieran menos tiempo de preparación y tengan vida útil prolongada pero que a la vez mantengan las características de los alimentos frescos. La nueva generación de consumidores busca alimentos sometidos a procesamientos menos drásticos con menor contenido de aditivos químicos, densidad calórica y colesterol. Estos cambios son muy significativos desde el punto de vista microbiológico y por lo tanto, se hace necesario, el desarrollo de nuevas tecnologías de preservación denominadas comunmente tecnologías emergentes con el fin de desarrollar productos de alta calidad asegurando al mismo tiempo la inocuidad de su consumo. (Barbosa-Cánovas y col., 1998; Rahman, 1999; Juneja y Sofos, 2002). Estas nuevas tecnologías incluyen métodos de preservación físicos, no térmicos, y la incorporación en los alimentos de aditivos naturales poco convencionales. Los métodos de preservación "emergentes" de los alimentos entregan la mayoría de las veces cantidades de energía menores y apuntan más específicamente a cambios bioquímicos con fin de disminuir las "pérdidas colaterales" de nutrientes y caracteres organolépticos. Estos procesos incluyen métodos físicos como la utilización de campos eléctricos (Castro y col., 1993), altas presiones (Zimmerman y col., 1993), campos magnéticos oscilantes (Pothakamury y col., 1993), pulsos de luz (Dunn y col., 1988), ultrasonido y radiaciones ionizantes (Thorne, 1991) estando algunas de estas metodologías comercialmente disponibles mientras que otras se encuentran en diferentes estadios de investigación.

Muchas veces la aplicación de un sólo método no es suficiente para la conservación de un producto y medidas adicionales se requieren con fin de conseguir la estabilidad y seguridad deseada.

La FDA estableció en un reporte del año 2000, para regular la aplicación de tecnologías emergentes, 5 reducciones decimales para patógenos emergentes tales como *L. monocytogenes* (FDA, 2000a).

1.7.1. Luz ultravioleta

1.7.1.1. La naturaleza de la luz ultravioleta y el daño celular

Como radiación se define a la propagación y emisión de energía a través del espacio o la materia. El espectro electromagnético contiene diferentes tipos de radiación de distinto poder de penetración, frecuencia y longitud de onda. La luz visible constituye solamente una estrecha banda del espectro la cuál incluye: las ondas de radio, rayos infrarrojos, luz ultravioleta, rayos X, radiación gama y los rayos cósmicos.

La radiación UV ocupa una banda ancha de longitudes de onda de la región no ionizante del espectro electromagnético entre los rayos X (100 nm) y la luz visible (400 nm) (Figura 1.4). Por una cuestión más bien práctica el espectro de UV se divide en cuatro regiones (Bolton, 2001):

- **UV de onda larga (UVA)** con longitudes de onda en el rango 320–400 nm. Constituye el 98,7 % de la radiación ultravioleta proveniente del sol que alcanza la superficie de la tierra. Es responsable del efecto del bronceado de la piel tras la exposición del hombre. Es capaz de provocar daño indirecto al DNA de las células.
- **UV de onda media (UVB)** con longitudes de onda en el rango 280–320 nm. La mayor parte de la misma se filtra por las capas superiores de la atmósfera. Tradicionalmente se considera la región perjudicial para la salud humana. Sin embargo esta fracción de la luz UV es la que induce la formación de la vitamina D en la piel. También se responsabiliza de quemaduras de la piel y es culpable del

daño directo del DNA de las células que puede terminar en desarrollo de melanomas (cancer de la piel).

- **UV onda corta (UV-C)** con longitudes de onda que oscilan en el rango 280- 200 nm. Esta fracción de la luz ultravioleta se filtra en las capas superiores de la atmósfera, más específicamente en la capa de ozono. Las radiaciones UVB y UV-C son responsables de la formación del ozono en las capas superiores de la atmósfera. Es también la región germicida del espectro siendo más eficientes los tratamientos entre los 250-270 nm .

- **Vacío UV** con longitudes de onda entre 100 y 200 nm

La luz se puede considerar como una corriente de energía. La cantidad de energía que puede llevarse por la luz es proporcional a su frecuencia e inversamente proporcional a su longitud de onda según:

$$E = h \cdot f = h \cdot c / \lambda \quad (1.1)$$

donde E = energía emitida ; h =constante de Plank; f = frecuencia y λ =longitud de onda .

Cuando un rayo de luz de suficiente energía se absorbe en la materia causa un cambio físico o químico. Los átomos y moléculas absorben solamente estas longitudes de onda que proveen justo la cantidad de energía que necesitan para cambiar su estado (López-Malo y Palou, 2005). La alta absorbancia del UV se asocia con la capacidad de las bases de purina y pirimidina de absorber la luz a estas longitudes de onda. La radiación UV-C daña el DNA de las células expuestas causando enlaces entre las bases adyacentes de timina en cadena de DNA (Figura 1.5). Las bases de pirimidina son particularmente susceptibles a la radiación UV-C induciendo la formación de dímeros covalentemente ligados entre las bases adyacentes. Si estos dímeros llegan a un número crítico la correcta replicación del DNA se impide y consecuentemente la reproducción se hace imposible. (Shama,1999). El daño principal que causa la radiación UV es en la molécula de DNA pero las proteínas también se pueden afectar alterando así sus funciones básicas dentro de la célula.

1.7.1.2. La radiación ultravioleta en la tecnología de los alimentos

En tecnología de alimentos los tipos de radiación que más utilización encuentran actualmente son la radiación gama, la radiación ultravioleta y las microondas (Mendonça, 2002). El efecto bactericida de la radiación ultravioleta se conoce desde principios del siglo XX, sin embargo, su aplicación no fue posible hasta 1940 cuando se comercializaron las primeras lámparas que emitían a esta longitud de onda (López-Malo y col., 2005). El uso de la luz ultravioleta como una tecnología de preservación es relativamente nuevo, prometedor y que con algunas precauciones es altamente aplicable y letal para la mayoría de los microorganismos (Bintsis y col., 2000). A continuación se enumeran algunas de las ventajas más destacadas:

- Es un proceso frío, no afecta significativamente la temperatura del alimento, ni su contenido de humedad, y por lo tanto no causa daño térmico al producto
- No se requieren químicos consumibles
- No existe riesgo de sobredosis
- Tiene bajo consumo de energía
- No favorece la formación de sustancias extrañas
- No deja residuos químicos ni radioactividad residual en el producto (tal como ocurre con la radiación gama)
- No tiene restricciones legales
- No requiere equipamiento de seguridad adicional y es bastante seguro para el personal que maneja el equipo
- Es de fácil aplicación y no requiere personal especializado para su aplicación
- Tiene bajo costo de inversión, funcionamiento y mantenimiento
- Es eficiente para varios bacterias, hongos, levaduras y parásitos

Figura 1.5.a. El espectro electromagnético

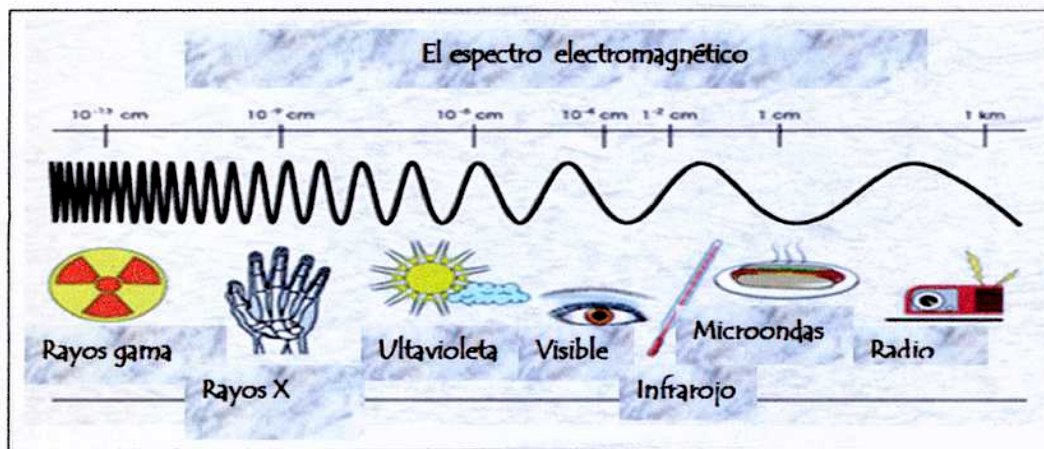
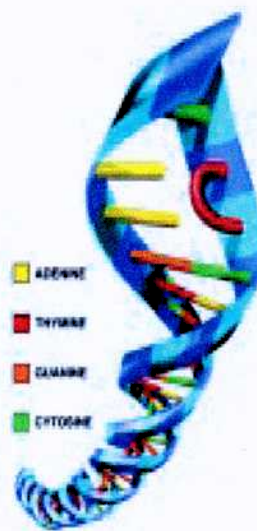


Figura 1.5.b. Daño celular provocado por radiación UV-C

DNA normal



DNA modificado por UV -C



Su aplicación más común constituye una alternativa a la cloración del agua, muy popular en varios países europeos y en los EE.UU desde hace unas décadas. La radiación UV-C se usa para la desinfección de grandes cantidades de microorganismos en aguas potables y residuales (Gray, 1994; Bolton, 2001; Shama, 1999; Bintsis y col, 2000) y en la piscicultura (Summerfelt, 2003). En la industria alimentaria, farmacéutica y hospitales se usa para esterilización de superficies, utensilios, aire y también material de empaque. En los EE.UU ya está aprobado el uso de la radiación UV para el tratamiento establecido de reducción 5 ciclos logarítmicos del patógeno más resistente en jugos frutales y vegetales con el requerimiento adicional del flujo turbulento (FDA, 2000a). En cuanto a los cambios organolépticos que pudiera introducir el uso de la radiación ultravioleta, es conocido que promueve la oxidación de lípidos en carne y leche a través de reacciones fotoquímicas (Bintsis, 2000). Koutchma y col.(2004) reportaron que no se observó diferencia entre sidra de manzana tratada con luz UV-C y un control, utilizando un panel de evaluación sensorial. Oteiza (2007) trabajando con dosis de luz UV-C de 1,60 J/cm² para irradiar jugo de naranja, concluyó que la calidad sensorial del jugo tratado fue similar a la del jugo exprimido fresco sin tratar que se utilizara como control.

1.7.1.3. Susceptibilidad de los microorganismos a la luz UV

Con excepción de las bacterias fotosintéticas la mayoría de los microorganismos muestran susceptibilidad al daño ultravioleta (López-Malo y Palou, 2005). Los distintos microorganismos requieren de una dosis específica para ser inactivados. Diferencias entre especies y dentro de la misma, dependiendo de la cepa, el medio de crecimiento, el estado del cultivo (Chang y col, 1985; Wright y col, 2000), la densidad de los microorganismos y otras características como el tipo y la composición del alimento pueden constituir factores importantes. Los hongos y levaduras como microorganismos de mayor tamaño, son más resistentes que las bacterias. Los virus son más resistentes que las bacterias (Adams y Moss, 1995), mientras que los protozoos, que también constituyen patógenos

transmitidos por los alimentos, presentan cierta resistencia al tratamiento con luz UV (Shama, 1999; Bolton, 2001; Hoyer, 1998; Sastry y col., 2000). Las esporas bacterianas demuestran máxima resistencia y las dosis aplicadas usualmente no llegan a destruirlas. El estado fisiológico de las células también es un factor importante relacionado con la susceptibilidad de los microorganismos. En general se considera que las células cuando se encuentran en la fase estacionaria son más resistentes que las que se encuentran en fase exponencial.

1.7.1.4. Fenómeno de reactivación

Varios microorganismos que tienen un sistema metabólico funcional poseen diversos mecanismos de reparación de los ácidos nucleicos dañados (Jagger, 1967). La reparación del daño provocado por UV puede ser realizada:

- mediante la luz visible

- en oscuridad

La reparación que utiliza la luz se conoce bajo la denominación fotoreparación o fotoreactivación y requiere exposición a la luz visible, concretamente a longitudes de onda en el rango de 330–430 nm. Ocurre mediante la acción de la enzima fotoliasa, la cual debe activarse en el UV cercano o en el azul-violeta de la región visible del espectro. En este caso, la dimerización de bases nucleotídicas adyacentes provocada por la luz UV sobre los ácidos nucleicos, se monomeriza por la acción de la enzima. Para los jugos frescos, este mecanismo de reparación es importante dado que muchas veces se envasan en material transparente y están expuestos a la luz en los estantes de los supermercados. Para evitar esta desventaja del proceso, una estrategia posible es mantener el producto bajo refrigeración y/o en envases oscuros (Guerrero-Beltrán y col, 2004).

El otro mecanismo mencionado incluye el proceso reparatorio en oscuridad, el cual se realiza en ausencia total de la luz. Se refiere a la capacidad de reparación del DNA

de los microorganismos vía diferentes métodos sin la participación de la enzima fotoliasa. Estos métodos no son exclusivos para la reparación del daño causado por radiación ultravioleta y pueden prevenir a la célula de mutaciones (Guerrero-Beltrán y col, 2004).

1.7.1.5. Dosificación

La dosis de radiación recibida por el fluido irradiado en flujo continuo se calcula según:

$$D = I_{254} \cdot t \quad (1.2)$$

donde I_{254} es la intensidad de la luz incidente calculada según se describe posteriormente (véase ecuación 1.4); t es el tiempo de residencia calculado a su vez para un fluido a partir de:

$$t = V/F \quad (1.3)$$

donde V es el volumen de la cámara de irradiación y F la velocidad de flujo de la alimentación.

Para evaluar la dosis real recibida por la muestra tratada se tiene que tomar en cuenta la atenuación de la intensidad de la luz emitida por la fuente según la ley de Lambert-Beer:

$$I = I_0 \exp^{-a \cdot d} \quad (1.4)$$

donde I es la intensidad atenuada; I_0 es la intensidad monocromática incidente; a es el coeficiente de absortividad del material y d es la profundidad alcanzada por la luz UV.

Los términos relacionados que también se usan para evaluar los tratamientos con luz UV son:

Irradiancia (E) es la magnitud que describe la potencia incidente de radiación por unidad de superficie. En el Sistema Internacional sus unidades son Watt/m^2 .

Dosis de radiación ultravioleta es el total de la energía radiante recibida. Se calcula multiplicando la irradiancia por el tiempo de exposición. El término se usa frecuentemente en la literatura y representa la exposición de un dado microorganismo al rango germicida de la luz UV. Se mide en Joule/m^2 .

Para la mayoría de las bacterias, levaduras y virus se considera que una dosis de 100 J/m^2 es suficiente en soluciones que no muestran una significativa absorbancia de la luz UV. Cuando en una solución están presentes esporas fúngicas o bacterianas se necesitan dosis superiores. En alimentos con sustancias disueltas y partículas suspendidas, tales como los jugos de fruta se recomiendan dosis no inferiores a 400 J/m^2 (Sastri y col., 2000).

1.7.1.6. Fuentes de la luz UV

Como se ha mencionado anteriormente la radiación ultravioleta es parte de la radiación del sol que alcanza este planeta. La UV-A es el tipo de UV que más se encuentra en la superficie de la tierra ya que a las longitudes de onda más cortas del UV se les niega el pasaje por la capa de ozono que se ubica en la estratosfera. Esto hace que no podamos usar la fuente solar para aprovechar las propiedades germicidas de UV-C y tengamos que recurrir a fuentes artificiales, comúnmente las lámparas de mercurio. Existen distintas lámparas de emisión de luz UV:

- luz UV-A: Este tipo de lámparas son de mercurio que emiten tanto UV-A como también luz visible pero luego las longitudes de onda más largas que los 400 nm se filtran por el material de recubrimiento de la lámpara (Figura 1.6).
- Luz UV-A y UV-B: lámparas de las camas solares que producen el bronceado artificial y emiten en UV-A y UV-B.

- Luz UV-C: de uso industrial que se usan para descontaminación de superficies y líquidos. Estas emiten en la región germicida como ya se vio anteriormente, a los 254nm que es la banda resonante de mercurio (Figura 1.6).

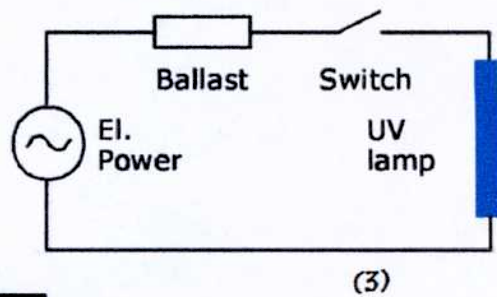
Las lámparas que emiten a 254 nm funcionan a baja o media presión. La parte exterior es el recubrimiento de cuarzo fundido, el cual permite el máximo de la transmisión de la radiación UV (aprox. 90% de la energía irradiada). En el interior hay una pequeña cantidad de gas de mercurio (funcionamiento a bajas presiones) y un gas inerte, habitualmente argón. El último no tiene un papel funcional sino secundario extendiendo la vida útil de los electrodos y reduciendo la pérdidas térmicas. Dentro de la lámpara se encuentran también los electrodos de tungsteno a través de los cuales se aplicará el voltaje apropiado para la formación del arco de mercurio. La aplicación de alto voltaje provocará la excitación de los átomos de mercurio o sea hará que pasen a un nivel de energía mayor. Al volver los electrones de los átomos excitados a su estado normal (a un nivel de energía menor) emitirán la energía restante en forma de luz ultravioleta, a los 254 nm (Figura 1.6).

1.7.1.7. Problemas y limitaciones

La mayor desventaja del uso de la luz ultravioleta con fines de desinfección es el poco poder de penetración que tiene la misma. Así por ejemplo, en agua destilada, a 40 cm debajo de la superficie, la luz ultravioleta pierde 30% de su intensidad (Bintsis, 2000). La penetración en un líquido depende de la naturaleza del líquido: los sólidos solubles disminuyen la intensidad de la radiación que penetra en el líquido mientras que las partículas suspendidas pueden bloquear la incidencia de la luz en la carga microbiana (Shama, 1999, Bintsis y col., 2000) Además de las moléculas de DNA, las proteínas y las bases también absorben la luz ultravioleta.

Figura 1. 6.

a) Aspecto de una lámpara UV-A (1) y UV-C (2) y circuito relacionado (3)



b) lámpara UV-C germicida instalada para la sanitización de productos



La absorción de la radiación a partir de distintos alimentos es proporcional a su contenido en las sustancias nombradas: la concentración de azúcares, sales, otros sólidos solubles, las partículas suspendidas y además del color del medio, el tipo y la concentración de la carga microbiana. Es por ello que hasta ahora su uso se limita a la desinfección de superficies y aguas (líquido transparente) y a lo mismo apunta el requerimiento adicional del flujo turbulento en cuanto a la desinfección de jugos.

Así como en los alimentos, también en el caso de las superficies y del aire las partículas y la grasa presentes, la humedad y suciedad o en el caso del aire, los aerosoles, juegan un papel protector a favor de los microorganismos impidiendo que los rayos de UV los alcancen. Cabe añadir que el uso de UV-C está aprobado para la desinfección de superficies de alimentos (FDA, 2001).

La otra limitación que se tiene que tomar en cuenta es reactivación que pueden presentar los microorganismos tras una exposición subletal a radiación ultravioleta (véase ítem 1.7.4).

1.8. La microbiología predictiva como herramienta de análisis

En muchos alimentos, el control de los microorganismos, ya sean patógenos y/o deteriorativos, depende de la combinación de factores de preservación donde generalmente ocurren situaciones sinérgicas, por lo que se requiere menor intensidad de los factores cuando éstos se aplican en forma simultánea. Por lo tanto, si se quieren 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 y/o la inactivación. Los modelos matemáticos son la mejor manera de hacer predicciones bajo estas circunstancias.

Una herramienta para el desarrollo de tecnologías para poder estimar la conducta microbiana, es la aplicación de la microbiología predictiva (Mc Meekin y col., 1993). La microbiología predictiva consiste en el desarrollo de modelos matemáticos para predecir

la velocidad de crecimiento o de declinación de los microorganismos bajo un dado conjunto de condiciones ambientales. El conocimiento detallado de las respuestas de crecimiento de los microorganismos frente a las condiciones ambientales, es decir, el conocimiento de la ecología microbiana, permite evaluar objetivamente el efecto del procesamiento, la distribución y el almacenamiento en la seguridad microbiológica y la calidad de los alimentos. Utilizando diseños experimentales adecuados y modelos matemáticos apropiados, la microbiología predictiva permite la selección de los factores de preservación para alcanzar la vida útil deseada de diversos alimentos.

El modelado microbiano comenzó aproximadamente en 1920 con los cálculos del tiempo de muerte térmica y el uso de los valores D (tiempo de reducción decimal) y z (grados de variación en la temperatura, necesarios para reducir el valor de D en un 90%), para describir la resistencia térmica bacteriana. En la década del '70, se profundizó principalmente en el modelado de la probabilidad de producción de toxinas de *C. botulinum*, principalmente en USA y en el Reino Unido (Roberts e Ingram, 1973). En los años '80, el marcado incremento en la incidencia de brotes de enfermedades producidas por alimentos, llevó a tomar conciencia pública de la necesidad de un abastecimiento seguro de alimentos. En ese momento, los microbiólogos de alimentos comenzaban a aceptar que los métodos microbiológicos tradicionales para determinar la calidad y seguridad alimenticia, estaban limitados por el tiempo requerido para obtener los resultados y que los métodos indirectos basados en cambios químicos, físicos o fisicoquímicos, no proporcionaban una respuesta hasta que un gran número de células se encontraba presente. Lo mismo ocurría con varios métodos rápidos que necesitaban, o bien un alto nivel de contaminación para que la respuesta sea evidente, o dependían del uso de equipamiento muy sofisticado y oneroso.

Antes del advenimiento de la microbiología predictiva, la mayor parte de la bibliografía definía las condiciones ambientales limitantes del crecimiento, cuando los demás factores ambientales se encontraban en los valores óptimos. Además, sólo ocasionalmente los efectos de dos o más factores de conservación se estudiaban de tal forma que permitieran cuantificar la interacción de los mismos. A consecuencia de ello,

muchos de estos datos no eran de utilidad o bien no permitían predecir la respuesta microbiana.

Si bien el modelado no revela comportamientos microbianos extraños o poco esperados, los modelos se pueden usar para predecir, por interpolación, el crecimiento bajo una combinación de condiciones que no fueron específicamente testeadas en el protocolo experimental (Whiting, 1995).

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 (López-Malo, 2000; Alzamora y col., 1995).

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 (UFC/mL), 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: la función de Gompertz para crecimiento exponencial; el modelo de Gompertz modificado para describir la inactivación microbiana; modelos para describir la declinación no lineal de esporas sobrevivientes con el tiempo; el modelo logístico aplicado a destrucción térmica; el modelo de Stannard; el modelo de Schnute; la ecuación de Fermi; el modelo de distribución de frecuencias tipo Weibull; etc. (Mc Meekin y col., 1993; Peleg y Cole, 1998).

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, 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 a los microorganismos "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.

El progreso en la microbiología de alimentos ha sido impresionante. 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.

1.8.1. Modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull

La inactivación de los microorganismos debida a la exposición al calor se consideró tradicionalmente ser gobernada por una cinética de primer orden. Sin embargo en muchas las curvas de supervivencia de diversos microorganismos se observó un desvío de la linealidad mostrando una ligera curvatura/concavidad. La última es una observación sumamente importante especialmente tomando en cuenta la práctica común de extrapolación de los resultados que subestiman o sobrestiman el efecto mortal del proceso según la forma de la curva. Una explicación alternativa para las respuestas microbianas no lineales es la que nos dice que la curva de supervivencia es una forma acumulativa de una distribución temporal de eventos letales (Peleg y Cole, 1998). Según este concepto, los distintos individuos de una población microbiana presentan distintos tiempos de inactivación y/o muerte. La forma de la curva de supervivencia se define a partir de la distribución de las distintas resistencias de los individuos que

constituyen esa población. El modelo refleja las diferencias en la resistencia de diversas poblaciones microbianas a distintos procesamiento y factores de estrés aplicados a través de la moda, la varianza y el sesgo de la distribución. El modelo no toma en cuenta los mecanismos específicos que causan la muerte o la inactivación, simplemente describe su manifestación en una dada población microbiana (Peleg y Cole, 1998).

La aproximación tradicional de inactivación de los microorganismos se basa en la suposición que todos los individuos tienen la misma resistencia y de hecho los individuos se inactivan una vez recibida cierta cantidad del factor de estrés. La velocidad de inactivación entonces se describe a partir de la siguiente ecuación diferencial.

$$-dN/dt = kN \quad (1.5)$$

donde N es la población microbiana; dN/dt , la velocidad de inactivación y k , constante de la reacción (1/unidades de tiempo). El modelo de Weibull asume la población microbiana al recibir cierto tratamiento se puede encontrar en dos estados: viva o inactivada. En este caso la función de supervivencia de cada individuo microorganismo miembro de dicha población será:

$$\text{Para } t < t_{ci} \quad S_i(t) = 1 \text{ (vivo)} \text{ y } t \geq t_{ci} \quad S_i(t) = 0 \text{ (inactivado)}$$

donde t_{ci} marca el tiempo que un microorganismo pierde viabilidad. Queda claro que t_{ci} nos indica la sensibilidad o resistencia de un individuo o una población respecto con su tamaño. La función de supervivencia de la población que constituyen los microorganismos anteriormente mencionados en este caso se da a partir de:

$$S(t) = \sum S_i(t) \quad (1.6)$$

Si ahora consideramos que en una población grande tal como son la mayoría de las comunidades microbianas, la resistencia expresada en términos de t_{ci} tiene una distribución continua, la función anterior se puede escribir:

$$S(t) = \int_0^1 f[t, t_c(\phi)] d\phi \quad (1.7)$$

donde $f[t, t_c(\phi)]$ es función del tiempo de exposición y la fracción de microorganismos ϕ , comparte cualquier tiempo de muerte, t_c . Asumiendo que la ecuación es válida y que t_c tiene una distribución tipo Weibull, entonces:

$$d\phi/dt_c = bn t_c^{n-1} \exp(-b t_c^n) \quad (1.8)$$

donde b y n son constantes y la ecuación en forma semilogarítmica se transforma en

$$\log S(t) = -b t^n \quad (1.9)$$

Los parámetros b y n se utilizan para calcular los parámetros de frecuencia de las distintas curvas y la evaluación final de los resultados según:

📊 **Moda (t_{cm}):** es el tiempo de irradiación al que se inactiva la mayoría de la población, es decir a la máxima frecuencia:

$$t_{cm} = [(n-1)/nb]^{1/n} \quad (1.10)$$

📊 **Media ($\bar{t}_0$):** es el valor medio de los distintos tiempos de inactivación

$$\bar{t}_0 = \{\Gamma[(n+1)/n]\}/b^{1/n} \quad (1.11)$$

📊 **Varianza (σ_{tc}^2):** es la varianza de la media

$$\sigma_{tc}^2 = \{\Gamma[(n+2)/n] - (\Gamma[(n+1)/n])^2\}/b^{2/n} \quad (1.12)$$

📊 **Coeficiente de sesgo (skewness) (v_1):** es el sesgo de la distribución y está relacionado a los miembros más resistentes de la población microbiana:

$$v_1 = \frac{[\Gamma(n+3/n)/b^{3/n}]}{[\Gamma(n+2/n)/b^{2/n}]^{3/2}} \quad (1.13)$$

2-OBJETIVOS



2.1. Objetivo general

Los jugos frutales constituyen una categoría importante de alimentos en términos de consumo debido a su elevada la calidad nutricional, funcional y a sus atributos sensoriales. Económicamente, las frutas ocupan un lugar destacado en el comercio, tanto local, como de importación y de exportación.

Los consumidores actuales asocian alimentos sanos y seguros con alimentos frescos o mínimamente procesados, rechazando el agregado de antimicrobianos sintetizados químicamente y los procesamiento severos que modifiquen considerablemente la calidad nutricional y sensorial de los mismos. Así, la industria frutícola está hoy en día muy influenciada por tres puntos específicos: inocuidad química y microbiológica, beneficio en la salud y características organolépticas de excelencia (en lo posible, similares a la fruta fresca de la que provienen).

Recientemente se publicó una evaluación crítica de la información científica disponible sobre las tecnologías alternativas de conservación de alimentos, tanto térmicas como no térmicas (FDA, 2000b) (i.e. microondas, calentamiento óhmico, altas presiones hidrostáticas, pulsos eléctricos, pulsos de luz, campos magnéticos oscilantes, luz ultravioleta, ultrasonido y rayos X). En la medida en que hubieran datos disponibles, se describieron los mecanismos de acción en los microorganismos y la cinética de inactivación; se identificaron los patógenos más resistentes a cada tecnología y las formas de validar la efectividad de la inactivación microbiana; se analizaron los factores críticos de los procesos y se describieron las desviaciones posibles de los mismos y la forma de manejarlas. También se reportaron los efectos sinérgicos con otros factores mencionados en la bibliografía y las necesidades de investigación de cada técnica. Las limitaciones principales aplicables a todas o casi todas las técnicas alternativas pueden resumirse en los siguientes puntos:

- Las curvas de supervivencia por lo general no siguen una cinética de primer orden, y por lo tanto la cinética debe cuantificarse usando modelos matemáticos ajustados a cada tecnología. La cantidad de datos experimentales existentes (no siempre

confiables) no permite la comparación entre distintas técnicas y deben tomarse precauciones cuando estos parámetros cinéticos se usan para desarrollar procesos o comparar la resistencia de diferentes poblaciones microbianas.

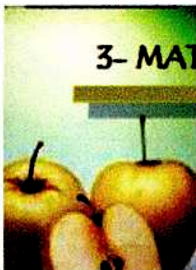
- Los modos de acción de las distintas tecnologías alternativas no están totalmente identificados.
- No se ha evaluado la sinergia, aditividad o antagonismo de la combinación de procesos alternativos entre sí o con otros factores antimicrobianos tradicionales
- Para los procesos alternativos que no se basan en la aplicación de calor se necesita todavía identificar los microorganismos patógenos y deteriorantes más resistentes a los tratamientos y también los microorganismos no patógenos subrogantes de los patógenos de mayor resistencia a los fines de la validación del proceso a niveles piloto e industrial.

El objetivo general de este trabajo es evaluar el efecto de la utilización de luz ultravioleta de onda corta (254 nm) como una tecnología novel alternativas a la pasteurización de jugo de manzana con el fin de inactivar microorganismos patógenos y deteriorativos prolongando así la vida útil del producto. Muchas de las tecnologías emergentes, consideradas como métodos físicos para la conservación de alimentos, se encuentran todavía en estudio y su aplicación a alimentos de manera industrial es en muchos casos incierta, ya que se requiere de mayores investigaciones de naturaleza básica. En particular, la irradiación con luz UV de onda corta (254 nm) presenta muchos interrogantes a resolver tales como la influencia del equipo de procesamiento, condiciones de operación, la influencia de la matriz alimenticia y su poder de atenuación de la luz, sensibilidad microbiana muy variada entre e intra especies; etc. Así mismo, la integración de los distintos aspectos evaluados permitirá poder explicar y predecir el comportamiento microbiano frente a esta nueva tecnología, aportando conocimientos para optimizar el procesamiento y conservación de jugo de manzana.

2.2. Objetivos específicos

- Diseño; puesta a punto y determinación de las variables operativas y factores críticos de un equipo de irradiación con luz UV-C en flujo continuo utilizando un medio modelo y un microorganismo de prueba.
- Evaluación de un método reproducible de cuantificación de la dosis de irradiación UV-C recibida por el sistema.
- Evaluación del impacto de la matriz en la eficacia del proceso utilizando sistemas modelo y sistemas reales (jugos frutales clarificados ó integrales).
- Estudio de la efectividad de un proceso que utilice la luz UV-C y otros factores de estrés (pH; almacenamiento refrigerado; etc.) para inactivar en jugo de manzana microorganismos deteriorativos y microorganismos posibles indicadores de aquellos responsables de ETAs relacionadas con jugos frutales,
- Estudio de la variación de la respuesta de un microorganismo como contaminante único y cuando se encuentra en cócteles intra e inter -especie.
- Modelado y validación interna y externa de la cinética de inactivación de los microorganismos de estudio en el jugo de manzana utilizando como herramienta fundamental a la microbiología predictiva. Evaluación de la influencia de los factores de estrés aplicados a través de los parámetros obtenidos para el modelo predictivo seleccionado.
- Evaluación de una posible recuperación microbiana durante el almacenamiento del jugo de manzana procesado por luz UV-C
- Evaluación de las modificaciones en la flora nativa producidas por el tratamiento de irradiación con luz UV de jugo de manzana mínimamente procesado durante el almacenamiento del mismo.

3- MATERIALES Y METODOS



3.1. Etapas del ensayo

Este estudio se compuso de 3 etapas:

- 📌 Ensayos de reto microbiano con inóculos individuales y cócteles de microorganismos relevantes en sistema modelo y jugos frutales.
- 📌 Ensayos de evolución de la flora microbiana sobreviviente durante el almacenamiento refrigerado del jugo procesado luz UV-C
- 📌 Ensayos de evolución de flora nativa del jugo procesado con luz UV-C

3.2. Sistemas

Para los estudios de inactivación microbiana se utilizaron sistemas modelo y alimentos líquidos de diferentes características. Se utilizaron los siguientes sistemas modelo:

- a. Agua destilada con peptona 0,1%
- b. Agua destilada con peptona 0,1% con el pH ajustado a 3,0 con solución estéril de ácido cítrico (50% p/p).

y los siguientes sistemas frutales:

- c. Jugo de manzana comercial (marca TROPICANA, Argentina) sin conservantes declarados, pasteurizado, con pH variable en el rango 3,0 - 3,3 y contenido de sólidos solubles ~ 11,8 - 12,3 °Brix. Este jugo esterilizado fue seleccionado ya que no contenía ningún tipo de inhibidores microbianos.
- d. Jugo de manzana integral, exprimido en el laboratorio, envasado al abrigo de la luz y almacenado a -18 °C hasta su posterior utilización.

Tanto los jugos esterilizados como las manzanas para la obtención del jugo integral fresco fueron adquiridos en el mercado local durante los meses de marzo a enero. Las

manzanas y jugos fueron almacenados en refrigeración antes de la realización de los diferentes ensayos

3.3. Medios de cultivo

A lo largo del presente trabajo se emplearon diferentes medios de cultivo ya sea para el crecimiento ó recuento de diferentes microorganismos. La composición de cada uno de los medios de cultivo se detalla a continuación:

- 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: $7,3 \pm 0,2$.
- Caldo Tripteína Soja (CTS-E) (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina) composición (g/L): tripteína 17; peptona de soja 3; cloruro de sodio 5; fosfato di potásico 2,5; glucosa 2,5; extracto de levadura 6; pH del medio preparado: $7,3 \pm 0,2$.
- Agua Peptona bufereada (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina) composición (g/L): peptona 10; cloruro de sodio 5; fosfato di sódico 3,5; fosfato monopotásico 1,5; pH del medio preparado: $7,2 \pm 0,2$.
- Agar de Recuento en Placa (APC) (Merck, Darmstadt, Alemania) composición (g/L): peptona de caseína 5; extracto de levadura 2,5; D(+) glucosa 1; agar-agar 14; pH del medio preparado: $7,0 \pm 0,2$.
- Agar Sabouraud (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina) composición (g/L): peptona de carne 5,0; peptona de caseína 5,0; D (+) dextrosa 40,0; Agar 15,0; pH del medio preparado: $5,6 \pm 0,1$.

3.4. Microorganismos

Para la realización del estudio se utilizaron cultivos de los siguientes microorganismos de colección provistos por Medica-Tec SRL, Argentina:

Bacterias: *Escherichia coli* ATCC 35218; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Escherichia coli* ATCC 8738; *Escherichia coli* ATCC 11229 y *Listeria innocua* ATCC 33090 . Las mismas se sembraron en estrías de ATS-E y se incubaron a 37°C por 24 h, almacenando luego las estrías a 4 °C para su posterior utilización.

Levaduras: *Candida parapsilosis* ATCC 22019; *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256; *Zygosaccharomyces rouxii* ATCC 52519; *Picchia anomala* NRRL 3668 y *Saccharomyces cerevisiae* KE 162. Las mismas se sembraron en estrías de Agar Sabouraud y se incubaron a 27°C por 24 h, almacenando luego las estrías a 4 °C para su posterior utilización.

3.5. Preparación de los inóculos

3.5.1. Inóculos simples

Los inóculos simples se prepararon transfiriendo una ansada de una estría de cultivo fresco a un erlenmeyer conteniendo 20 mL de CTS-E e incubando a 37 °C en el caso de las bacterias; ó 20 mL de caldo Sabouraud enriquecido con 0,6% extracto de levadura e incubando a 27°C, en el caso de levaduras . Todos los inóculos se incubaron en agitación mediante el uso de un agitador orbital (Edmund Bühler Modelo KM 2, Darmstadt Alemania) durante 24 h de manera de obtener un cultivo en fase estacionaria. Alcanzado este período de incubación, se obtuvo un inóculo con una concentración aproximada de $\sim 10^8$ UFC/mL. De cada inóculo se tomaron 5 mL y se

colocaron en 500mL del medio utilizado en cada experiencia (jugo ó sistema modelo) justo antes del tratamiento, iniciando la irradiación UV-C con una concentración microbiana aproximada de $\sim 10^6 - 10^7$ UFC/mL.

3.5.2. Inóculos mixtos

Para la utilización de cócteles, se prepararon los inóculos individuales para cada cepa a utilizar tal como se describió en el apartado anterior. Antes de la realización de cada experiencia de irradiación con luz UV-C, se tomaron alícuotas idénticas de cada uno de los inóculos individuales, se mezclaron en un erlenmeyer de 50 mL junto con 5-6 mL de agua peptonada estéril. Se mezcló mediante un vortex durante 15 segundos e inmediatamente se procedió a la realización de la experiencia. Se utilizaron cócteles de a) distintas cepas de *E. coli* y b) diferentes levaduras. Para el caso a) se utilizó, con fines de comparación, un inóculo simple de *Escherichia coli* ATCC 35218 y para el caso b) el inóculo simple elegido fue *Saccharomyces cerevisiae* KE 162..

3.6. Obtención de jugo manzana integral para los ensayos de reto microbiano

Se utilizaron manzanas sanas, maduras, de variedad Golden adquiridas en el mercado local. Se seleccionó dicha variedad ya que la misma permitía una correcta manipulación y procesamiento, minimizando el deterioro de la fruta. Las manzanas se guardaron en refrigeración ($\sim 4^{\circ}\text{C}$) hasta su conveniente utilización. El jugo fue exprimido bajo condiciones asépticas en una cabina de bioseguridad clase II tipo A/B3 (Nuair Inc., Plymouth, MN, USA), utilizando manzanas previamente sanitizadas y un extractor de jugos de tipo hogareño (400 watts; 1 Litro; Black and Decker, modelo JE 1500, China) (Figuras 3.1 y 3.2).

Para el proceso de sanitización, todas las manzanas se cepillaron y se lavaron con agua y detergente, se dejaron en agua con hipoclorito de sodio al 1% durante 20 minutos y se enjuagaron con agua destilada. A continuación, las mismas se secaron con papel

absorbente embebido con alcohol y se dejaron en la cabina de bioseguridad durante 20 minutos bajo la luz UV-C para terminar el proceso de desinfección y secado superficial (Figuras 3.1 y 3.2). El mismo procedimiento se siguió para la sanitización de todos los utensilios que se utilizaron durante el proceso de obtención del jugo, incluidas las partes móviles del extractor de jugos.

Las manzanas sanitizadas se pelaron, cortaron, y se procesaron en el extractor de jugos dentro de la cabina de bioseguridad. El jugo así obtenido se filtró utilizando gasa estéril y recogiendo el filtrado en envases de vidrio estériles de 500 mL de capacidad. A continuación, se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos (centrífuga Rolco, modelo AMC 3550, Buenos Aires, Argentina) con el fin de disminuir la cantidad de pulpa y así evitar la precipitación por acción enzimática afectando la calidad del jugo. El pH del jugo se ajustó a 3,0 (+/- 0,2) con solución estéril de ácido cítrico (50% p/p). Posteriormente, el mismo se almacenó en frascos estériles color caramelo (500 mL) a -18 °C. Antes de la realización de cada experiencia los mismos eran descongelados durante aproximadamente 15 minutos a baño María en agua a ~ 50 °C.

3.7. Obtención de jugo de manzana para el estudio de la flora nativa

Para el estudio de evolución de flora nativa se siguieron las condiciones habituales bajo las cuales se obtiene el jugo en la industria y por lo tanto este jugo no se obtuvo en condiciones de esterilidad. Se utilizaron utensilios limpios y las manzanas se procesaron fuera de la cabina de bioseguridad. Dada la baja carga microbiana obtenida en los controles de calidad sanitaria del jugo (recuento de microorganismos aerobios totales en agar PCA, no se muestran resultados), se decidió procesar manzanas sobremaduras apenas lavadas con el fin de aumentar la carga microbiana en el jugo y así evaluar la efectividad del proceso de irradiación con luz UV-C en el caso de una contaminación más elevada de lo habitual. El jugo así obtenido se filtró y se centrifugó igual que el ítem anterior utilizándose inmediatamente después de su obtención con fin de no alterar cuantitativamente los microorganismos de la flora contaminante.

Figura 3.1. Procedimiento realizado para la satización de la fruta

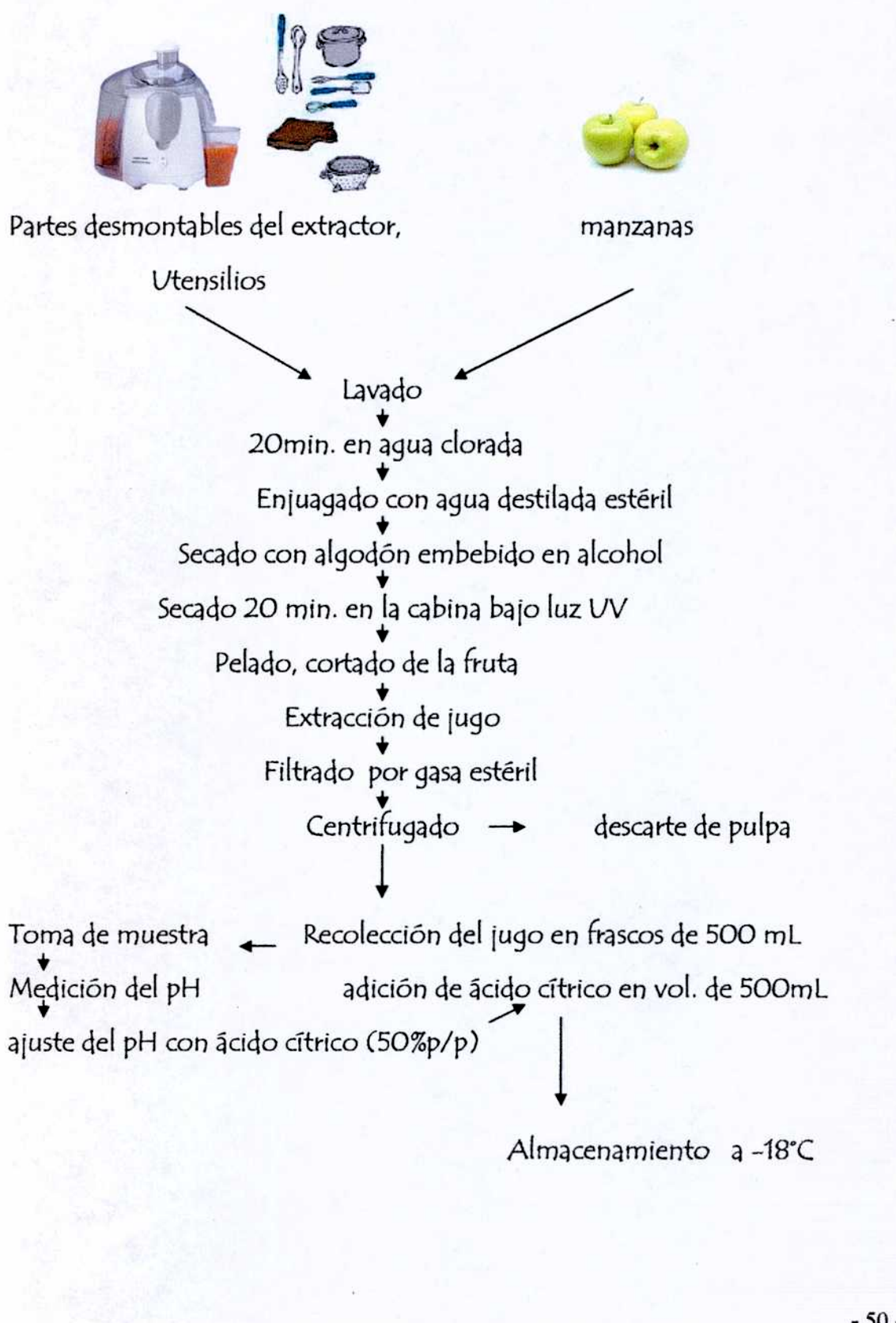
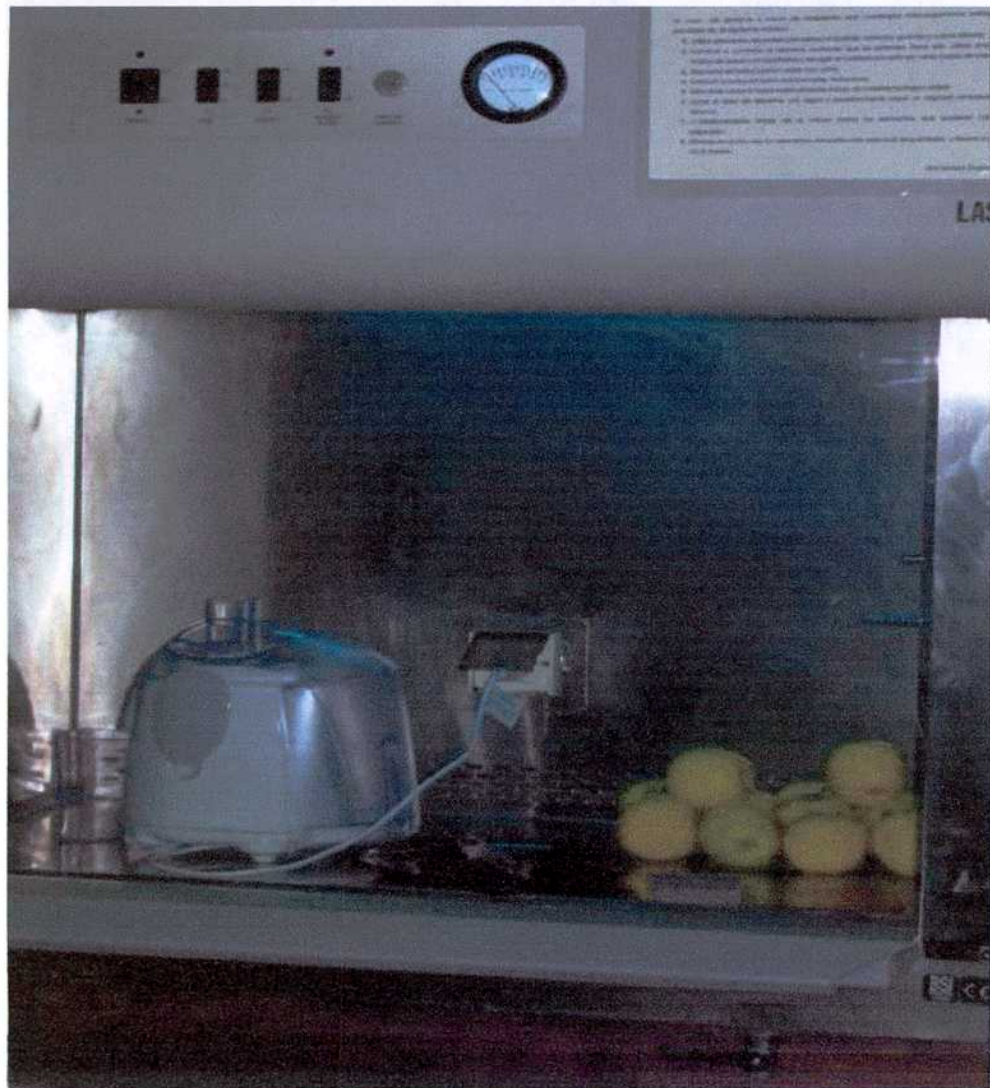


Figura 3.2. Manzanas, extractor de jugos y utensilios en proceso de sanitización en cabina de seguridad previo a la extracción del jugo.



3.8. Caracterización físico-química de los jugos utilizados

3.8.1. Determinación de pH y sólidos solubles

El pH de los jugos de manzana se midió utilizando un pHmetro PerpHect pH/ISE modelo 310 (Orion Research Inc., Beverly, USA).

La concentración de sólidos solubles (° Brix) se determinó utilizando un refractómetro digital PR-101 Palette (ATAGO Co. LTD, Japón). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

3.8.2. Determinación del coeficiente de absortividad de los jugos utilizados

Uno de los parámetros que influye en la efectividad de la irradiación con Luz UV-C es el coeficiente de absortividad (ver apartado 1.6.1.5), el cual se determinó para los jugos utilizados en este estudio (comercial y fresco).

Para la determinación de dicho coeficiente se prepararon distintas diluciones del alimento en agua destilada en el rango de 0,1% v/v a 1% v/v y se midió la absorbancia a 254 nm en cubetas de cuarzo de un 1 cm de camino óptico utilizando un espectrofotómetro (Hewlett Packard 8453, Hanover, Alemania).

Se graficaron Las absorbancias correspondientes a las diluciones de cada alimento en función de la concentración. La pendiente de la recta obtenida define el coeficiente de absortividad del alimento.

3.9. Equipo de irradiación UV-C

El equipo de tratamiento de sistemas líquidos por luz ultravioleta especialmente construido en el laboratorio para este fin se muestra en el esquema de la Figura 3.3. El mismo constó de una lámpara (Figuras 3.3 y 3.4) de luz en el rango germicida (254 nm, UV, Lux 50W/G50 TO , Phillips) de baja presión de mercurio colocada dentro de una

camisa vidriada con entrada y salida del sistema a tratar y sellada en sus extremos a la lámpara UV mediante el uso o-rings y resina de contacto. La entrada y salida de la camisa vidriada descargaban mediante mangueras flexibles autoclavables (Cole-Parmer, Masterflex, L/S 24, Illinois, USA) en un vaso de doble camisa de 800 mL de capacidad, conectado a un baño termostático (HAAKE, Mess-Technik, Karlsruhe, Alemania).

El espacio anular libre entre la lámpara UV y la camisa se constituyó como "reactor" (cámara de irradiación). La longitud del reactor era 0,87m con un diámetro interno (pared de la lámpara) de 0,024 m, mientras que el diámetro externo (camisa de vidrio) era 0,031 m. El volumen del reactor UV-C se calculó según:

$$V = \pi * r^2 * L \quad (3.1)$$

donde r = radio del espacio anular en el reactor (Figura 3.3) ; L= longitud del reactor ; $\pi = 3,1416$. Debido a posibles imperfecciones en el diseño del reactor, este parámetro se verificó experimentalmente midiendo el volumen de líquido en la lámpara descargado en probeta calibrada.

3.10. Tratamiento de irradiación con Luz UV-C

Antes de la realización de cada experiencia, la lámpara UV-C del reactor se encendió durante 15 minutos con el propósito de esterilizar el mismo. Para la sanitización del area de trabajo se siguieron los protocolos convencionales de higienización de la cabina en donde se encontraba el equipo así como también de la zona circundante a la zona de toma de muestra. Posteriormente, 500 mL de medio a irradiar (jugo ó sistema modelo) se colocaron en el recipiente estéril de doble camisa, poniendo en funcionamiento la bomba peristáltica que alimentaba al reactor utilizando mangueras

Figura 3.3 Esquema del equipo utilizado: Detalle del reactor

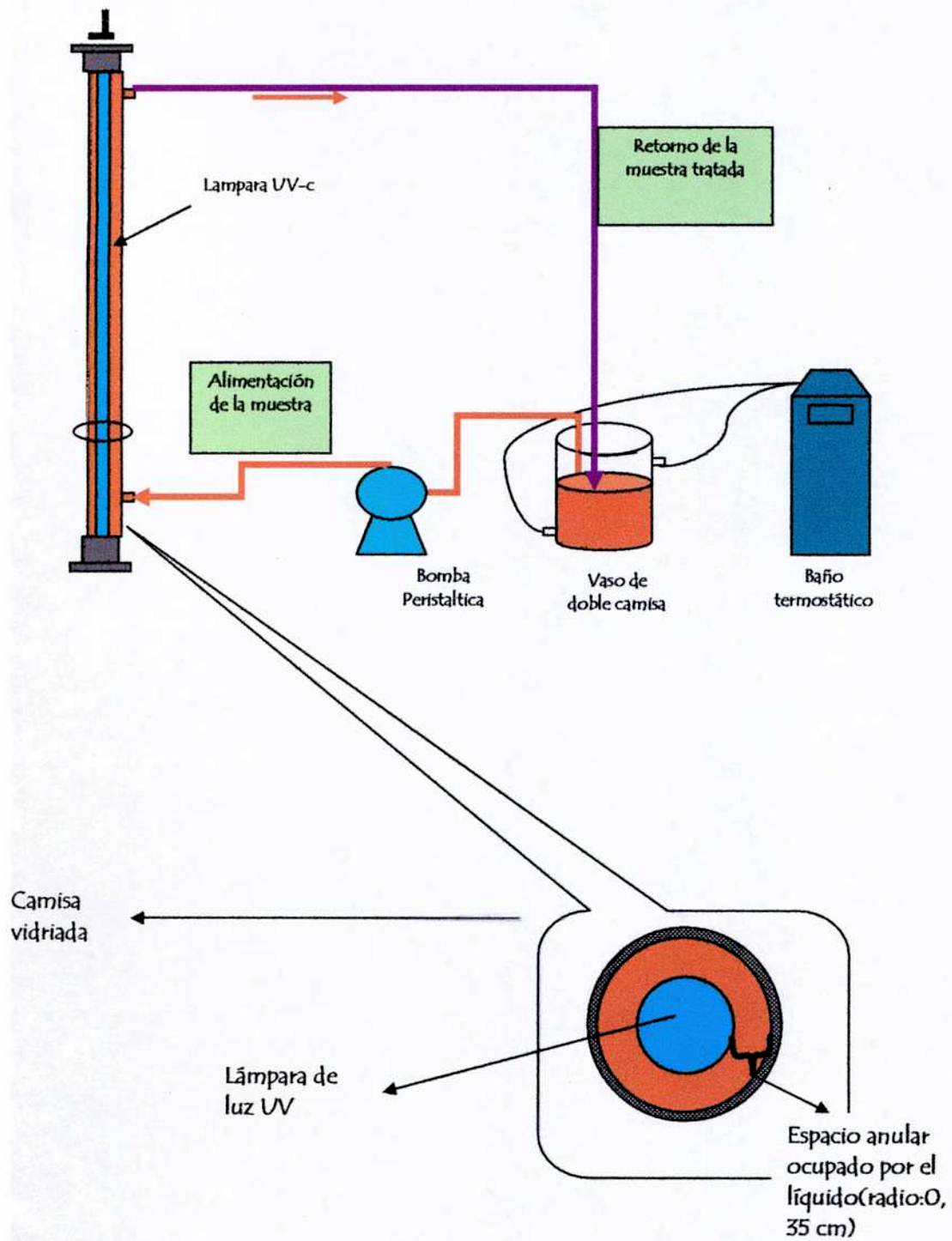
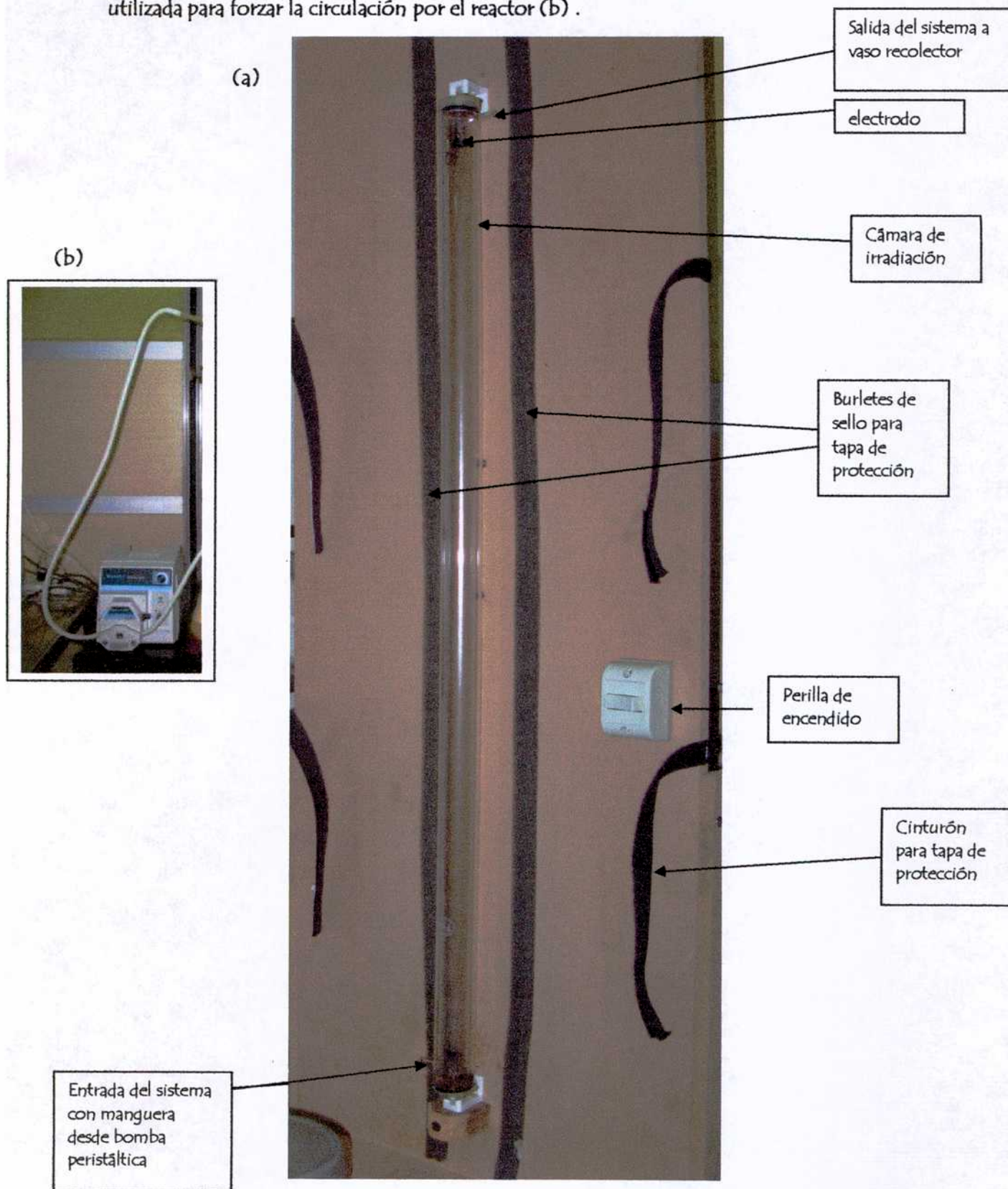


Figura 3.4. Detalle del reactor con lámpara UV-C en camisa (a) y de la bomba peristáltica utilizada para forzar la circulación por el reactor (b) .



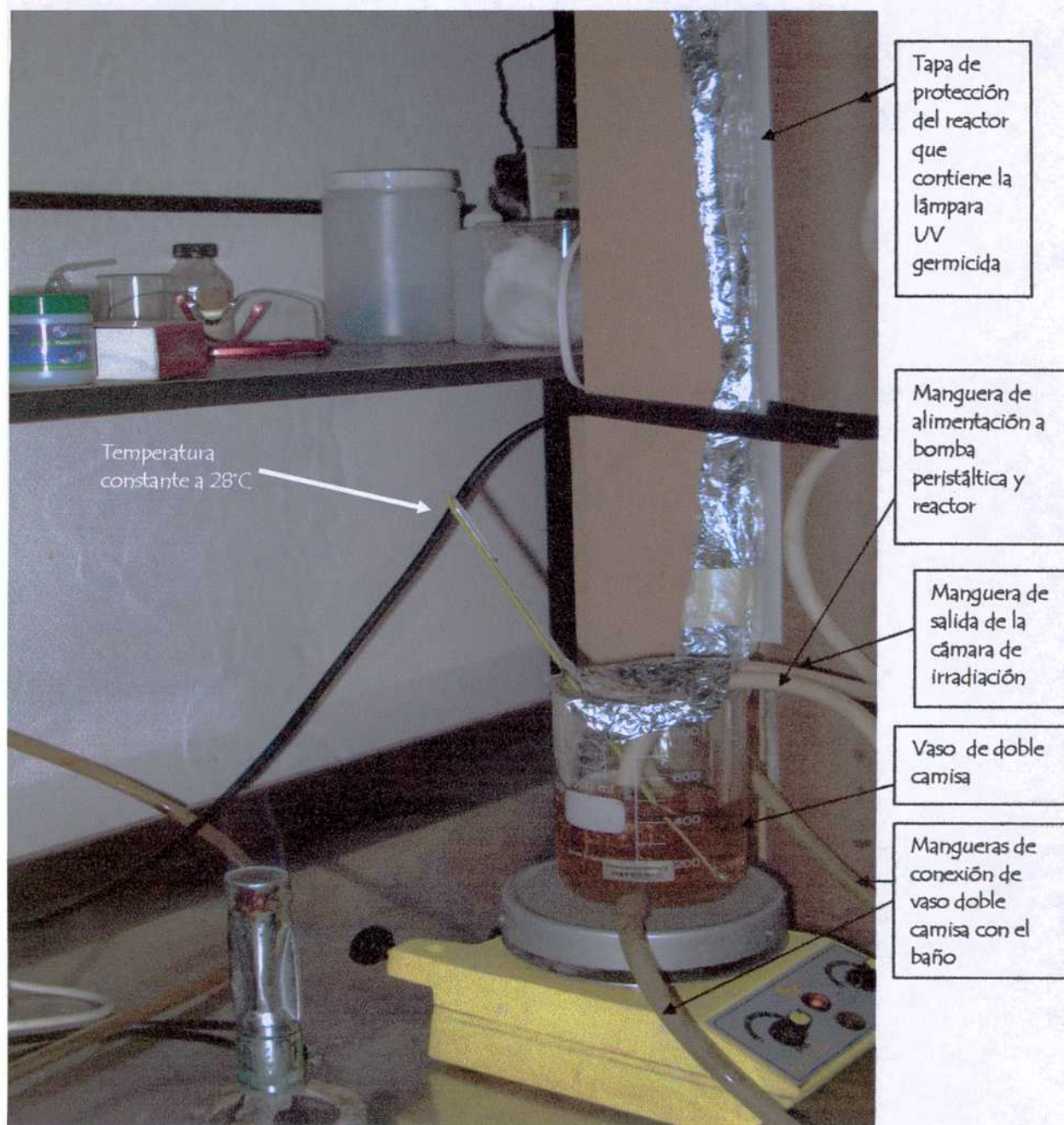
estériles especiales (Cole-Parmer, Masterflex, L/S 24, Illinois , USA) estableciéndose un flujo de 1 L/min (ver Figura 3.5). Para medir la velocidad de flujo se alimentó el reactor con agua estéril y se midió el tiempo necesario para llenar una probeta de 100 mL. La medición se realizó por quintuplicado. El flujo y la temperatura de operación se seleccionaron según lo descrito en el apartado 4.2 referido a la optimización del equipo. El vaso de doble camisa estaba conectado a un baño termostático (HAAKE, modelo Mess-Technik, Karlsruhe, Alemania) con el propósito de mantener una temperatura constante en el interior del vaso de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Los sistemas estuvieron siempre agitados desde el comienzo de cada experiencia, mediante la utilización de un agitador magnético (Decalab SRL, Argentina).

Una vez estabilizado el flujo, se encendió la lámpara durante 5 minutos, luego se incorporaron 5 mL de inóculo microbiano simple o en cóctel tomándose muestras de sistema a intervalos de tiempo regulares durante un tiempo total de 15 minutos. Todas las alícuotas se mantuvieron en agua con hielo hasta su posterior recuento. Las experiencias se evaluaron por triplicado para cada condición ensayada.

3.11. Enumeración de microorganismos sobrevivientes

Se realizaron los recuentos microbianos mediante las técnicas de dilución seriada con siembra en superficie (por duplicado). Se utilizaron placas conteniendo agar ATS-E o Sabouraud según se utilizaran bacterias o levaduras, respectivamente. A tiempos de tratamiento prolongados ($t > 10$ minutos) se utilizó la técnica de siembra en profundidad tomando 1 ó 2 mL de sistema debido a la baja concentración de microorganismos viables en los últimos minutos del experimento. Se contaron las placas que tenían entre 30-300 colonias tras incubación a 27°C (levaduras) o 37°C (bacterias) durante 3 días. En el estudio de almacenamiento de flora nativa las muestras se sembraron en agar APC a 37°C por 72 horas y en Agar YGC a 27°C por 5 días.

Figura 3.5- Equipamiento utilizado para los ensayos de irradiación



El recuento de colonias se realizó con un contador automático (COMECTA S.A., Barcelona, España).

3.12. Representación gráfica de las curvas de supervivencia

Las curvas de supervivencia se generaron a partir de la información experimental para cada condición ensayada, por medio de la representación gráfica del logaritmo de la razón entre el número de microorganismos sobrevivientes, N y el número inicial de microorganismos, N_0 ($\text{Log}(N/N_0)$) en función del tiempo de tratamiento (t).

3.13. Modelado matemático

Se realizó el modelado matemático de las curvas de inactivación de los diferentes microorganismos utilizando el modelo primario de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull (ver apartado 1.7.1). Se calcularon los parámetros b y n característicos y a partir de los mismos se obtuvieron las correspondientes distribuciones de frecuencias de resistencias y sus estadísticos asociados (media; moda; varianza y sesgo).

La validación interna del modelo se realizó mediante análisis de varianza para regresión no lineal y se aplicaron los siguientes tests:

- Test F para la regresión completa
- Cálculo del coeficiente de determinación corregido por grados de libertad del sistema (R^2_{aj}).
- Análisis de residuales por métodos gráficos

Todos los parámetros y tests analizados se describen en el Apéndice de Procedimientos Estadísticos. El modelado se realizó utilizando el paquete estadístico Statgraphics Plus for Windows 3.0® (Statistical Graphics Corp., USA).

3.14. Estudios de almacenamiento

Se siguió la evolución de la carga microbiana de las muestras de jugo comercial que fueron inoculadas con los microorganismos *Escherichia coli* ATCC 35218, *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 y un cóctel de levaduras compuesto por *Saccharomyces cerevisiae* KE 162, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Picchia anomala* NRRL 3668, *Zygosaccharomyces bailii* NRRI 7256 y *Zygosaccharomyces rouxii* ATCC 52519) e irradiadas con luz UV-C durante 15 minutos. Para ello, una vez finalizado el tratamiento con luz UV, frascos color caramelo, estériles, de 20mL de capacidad, se llenaron asepticamente con el jugo inoculado y tratado y se rotularon y almacenaron en refrigeración (4°C) durante 7-10 días. A cada tiempo de muestreo durante el período de almacenamiento se realizó el recuento de microorganismos (por duplicado de sistema y por duplicado de muestra) para el jugo inoculado e irradiado. Los resultados se expresaron como Log (N) en función del tiempo.

3.15 Evolución de la flora nativa de los jugos irradiados con luz UV-C

Se estudió la flora nativa durante el almacenamiento refrigerado del jugo de manzana. Para ello se obtuvo el jugo según la metodología detallada en el apartado 3.7 con la variante de que el procedimiento no se realizó en ambiente estéril y que las manzanas y los utensilios utilizados no fueron sanitizados previamente con agua clorada.

El estudio tuvo dos variables: por un lado se almacenó jugo fresco exprimido sin ningún tratamiento previo; por otro lado jugo obtenido con la misma metodología se trató durante 15 minutos con luz UV-C y en continuación se procedió en su almacenamiento.

Los jugos se almacenaron en frascos de 20 mL a 4°C. A intervalos de tiempo regulares (24-72 hs) se tomaron dos frascos de cada condición y se realizaron los siguientes recuentos:

- Microorganismos aerobios: plaqueo en Agar APC e incubación a 37°C por 72 hs.
 - Hongos y levaduras: plaqueo en Agar YGC e incubación a 25°C por 5 días.
- Se graficaron las correspondientes curvas de supervivencia.

3.16. Determinación de la dosis de radiación UV-C

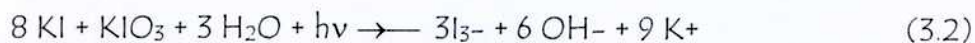
Es posible utilizar la actinometría para estimar la cantidad energía disponible en una exposición del alimento a radiación UV-C. La actinometría es la cuantificación de la energía de la luz UV a través de la generación de reacciones fotoquímicas a partir de diversos actinómetros químicos.

Para determinar la intensidad de la radiación emitida, se utilizó el par actinométrico yoduro-iodato (Rhan, 1999) pero dicho procedimiento debió ser optimizado para tratamiento de muestras en flujo continuo dado que originalmente está diseñado para sistemas estancos. A continuación se describe el procedimiento realizado.

La determinación se realizó utilizando una solución preparada con buffer borato 0,01M (pH 9,25) a la que se le agregó iodato de potasio 0,1 M y yoduro de potasio 0,6 M. Las diferentes dosis UV-C aplicadas se obtuvieron por variación del tiempo de exposición de la muestra. Para cada tiempo se cargó el equipo descrito en apartado 3.9 con la solución ($\cong$ 220 mL) utilizando una bomba peristáltica (Cole-Parmer, Masterflex modelo 7518-12, Illinois, USA), se mantuvo expuesto a la radiación UV-C por el tiempo estipulado (0, 1, 2, 4 y 5 min) y finalmente se descargó y se tomó una muestra (20 mL) del líquido irradiado, previamente se descartaron los primeros 100 mL de solución (punto medio de la lámpara).

La absorbancia de las muestras se midió en un espectrofotómetro (Hewlett Packard 8453, Hanover, Alemania) a 352 nm. Dicha cuantificación se llevó a cabo mediante las siguientes expresiones:

Actinómetro Ioduro-Iodato :



Lambert-Beer:

$$\text{Abs}_{352} = \epsilon \cdot b \cdot C \quad (3.3)$$

$$\text{Moles I}_3 = \frac{\text{Abs}_{352} \times V(l)}{\epsilon \cdot b} \quad \text{con} \quad \begin{array}{l} \epsilon: 26.400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \\ b: 1 \text{ cm} \end{array}$$

$$\text{N}^\circ \text{ Einstein (fotones absorbidos)} = \frac{\text{Mol I}_3}{\text{QY}} \quad (3.4)$$

siendo

$$\text{QY} = \text{umbral quantum} = 0,75 [1 + 0,02(T - 20,7)(1 + 0,23(C - 0,577))] \quad (3.5)$$

con T = temperatura ($^\circ\text{C}$) y C = concentración de yoduro

Entonces,

$E (J) = 4.72 \times 10^5 (J/\text{einstein}) \cdot \text{N}^\circ \text{ einstein}$

(3.6)

A partir de las absorbancias obtenidas a 352 nm a los distintos tiempos de tratamiento, se utilizó el principio de Lambert-Beer (3.3) para calcular los moles de triyoduro formados (I_3^-). Obtenido este dato, se calcularon los números de fotones absorbidos o número Einstein (3.4) y el valor del umbral quantum (3.5) para la concentración de yoduro y la temperatura de la experiencia. La concentración de yoduro se calcula midiendo su absorbancia a 300nm, utilizando la ecuación de Lambert-Beer (3.3) y el correspondiente coeficiente de absortividad ($\epsilon = 1,061 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). A partir de la ecuación 3.6 se calculó la energía recibida por la muestra expuesta a la irradiación UV-C a cada tiempo de tratamiento. Se graficaron los distintos valores de energía en función de los correspondientes tiempos de exposición. Al multiplicar la pendiente de la curva obtenida (J/min) con el tiempo de exposición (min), el valor que obtenemos tiene

unidades de energía. Dicha energía corresponde a la emitida a partir del área característica a la cual se expuso la muestra. La misma se expresó por unidad de área (J/m^2).

A partir de los datos obtenidos se establece como tiempo final, el último tiempo para el cual la relación energía-tiempo presenta un comportamiento lineal. A continuación, a partir de los datos de la ecuación que caracteriza la curva obtenida se extrapolan los resultados para el tiempo de interés (tiempo de tratamiento). El tiempo en el cual su relación con la energía deja de ser lineal depende de la potencia de la lámpara y el área de exposición del reactor (Rhan, 1997).

Los resultados de las mediciones actinométricas se verificaron utilizando un radiómetro (Melles Griot, modelo 13 PEM 001, Colorado USA). Para realizar la medición se tuvo que quitar la tapa protectora de la lámpara de UV-C tomando medidas adicionales de seguridad para la protección del operador. Se encendió la lámpara durante 15 minutos con fin de que alcance la máxima potencia. Posteriormente, la misma se apagó y se colocó el sensor en contacto con ella, y la misma se encendió nuevamente. En la pantalla del radiómetro se leyó el valor de la potencia (mWatt). Al mantenerse constante el valor de potencia expuesto por el radiómetro se finalizó la medición. El sensor del radiómetro se ajustó a mínima distancia de la lámpara del equipo, intentando de este modo que la medición sea representativa de la potencia que recibe la muestra al circular por el tubo de irradiación.



4-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización físico-química de los jugos utilizados

4.1.1. Determinación de pH y sólidos solubles

El pH de los jugos de manzana comerciales utilizados (TROPICANA) fue de 3,0 - 3,2. Dado que hubo solamente pequeñas variaciones este tipo de jugo no se procedió en ajuste del pH.

En el jugo de manzana integral-exprimido el pH osciló entre 3,4-3,7 y se ajustó a pH 3,0 +/- 0,2 según lo descrito en el apartado 3.6.

La concentración de sólidos solubles (° Brix) para el jugo comercial fue 11-12,3 mientras que para el jugo integral fresco fue de 13,1-13,6. En ningún caso se procedió a ajuste de sólidos solubles.

4.1.2. Determinación del coeficiente de absortividad de los jugos utilizados

Uno de los parámetros que influye en la efectividad del procesamiento con luz UV-C es el coeficiente de absortividad del sistema irradiado. Así, por ejemplo, Oteiza (2007) determinó que los coeficientes de absortividad de jugos de manzana, naranja y multifruta mantuvieron una relación lineal con los tiempos de reducción decimal, D, obtenidos para distintas cepas de *E.coli* tras su exposición a luz UV-C. En este estudio se determinó el coeficiente de absortividad del jugo exprimido integral (JMI) y el jugo comercial clarificado (JMC). Una descripción más detallada de las diferencias de los dos tipos de jugo de manzana y su elaboración se encuentra en los apartados 1.3.1 y 3.6. Se determinaron las absorbancias a 254nm de distintas diluciones de ambos jugos tal como se describe en el apartado 3.8.2. (Figura 4.1).

Los coeficientes de absortividad obtenidos a partir de la pendiente correspondiente a la estimación lineal entre la concentración del jugo y su correspondiente absorbancia se presentan en la Tabla 4.1 junto a otros valores obtenidos de bibliografía para jugo y sidra de manzana.

Figura 4.1

Curva de absorbancia en función de la concentración para jugo de manzana exprimido-integral (JMI) y jugo de manzana comercial clarificado (JMC)

- a. Jugo exprimido integral (●)
- b. Jugo comercial clarificado (■)

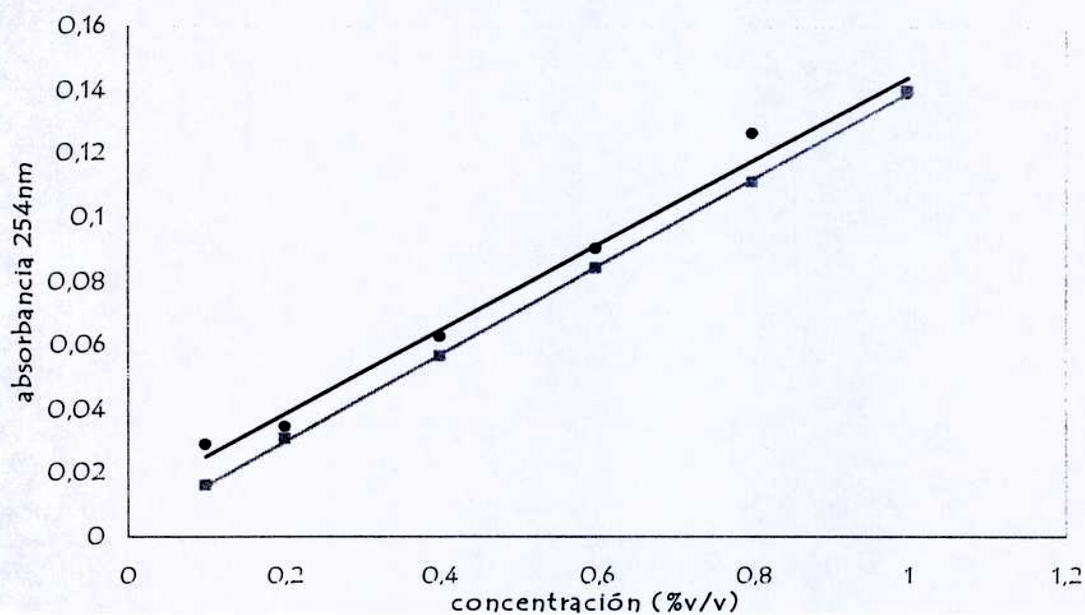


Tabla 4.1. Coeficientes de absorptividad obtenidos para jugo ó sidra de manzana de diversas fuentes. En este estudio, JMC = jugo de manzana comercial clarificado, JMI= jugo de manzana exprimido integral.

Jugo/sidra	Absortividad (cm ⁻¹)	Fuente
JMC	0,132	<i>este trabajo</i>
JMI	0,137	<i>este trabajo</i>
Sidra de manzana "Yakima"	0,210	
Sidra de manzana, fresca, Placeville, CA	0,258	
Sidra de manzana "Zeiger's"	0,570	
Sidra de manzana "Tastee"	0,980	<i>Koutchma y col., 2004</i>
Sidra de manzana de Geneva, NY Newcomerstown, OH	0,093	
Jugo de manzana clarificado	0,090	
Jugo de manzana "GMS"	0,198	
Jugo de manzana, "Baggio"	0,071	<i>Oteiza, 2007</i>

No se observaron diferencias de significación entre los coeficientes de absortividad calculados para ambos jugos si bien ambos tenían un aspecto bien diferenciado. Los valores obtenidos se encuentran dentro del rango reportado por Koutchma y col. (2004) para una gran variedad de sidras y jugos de manzana con valores de coeficientes de absortividad en el rango de 0,090 y 0,198 cm^{-1} para distintos jugos de manzana mientras que para sidra de manzana (de características similares al jugo exprimido integral) informó valores que variaron entre 0,093–0,970 cm^{-1} .

4.2. Optimización del equipo de irradiación UV-C

El equipo de irradiación con luz UV-C para tratamiento de sistemas líquidos se construyó especialmente para la realización de este estudio tal como se describe en el apartado 3.9. Con vistas a que el proceso de irradiación con luz UV-C sea un proceso frío se eligió una temperatura de operación inferior a 30°C. Por lo tanto se utilizó el vaso doble camisa conectado con el baño termostático (ver apartado 3.9). La temperatura del baño se fijó a los 25°C mientras que la temperatura del sistema al salir y al entrar en la cámara de irradiación se mantuvo constante de 28°C $\pm$ 1°C. La medición se realizó en el recipiente de recirculación (es decir el vaso de doble camisa termostatzado) mediante un termómetro de mercurio externo, medida que concordó con lo expuesto en la pantalla del baño termostático.

La velocidad de alimentación de la bomba fue regulada por un controlador de velocidades manual correspondiendo a una posición intermedia entre los puntos medio y máximo del regulador. Este flujo fue el máximo conseguido por la bomba para el cual el sistema de mangueras se mantenía estable y no se producía salpicación durante el procesamiento. Dado que con la bomba peristáltica disponible no se podía conseguir flujo turbulento en única pasada se optó por trabajar con un caudal de 1 L/minuto.

Se calculó el número de Reynolds correspondiente para el jugo de manzana según:

$$Re = \frac{\rho v D}{\mu} \quad (4.1)$$

a partir de las propiedades físicas del jugo de manzana (12,5 °Brix; 28°C): ρ = densidad (1046 Kg/m³) y μ =viscosidad (1,39 mPa.s) (Alvarado,1993) y de las variables de proceso, velocidad media del flujo (v) y diámetro $D = 0,007$ m. La velocidad media del flujo ($v=0,055$ m/s) se calculó según la siguiente ecuación:

$$v = F_v/A \quad (4.2)$$

Donde F_v el caudal de alimentación ($F_v = 1$ L/min) y A , el área anular del reactor (m²) calculado a partir de la ecuación (4.3):

$$A = \pi/4 \cdot D_{ex}^2 - \pi/4 \cdot D_{int}^2 \quad (4.3)$$

igual a 0,000302225 m². Dicho valor de Reynolds correspondió a 290 para el jugo de manzana mientras que para el sistema modelo calculado a partir de las propiedades físicas del agua (densidad a 28°C; $\rho=998$ kg/m³ y viscosidad $\mu=1$ mPa.s) e idénticas variables de proceso fue 385. En ambos casos el flujo con el que se trabajó correspondió a flujo laminar.

Dado que el volumen del reactor calculado según la ecuación 3.1 ($V= 0,26$ L) fue algo mayor que el volumen real calculado, se asumió para los cálculos el valor de volumen medido teniendo en cuenta posibles imperfecciones que pudiera tener la camisa vidriada en cuanto a su diámetro interno. Siendo el volumen real medido del reactor UV-C de 0,22 L (ver apartado 3.9) y el caudal de alimentación (F_v) de 1 L/minuto, el tiempo de residencia (τ) dentro de la cámara de irradiación del jugo correspondió a:

$$\tau = \frac{V_R}{F_v} = 0,22 \text{ min} = 13,2 \text{ s} \quad (4.4)$$

siendo V_R = volumen del reactor

Una velocidad de flujo elevada correspondiente a un régimen turbulento ($Re > 2100$) ayuda a la optimización del proceso dado que aumenta la posibilidad de que todos los elementos de volumen sean expuestos a la radiación UV-C. Sin embargo, también disminuye el tiempo de residencia de dichos elementos de volumen. Dado que, según el

diseño de este equipo se operaba con un modelo de recirculación y no de única pasada, los elementos de volumen eran expuestos reiteradas veces a la irradiación UV-C, hecho que permitió la utilización de una velocidad de flujo correspondiente a flujo laminar y no flujo turbulento tal como fue establecido para equipos de única pasada (FDA, 2000).

4.3. Determinación de la dosis de radiación UV-C

Con el propósito de determinar la intensidad de la radiación emitida, se utilizó el par actinométrico yoduro-yodato (Rhan, 1999) siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.16. El actinómetro yoduro-yodato resultó efectivo y reproducible para la determinación de las dosis de luz UV-C aplicadas durante el tratamiento. Las dosis de irradiación UV-C aplicadas variaron según los diferentes tiempos de exposición. Las absorbancias obtenidas junto con los correspondientes valores de concentración de triyoduro (I_3^-) y de energía calculados según las ecuaciones 3.3 a 3.6 se presentan en la Tabla 4.2a.

A partir de 4 minutos de irradiación la relación energía- tiempo dejó de ser lineal y no fue posible utilizar posteriores valores de absorbancia debido a que el sistema estaba saturado y sin posibilidad de generar más moles de triyoduro. En la Figura 4.2.a. se muestra la curva obtenida para los distintos tiempos de irradiación con luz UV-C en el rango 0-4 minutos y la ecuación que caracteriza la relación energía-tiempo para la zona lineal (0-4 minutos) a partir de la cual se calculó la energía correspondiente a los distintos tiempos de tratamiento. Para un tratamiento completo de 15 minutos, el valor de E (kJ) fue:

$$E (kJ) = 0,0609 (kJ/min) \cdot t (min) + 0,038 \quad (4.5)$$

$$\rightarrow E (kJ) = 0,9515 kJ$$

Este valor de energía se dividió por el área de exposición ($0,06556 m^2$) (área expuesta del tubo de mercurio del reactor) calculada según:

$$A = P_{int} \cdot L \quad (4.6)$$

$$P_{int} = 2 * 3,14 * D_{int}/2 \quad (4.7)$$

siendo L= longitud del tubo (0,87m) y P_{int} = perímetro interno (0,07536 m)

Finalmente la energía para los 15 minutos

$$E (15 \text{ min}) = 0,9515 \text{ kJ} / 0,06556 \text{ m}^2 = 14,5 \text{ kJ/ m}^2 \quad (4.8)$$

Con el propósito de verificar los resultados obtenidos mediante actinometría, se realizó también determinación de la dosis de UV-C empleando un radiómetro tal como se describe en el apartado 3.16. A partir de la medición con el radiómetro se obtuvo la potencia de lámpara igual a 0,00122 J/s. Dicho valor se dividió por el área del sensor del radiómetro:

$$\frac{0,00122 \text{ J/s}}{0,00007854 \text{ m}^2} = 15,53 \text{ J/sm}^2 \quad (4.9)$$

El valor obtenido a partir de la ecuación 4.9 se multiplicó por el tiempo del tratamiento del estudio (15 min= 900 s) determinado así el correspondiente valor de la dosis:

$$15,53 \text{ J/sm}^2 * 900\text{s} = 13,98 \text{ kJ/m}^2 \quad (4.10)$$

El valor de dosis de 13,98 kJ/m² obtenido mediante la medición con el radiómetro fue muy cercano al valor que se obtuvo con el sistema actinométrico yoduro-yodato (14,5 kJ/m²) . Por lo tanto se asumió para el resto de este estudio un valor de dosis total de 14 kJ/m² correspondiente a 15 minutos de exposición a la luz UV-C. En la Tabla 4.2.b se presentan los valores de la dosis correspondientes a los distintos tiempos de exposición a la luz UV-C estimados por actinometría y por radiómetro.

Tabla 4.2.a Absorbancia y energía calculada según ecuaciones 3.3 a 3.6 para el par actinométrico Ioduro/Iodato sometido a irradiación con luz UV-C durante distintos tiempos entre 0 y 4 minutos. Valores de energía calculada según ecuación 4.5 por extrapolación de la zona lineal para tiempos mayores a 4 minutos.

Tiempo (min)	Abs (352 nm)	Dilución	Energía calculada ecuación 3.6 (kJ)	Conc I ₃ ⁻ ecuación 3.3 (M)	Energía calculada ecuación 4.5 (kJ)
1	1,8816	1/10	0,1005	0,0001568	0,0989
2	0,2611	1/100	0,1394	0,0002176	0,1598
4	0,522	1/100	0,2787	0,0004350	0,2816
5	*	-	-	*	0,3425
10	*	-	-	*	0,647
15	*	-	-	*	0,9515

*valores no determinados experimentalmente

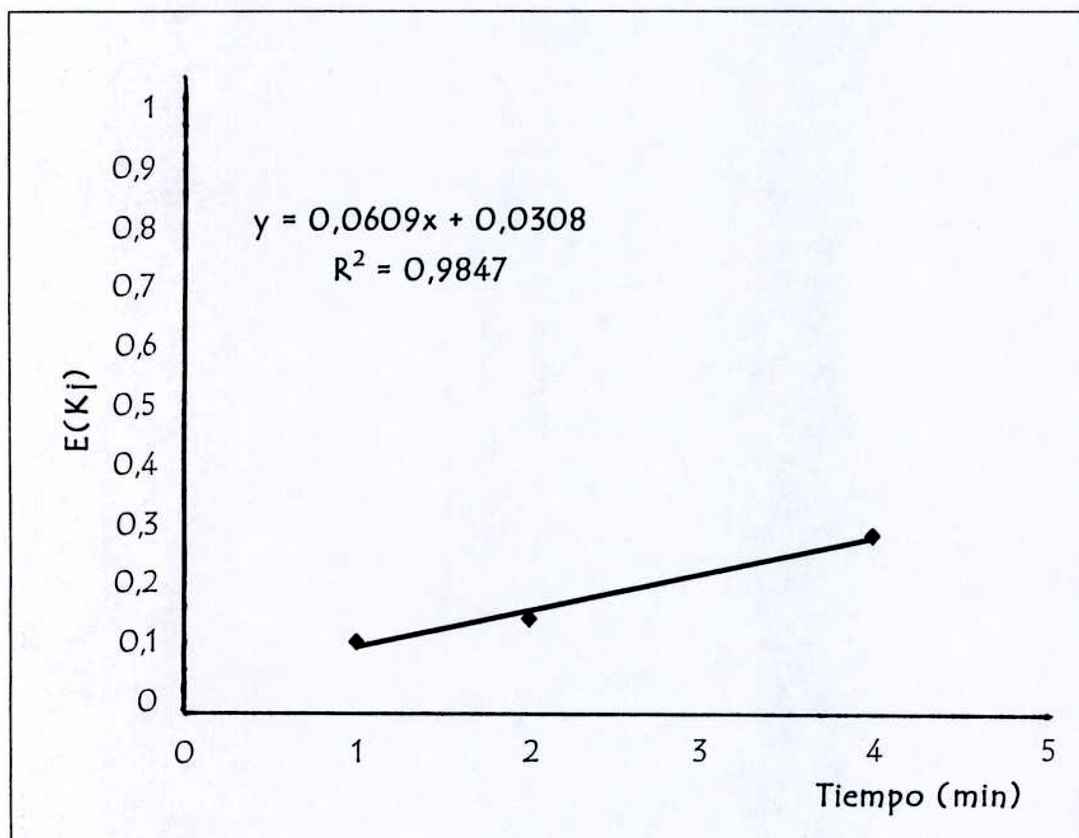
Tabla 4.2.b Valores de dosis correspondientes a los distintos tiempos de exposición a la luz UV-C

Tiempo (min)	Dosis(kJ/m ²) ^a	Dosis (kJ/m ²) ^b
1	0,93	1,51
2	1,86	2,44
3	2,80	3,26
4	3,73	4,29
5	4,66	5,22
10	9,32	9,86
15	13,98	14,51

^a estimada por radiómetro (ecuación 4.10)

^b estimada por actinometría (ecuaciones 3.3 a 3.6)

Figura 4.2 Ecuación lineal que relaciona Dosis /tiempo de exposición a partir de los datos experimentales de absorbancia y mediante la aplicación de las ecuaciones 3.3. a 3.6.



4.4-Estudios de reto microbiano

Con el propósito de estudiar la inactivación de microorganismos expuestos a la irradiación con luz UV-C, se realizaron ensayos inoculando diferentes microorganismos de relevancia en sistema modelo y en sistemas reales (jugos de manzana). Se emplearon inóculos individuales (*E. coli*, *S. cerevisiae* ó *L. innocua*) y cócteles (mezclas de diferentes cepas de *E.coli* ó de levaduras) (ver apartados 3.5.1 y 3.5.2).

4.4.1- Sistema modelo

4.4.1.1.- Curvas de inactivación

La Figura 4.3.a muestra la respuesta de *E. coli*, *S. cerevisiae* y *L. innocua* en sistema modelo (agua peptona 0,1 %, pH=7) sometido a irradiación con luz UV-C durante 15 minutos, tiempo correspondiente a una dosis igual a 14 kJ/m² según lo descrito en apartado 4.3.

No se observaron diferencias significativas en el patrón de inactivación de los distintos microorganismos inoculados. El daño a las células microbianas comenzó desde los primeros minutos de irradiación. En todos los casos, las curvas de inactivación en el sistema modelo exhibieron una caída abrupta de aproximadamente 3 ciclos logarítmicos en los primeros minutos de tratamiento con luz UV-C (~2,5 minutos), luego una región de desaceleración con menor pendiente y finalmente una etapa con baja velocidad de inactivación a partir de 7,5 minutos de tratamiento (Figura 4.3a). En el caso de la curva de inactivación de *E.coli* se observó además, un leve hombro inicial.

Este patrón de inactivación microbiana en sistemas modelo por irradiación con luz UV-C en flujo continuo que determina curvas con concavidad hacia arriba; presencia de hombro en algunos casos y con cola definida ya fue comentado por otros investigadores (Hoyer, 1998; FDA, 2000; Koutchma y col.,2004).

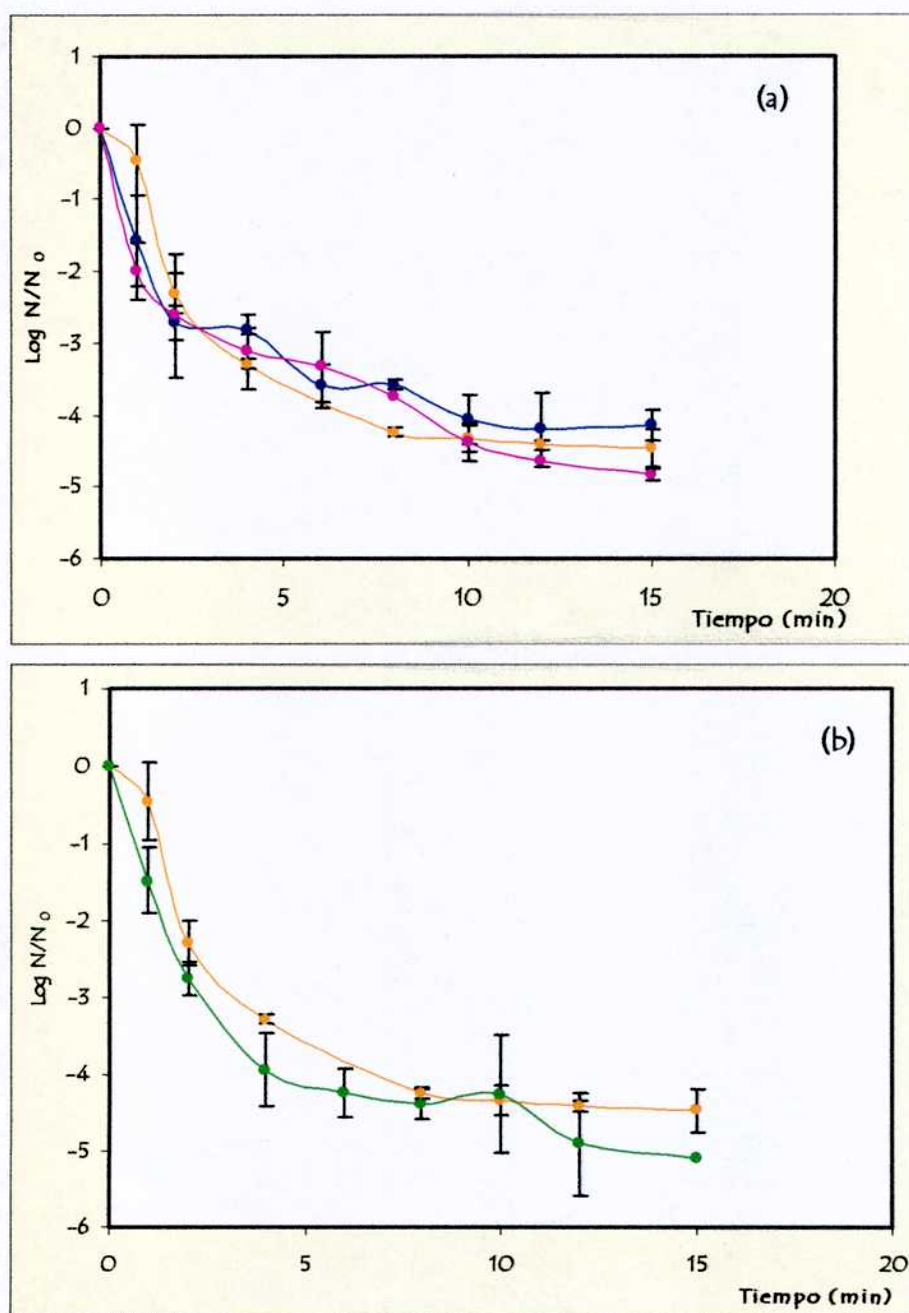
Lopez-Malo y col. (2005) reportaron curvas de inactivación con similar concavidad hacia arriba para *L.monocytogenes* en buffer fosfato (pH 3,5) a 35°C utilizando un equipo de tratamiento con luz UV-C de idénticas características al utilizado en este estudio operando con un caudal de 0,36 L/min. Ellos observaron una curva de inactivación con una caída más gradual pero alcanzando un valor similar de reducciones logarítmicas al observado en este estudio. La ausencia de una caída marcada en los primeros minutos pudiera deberse a que estos autores operaron con un caudal menor (Re ~ 139).

La posible presencia de un hombro (tiempo lag) en las curvas de inactivación por irradiación con luz UV-C ha sido atribuido al requerimiento de superar una dosis determinada de radiación UV-C para producir la muerte del microorganismo, mientras que la no linealidad de las curvas puede deberse al establecimiento de un flujo laminar, el cual determina un perfil parabólico de velocidades, resultando en una máxima velocidad de flujo en el centro del líquido. Dicha velocidad corresponde, en general, al doble del valor de la velocidad promedio de los elementos de volumen (Koutchma y col., 2004). Esta falta de mezclado produciría un efecto sombra a la luz UV-C de determinados elementos de volumen y por lo tanto, condiciones de procesamiento no uniforme, hecho que redundaría en una fracción de la población resistente, fracción responsable de la cola observada (Hoyer, 1998; Koutchma y col., 2004).

La Figura 4.3.b muestra la inactivación de un cóctel de *E. coli* (ver apartado 3.5.2) en comparación con la respuesta de dicho microorganismo en inóculo simple.

Figura 4.3 Curvas de inactivación de los distintos microorganismos inoculados en sistema modelo sometido a irradiación con luz UV-C durante 15min. (dosis máxima 14 kJ/m²) a 28° C

- a. *S. cerevisiae* (●); *E. coli* (○); *L. innocua* (●); desviación estándar (I)
 b. *E. coli* (○); cóctel de *E. coli* (●); desviación estándar (I)



El cóctel de cepas de *E. coli* produjo un patrón similar de la curva de inactivación pero resultó algo más sensible al tratamiento de irradiación que el inóculo simple. Este comportamiento fue observado por Schenk y col.(2008) para un cóctel de *L. monocytogenes* inoculado en rodajas de pera con cáscara irradiadas con luz UV-C durante 20 minutos (dosis máxima 12 kJ/m^2) aunque un comportamiento inverso fue observado en el caso de la inoculación de cócteles de *L. innocua* en rodajas de pera con cáscara y de *L.monocytogenes* ó *L.innocua* en rodajas de pera sin cáscara, los cuales mostraron una resistencia significativamente mayor que los correspondientes inóculos individuales.

4.4.1.2 –Utilización de la microbiología predictiva: Aplicación de un modelo de distribución de frecuencias de resistencias Weibulliano

Dado que las curvas presentaron desviación de la linealidad y con el propósito de explicar con mayor claridad las diferencias observadas en las respuestas microbianas se utilizó el modelo de distribución de frecuencias de resistencias Weibulliano mediante regresión no lineal. Este modelo primario es un modelo flexible, no lineal y apropiado para describir la inactivación de una amplia gama de microorganismos por distintas tecnologías de preservación tradicionales y emergentes tales como : tratamiento térmico (Peleg y Cole,1998; Peleg, 1999), campos eléctricos pulsados (Peleg, 1995), radiación (Anellis y Werkowski, 1968), altas presiones (Heinz y Knorr, 1996), antimicrobianos naturales (Corte y col, 2005; Ferrante y col, 2007) y ultrasonido de alta intensidad (Guerrero y col, 2005; Ferrante y col, 2007).Una descripción más detallada del modelo y sus fundamentos teóricos se halla en el correspondiente apartado 1.4.4.1.

La Figura 4.4 muestra las curvas de inactivación predichas por el modelo, junto a los datos experimentales. La Tabla 4.3 muestra los parámetros b y n característicos del modelo aplicado para cada condición ensayada. El modelo Weibulliano ajustó adecuadamente a los datos experimentales, como lo demuestran los elevados valores de

R^2 ajustado por grados de libertad obtenidos, indicando que el modelo explicó entre el 98,0 y el 99,9 % de la variación observada en la respuesta ($\log N/N_0$) con las condiciones evaluadas. Asimismo, los valores del estadístico Fisher (F) para el modelo resultaron altamente significativos ($\alpha < 0,000001$).

Los valores de n obtenidos sensiblemente menores a la unidad ($0,24 \leq n \leq 0,33$) son descriptivos de curvas de inactivación con una concavidad hacia arriba y cola marcada. Este patrón de curvas de inactivación se ha atribuido al efecto "multiple" del UV; es decir a la posibilidad de que una sola célula microbiana se someta a varios golpes de irradiación o que un golpe único de UV afecte a varias células (Yousef y Marth, 1988). De acuerdo con esta teoría las células menos resistentes se inactivan al principio del tratamiento, dejando a los más individuos más resistentes.

La Figura 4.5 presenta distintos instrumentos gráficos de validación interna del modelo elegido, los cuales permiten verificar la adecuación del mismo.

El análisis de la gráfica de los valores observados en función de los valores predichos por el modelo (Figura 4.5.a) 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 (Figura 4.5.b) se observa, en general, para todos los microorganismos una distribución uniforme horizontal de los residuales en torno de los valores predichos, hecho que indica homocedastidad como se explica detalladamente en el apartado 6.2.3 del Apéndice Estadístico. En ningún caso se observó forma de cono o herradura.

Figura 4.4 Aplicación del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull a las curvas de inactivación de los distintos microorganismos inoculados en sistema modelo sometido a irradiación con luz UV-C durante 15min. (dosis máxima 14 kJ/m²) a 28° C. (—) valores predichos; (●) datos experimentales

- a. *Saccharomyces cerevisiae* (●), *Escherichia coli* (●), *Listeria innocua* (●)
 b. *Escherichia coli* (●), Cóctel de *Escherichia coli* (●)

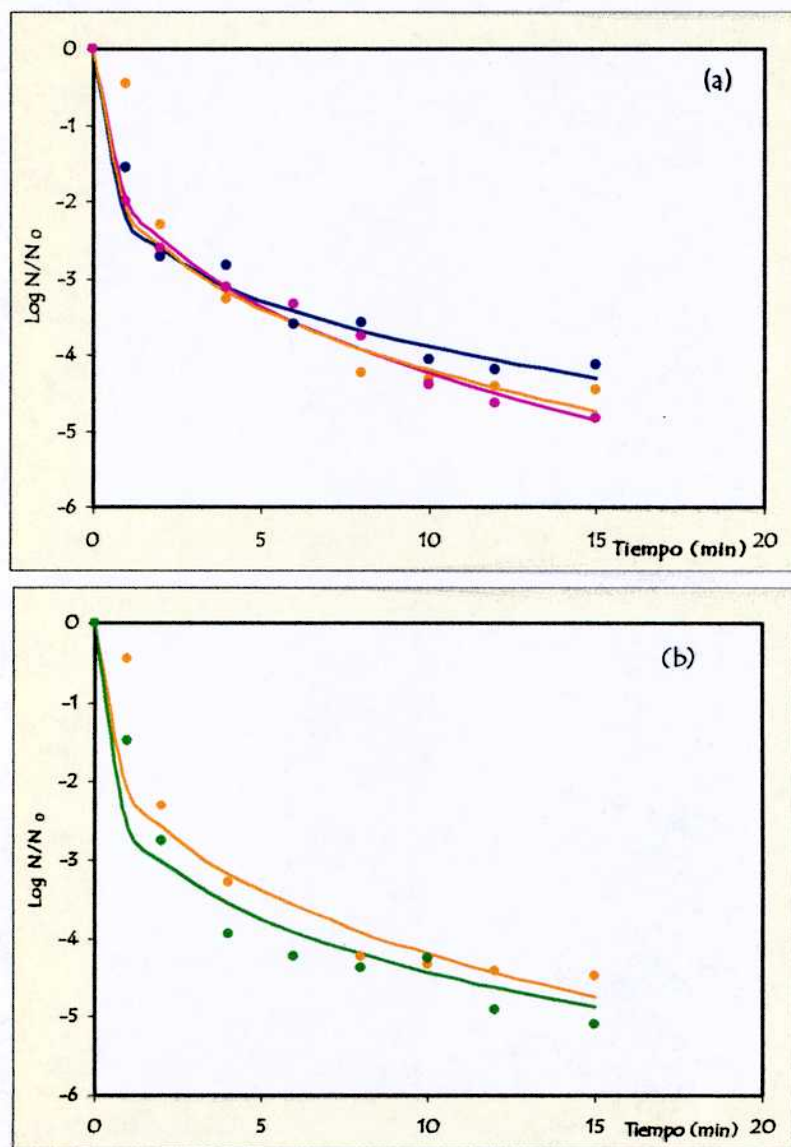


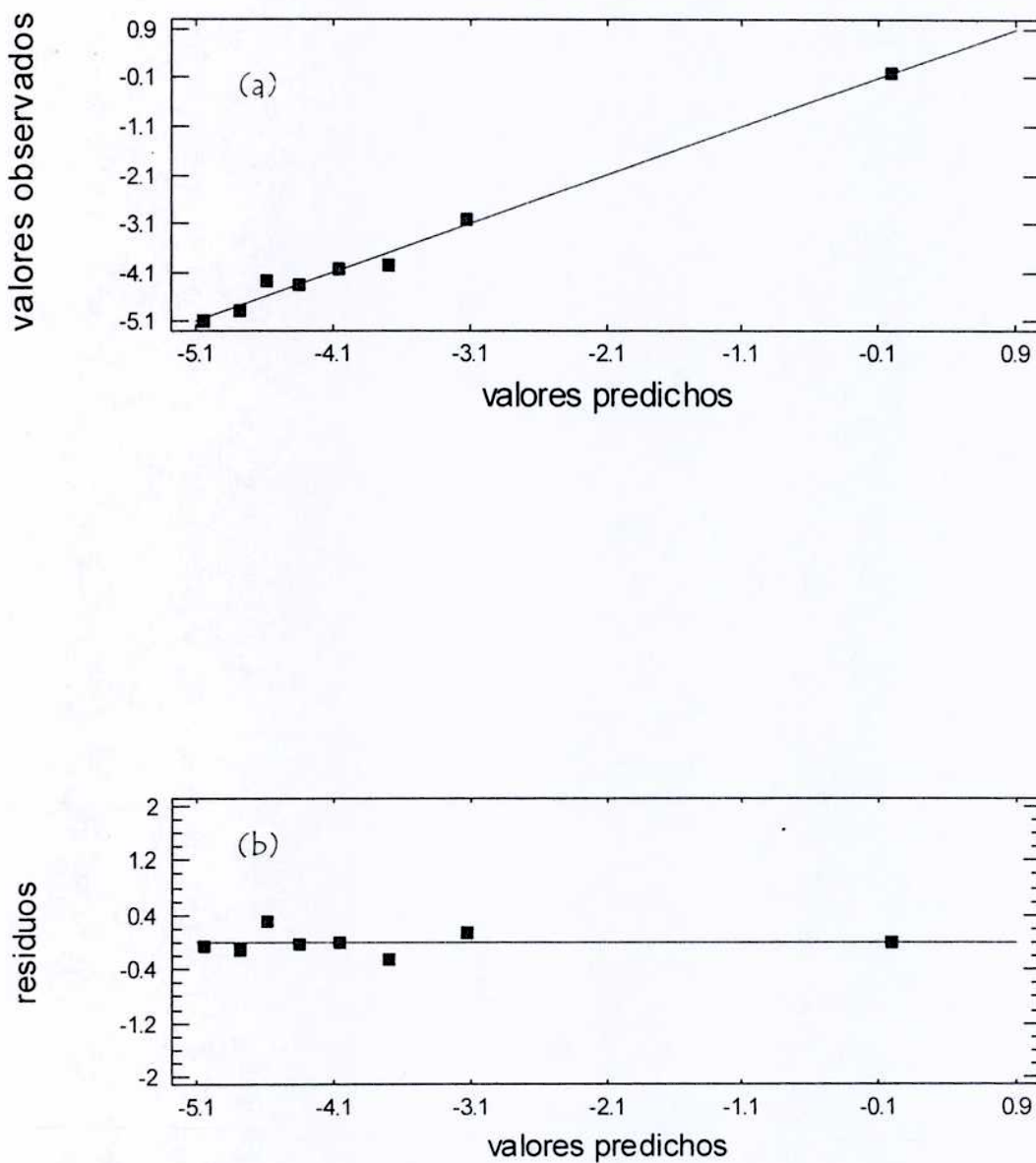
TABLA 4.3 Parámetros correspondientes al modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull, para el comportamiento de los distintos microorganismos inoculados en sistema modelo sometido a irradiación con luz UV-C durante 15min. (dosis máxima 14 kJ/m²) a 28° C.

Tratamiento	b	n	R ² ajustado	F	Nivel de significación (α)
<i>E.coli</i>	2,09	0,30	97,9	716	<0,000001
Cóctel de <i>E.coli</i>	2,66	0,24	98,7	1870	<0,000001
<i>S.cerevisiae</i>	1,97	0,33	99,1	2525	<0,000001
<i>L.innocua</i>	2,21	0,25	99,3	1387	<0,000001

Figura 4.5 Validación interna del modelo propuesto que relaciona el número de reducciones logarítmicas microbianas en sistema modelo sometido a irradiación con luz UV-C durante 15min (dosis máxima 14 kJ/m^2) a 28°C .

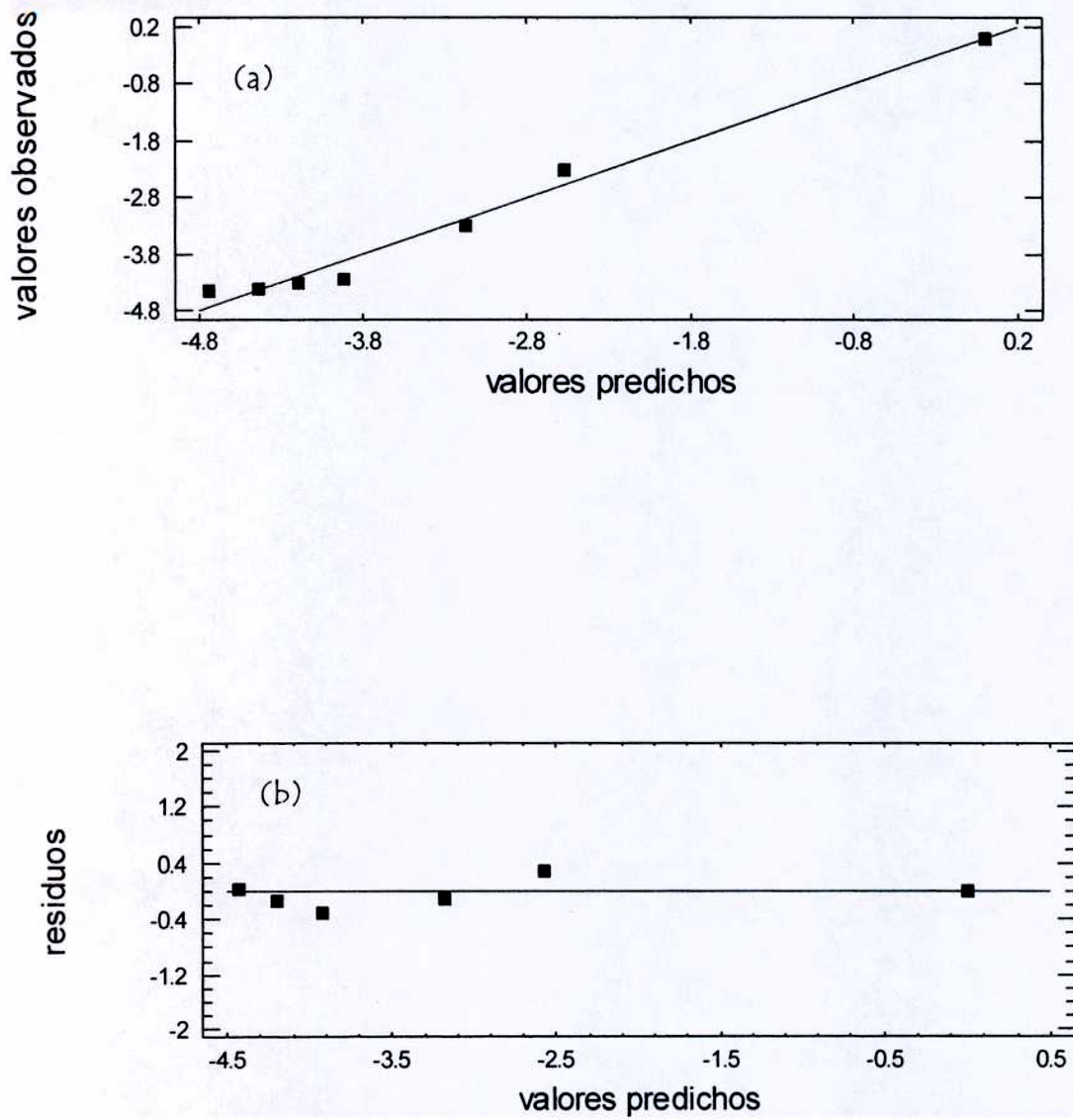
- Valores observados versus valores predichos por el modelo propuesto
- Residuales versus valores predichos por el modelo propuesto

Cóctel de E. coli



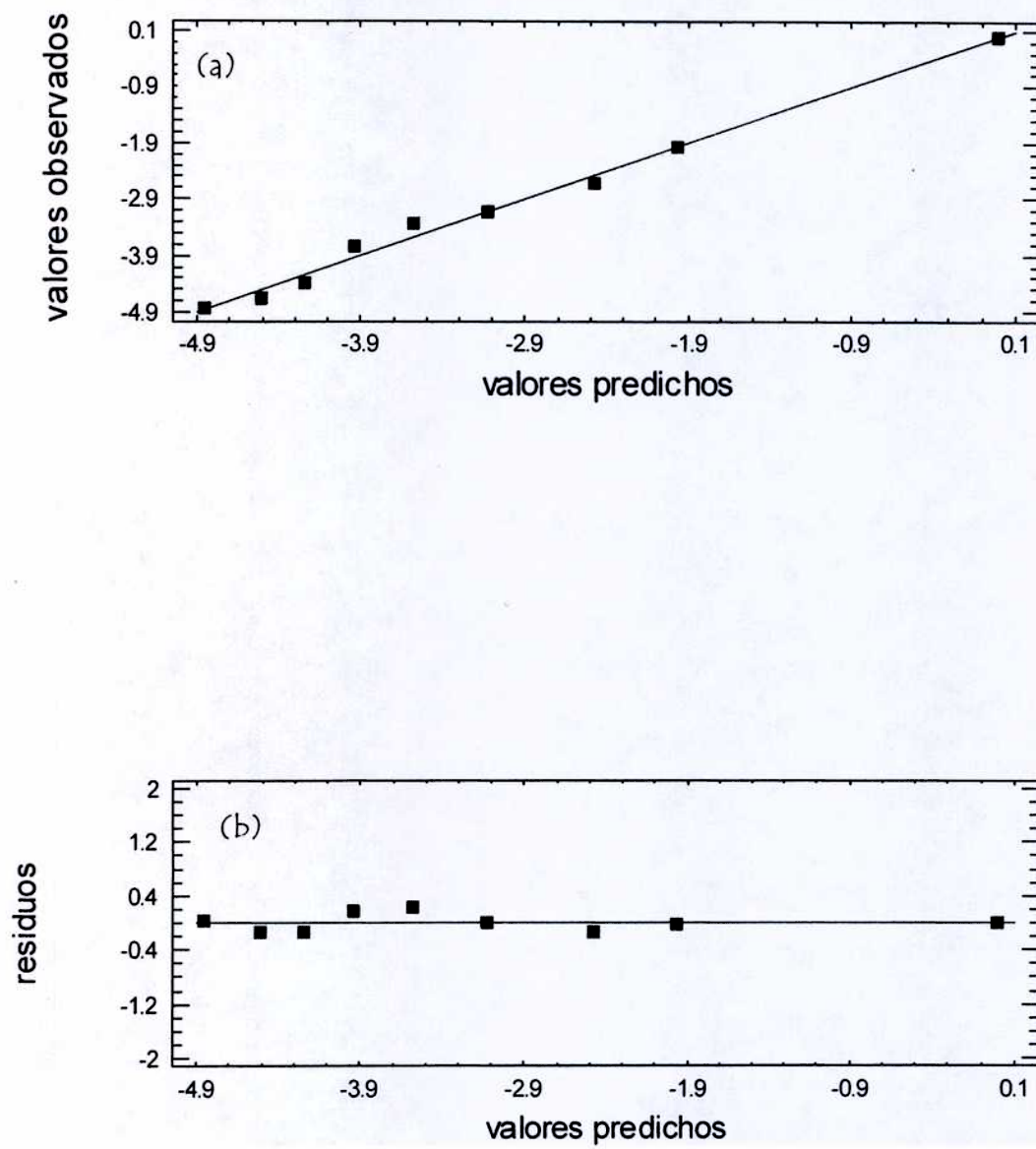
.....Figura 4.5 (continuación)

E. coli



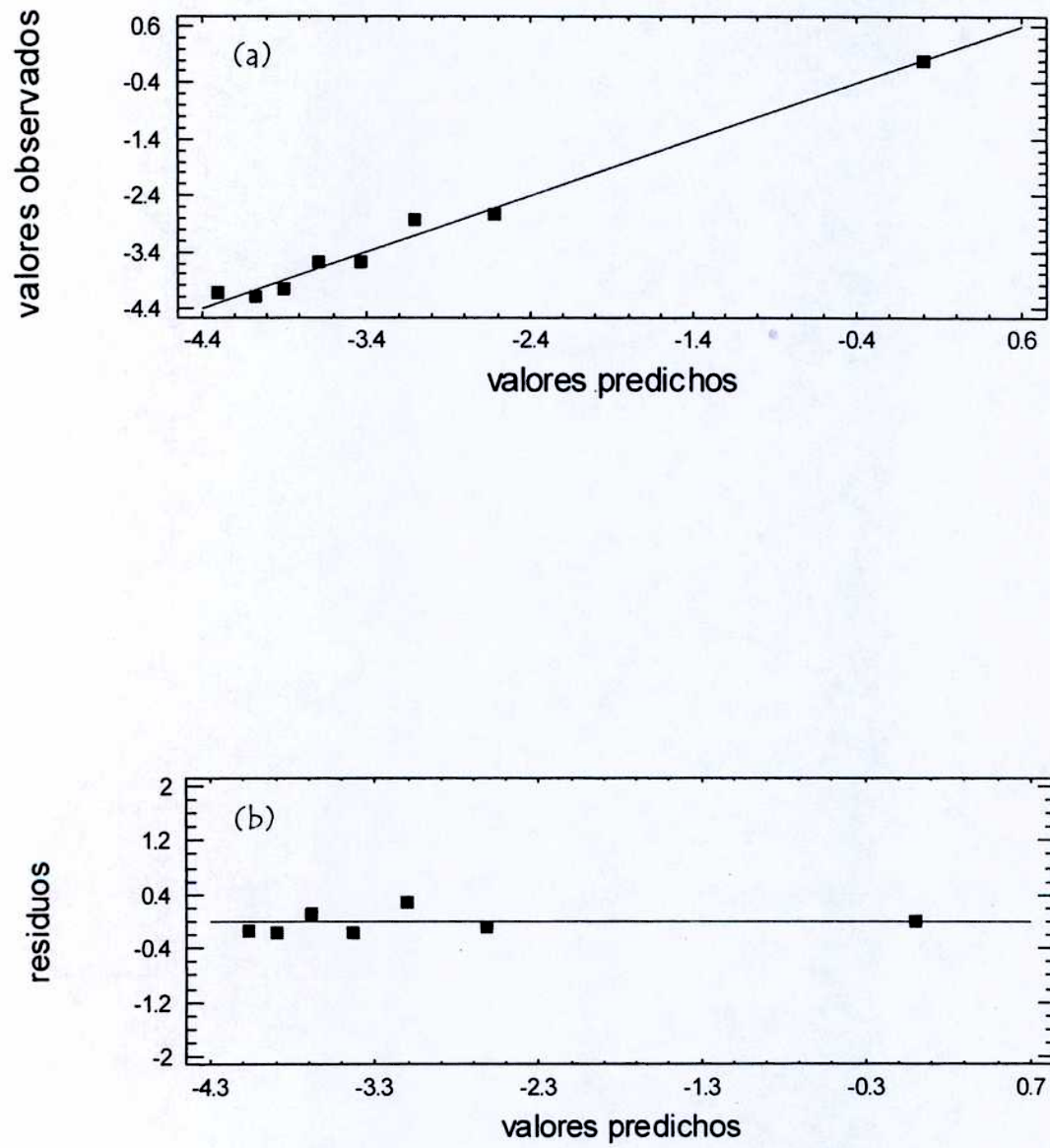
.....Figura 4.5 (continuación)

S. cerevisiae



.....Figura 4.5 (continuación)

L. innocua



A partir de los valores obtenidos para los parámetros h y n , se graficaron las distribuciones de frecuencias de resistencias de los distintos microorganismos en sistema modelo (Figura 4.6). La Tabla 4.4 exhibe, de modo complementario, los estadísticos que las caracterizan, calculados utilizando las ecuaciones 1.10 -1.13 presentes en el apartado 1.8.1.

Las distribuciones de frecuencias de resistencias obtenidas para la inactivación de *E.coli*; *S. cerevisiae* y *L. innocua* en sistema modelo resultaron muy similares, no pudiendo establecerse diferencias significativas en el patrón de muerte de las poblaciones microbianas utilizadas (Figura 4.6a). Las mismas no muestran frecuencia máxima y por lo tanto, carecen de moda. Este perfil de las curvas de frecuencias de resistencias estaría asociado a una mayoría de individuos que se destruye a un tiempo muy temprano dejando a una fracción de individuos de variada resistencia durante el tratamiento (Peleg y Cole, 1998). La variada sensibilidad podría atribuirse, tal como se mencionó anteriormente, a un efecto sombra de algunos elementos de volumen y a una distribución no homogénea de la radiación UV-C debido al establecimiento de un flujo laminar. Dado que el tratamiento propuesto considera múltiples pasadas, los elementos de volumen expuestos y no expuestos se mezclan a cada instante, observándose distribuciones de frecuencias, en promedio, marcadamente sesgadas hacia derecha (hecho demostrado por los elevados coeficientes de sesgo obtenidos) formando una notable cola, hecho que redundó en elevados valores de varianza debido a una amplia distribución de tiempos de muerte (Peleg y Cole, 1998).

Resulta interesante resaltar que en el caso de la utilización del cóctel de *E.coli* la distribución de frecuencias de resistencias del cóctel fue más estrecha y sesgada que la obtenida para el inóculo simple (Figura 4.6b). Este hecho es indicativo de una mayor sensibilidad del cóctel de *E. coli* al tratamiento con luz UV-C, evidenciándose también por un menor valor de la media, tc.

Figura 4.6 Distribuciones de frecuencias de resistencias en función del tiempo (min), calculadas según el modelo de Weibull para la inactivación de los distintos microorganismos inoculados en sistema modelo sometido a irradiación con luz UV-C durante 15 min. (dosis máxima 14 kJ/m^2) a 28°C

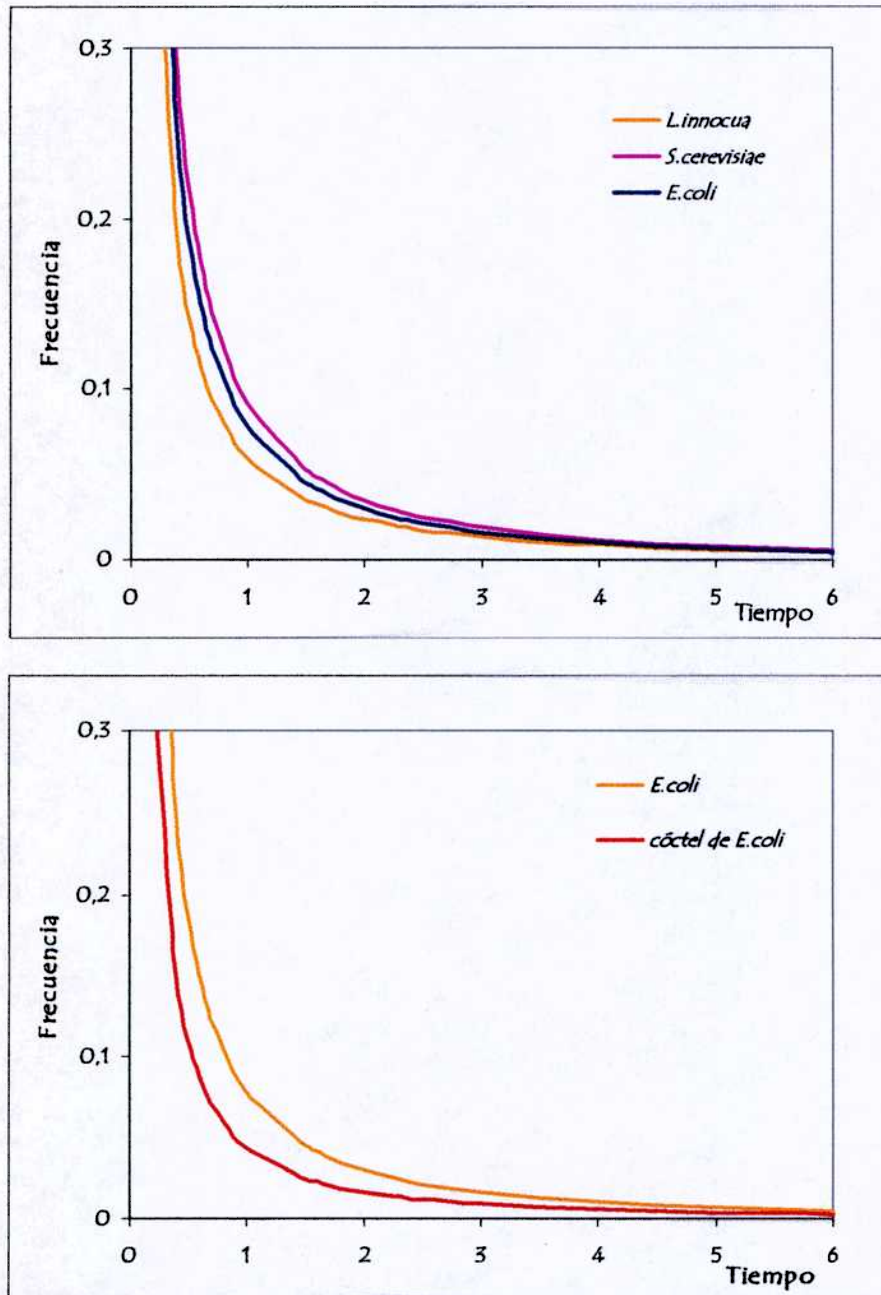


Tabla 4.3 Análisis estadístico de las curvas de distribución de frecuencia de la inactivación de los distintos microorganismos inoculados en sistema modelo sometido a irradiación con luz UV-C durante 15min. (dosis máxima 14 kJ/m²) a 28°C .

Tratamiento	Moda (min.)	Media (min.)	Coefficiente de sesgo (-)	Varianza (min. ²)
<i>E.coli</i>	-	0,8	26	17
Cóctel de <i>E. coli</i>	-	0,5	76	27
<i>S.cerevisiae</i>	-	0,8	19	12
<i>L. innocua</i>	-	1,1	64	83

4.4.2 - Sistema modelo acidificado

En esta etapa se quiso evaluar las respuestas individuales de *E. coli* y *S. cerevisiae* en sistema modelo con pH ajustado al valor correspondiente a jugo de manzana con el propósito de evaluar su influencia (ver apartado 3.2). El sistema modelo acidificado e inoculado fue procesado en flujo continuo con el equipo de irradiación UV-C, tal como se describe detalladamente en los apartados 3.5.1; y 3.10

4.4.2.1.- Curvas de inactivación

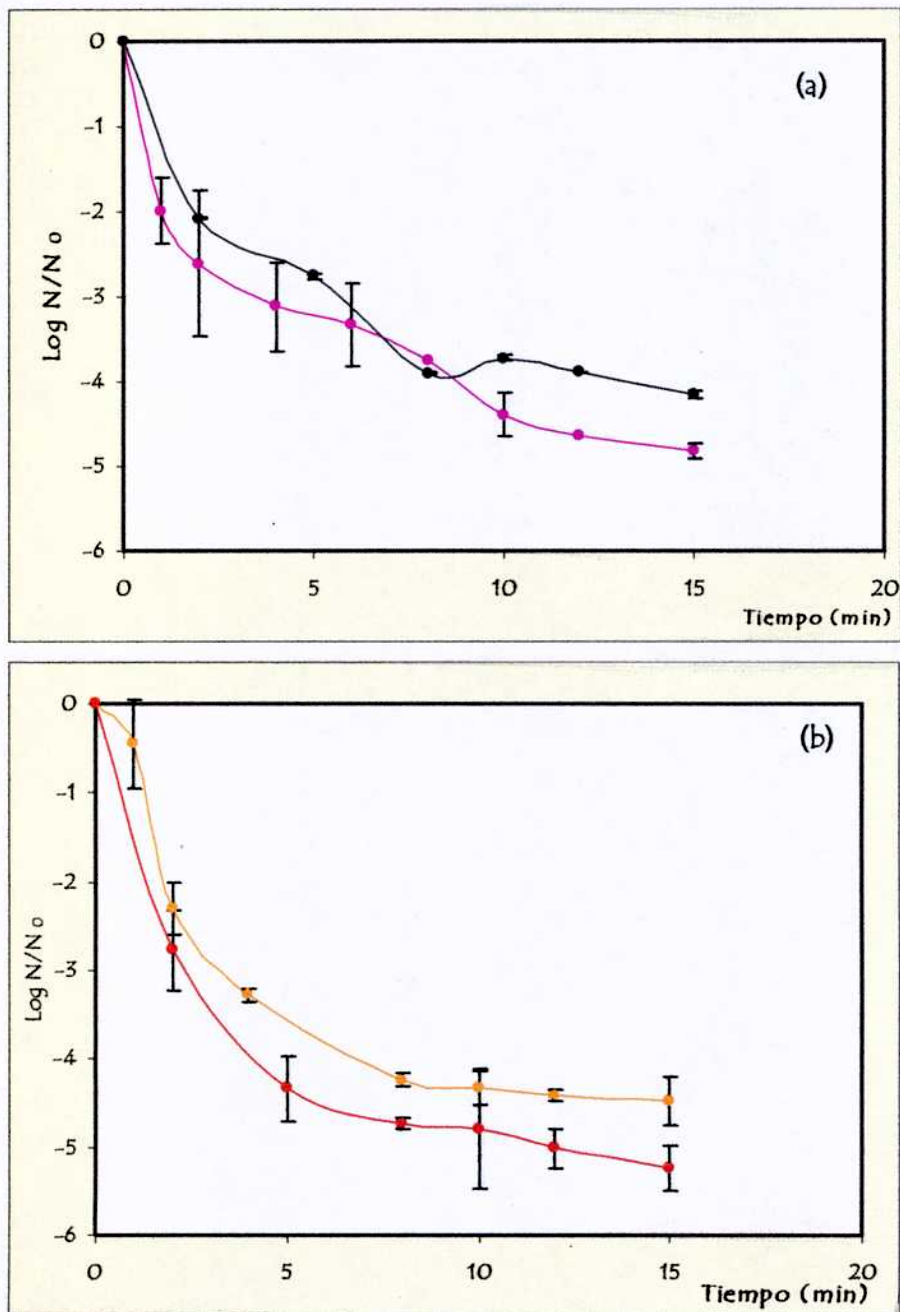
La Figura 4.7 muestra las curvas de inactivación promedio en función del tiempo de *E. coli* y *S. cerevisiae* en sistema modelo (agua peptonada al 0,1%) con pH 3,0 y con la aplicación de luz UV-C. Con el propósito de comparación se exhiben conjuntamente las correspondientes curvas de inactivación en sistema modelo con pH sin ajustar (pH=7,02). Cabe destacar que tanto para tanto *S. cerevisiae* como *E. coli* la disminución del pH del medio por sí sola no fue significativa reduciendo la población inicial en los sistemas con pH ajustado a 3,0 y sin irradiar (no se muestran las curvas).

Puede observarse en la Figura 4.7 un pequeño aumento en la inactivación de *E.coli*, en sistema modelo pH 3,0 comparado con la inactivación observada en sistema modelo sin ajustar ambos sometidos a irradiación con luz UV-C. Mientras que la cepa de *E.coli* utilizada en este estudio (ver apartado 3.5) demostró levemente menos resistencia al tratamiento en un medio acidificado otros autores no confirman dicho comportamiento. Koutchma y col. (2004), no observaron una diferencia significativa en las inactivaciones obtenidas trabajando con *E.coli* ATCC 25253 en sistema modelo (0,13% caramelo en buffer de ácido málico, 10°Brix) ensayando valores de pH en el rango de 3-5.

S. cerevisiae (Figura 4.7.a) presentó un patrón similar de inactivación en ambos medios estudiados sin definir una tendencia clara de comportamiento

Figura 4.7 Curvas de inactivación de los distintos microorganismos en sistema modelo con o sin pH ajustado sometido a irradiación con luz UV-C durante 15 min. (dosis máx. 14 kJ/m^2) a 28°C .

- S. cerevisiae*: sistema modelo pH 7,0 (●) y sistema modelo pH 3,0 (●); desviación estándar (I)
- E. coli*: sistema modelo pH 7,0 (●) y sistema modelo pH 3,0 (●); desviación estándar (I)



respecto de la influencia del pH en el medio de irradiación. Es bien sabido que las levaduras son más resistentes a condiciones adversas de pH que las bacterias (Splittstoesser, 1987).

4.4.2.2. -Aplicación del modelo de distribución de frecuencias tipo Weibull

Con el objeto de explicar con mayor claridad las diferencias observadas entre los distintos tratamientos, se aplicó el modelo de distribución de frecuencias tipo Weibull. La Figura 4.8. muestra las curvas predichas por el modelo propuesto, junto a los datos experimentales de las curvas de inactivación. La Tabla 4.5 muestra los parámetros b y n característicos del mismo. El modelo se ajustó adecuadamente a los datos experimentales (Figura 4.8, Tabla 4.5). Los valores del coeficiente de determinación, R^2 fueron del orden de 98% y los niveles de significación para el estadístico Fisher fueron también muy elevados ($\alpha < 0.000001$).

En la Figura 4.10, con fines de comparación, se graficaron las distribuciones de frecuencia de resistencias en sistema modelo y sistema modelo acidificado. Tanto *E.coli* como *S.cerevisiae* exhibieron distribuciones de frecuencias similares en los dos sistemas modelo. La mayor eficiencia del proceso de desinfección UV-C en el caso de *E. coli* se corrobora mediante el análisis de la distribuciones correspondientes donde *E.coli* obtuvo mayor coeficiente de sesgo, un valor de media, t_c , aproximadamente 3 veces inferior que *S.cerevisiae* y con menor varianza de tiempos de muerte.

Figura 4.8 Aplicación del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull a las curvas de inactivación de los distintos microorganismos en sistemas modelo con y sin pH ajustado sometidos a irradiación con luz UV-C durante 15min (dosis máx. 14 kJ/m²) a 28°C. (—) valores predichos; (●) datos experimentales

- a. *S. cerevisiae*: pH 7,0 (●) y pH 3,0 (●); desviación estándar (I)
 b. *E. coli*: pH 7,0 (●) y pH 3,0 (●); desviación estándar (I)

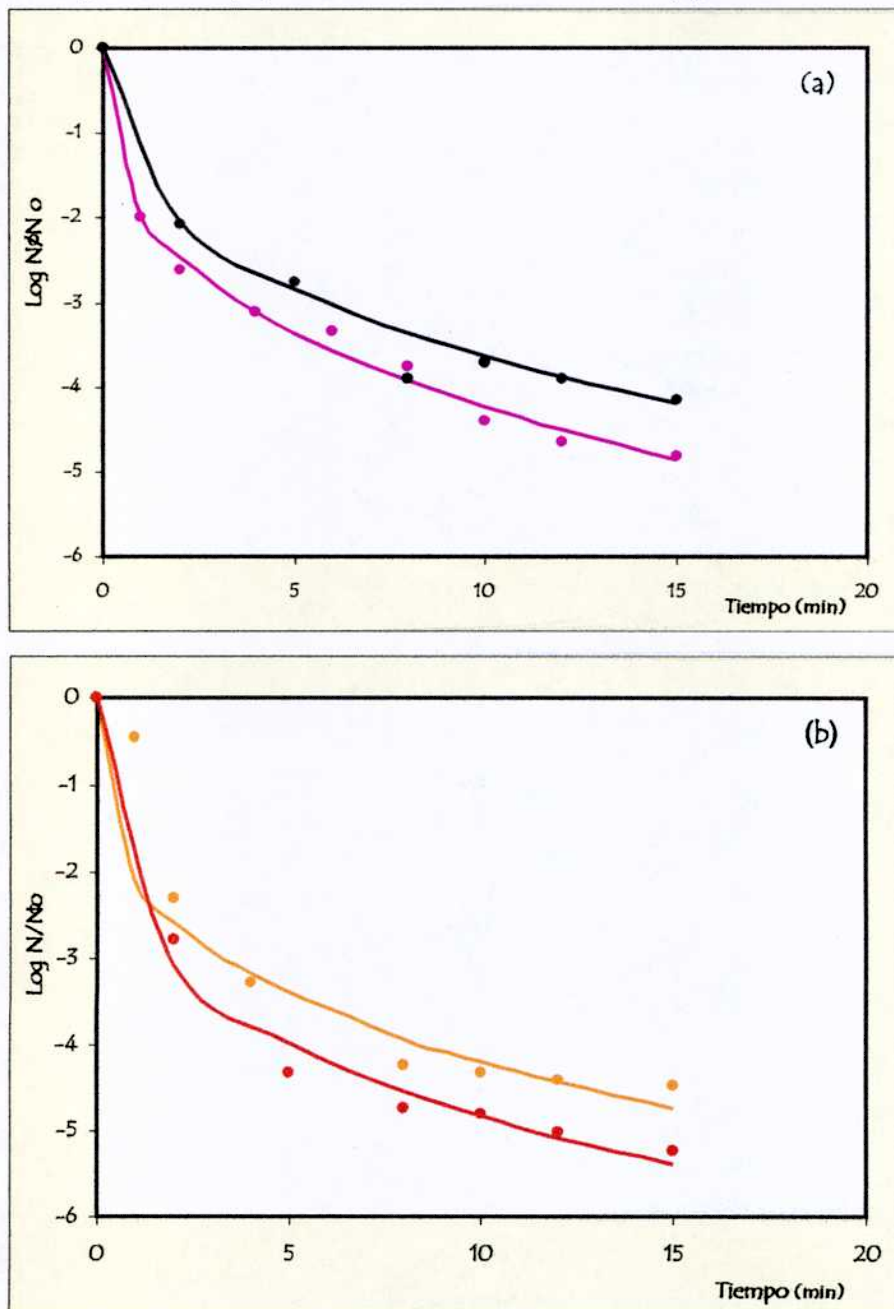


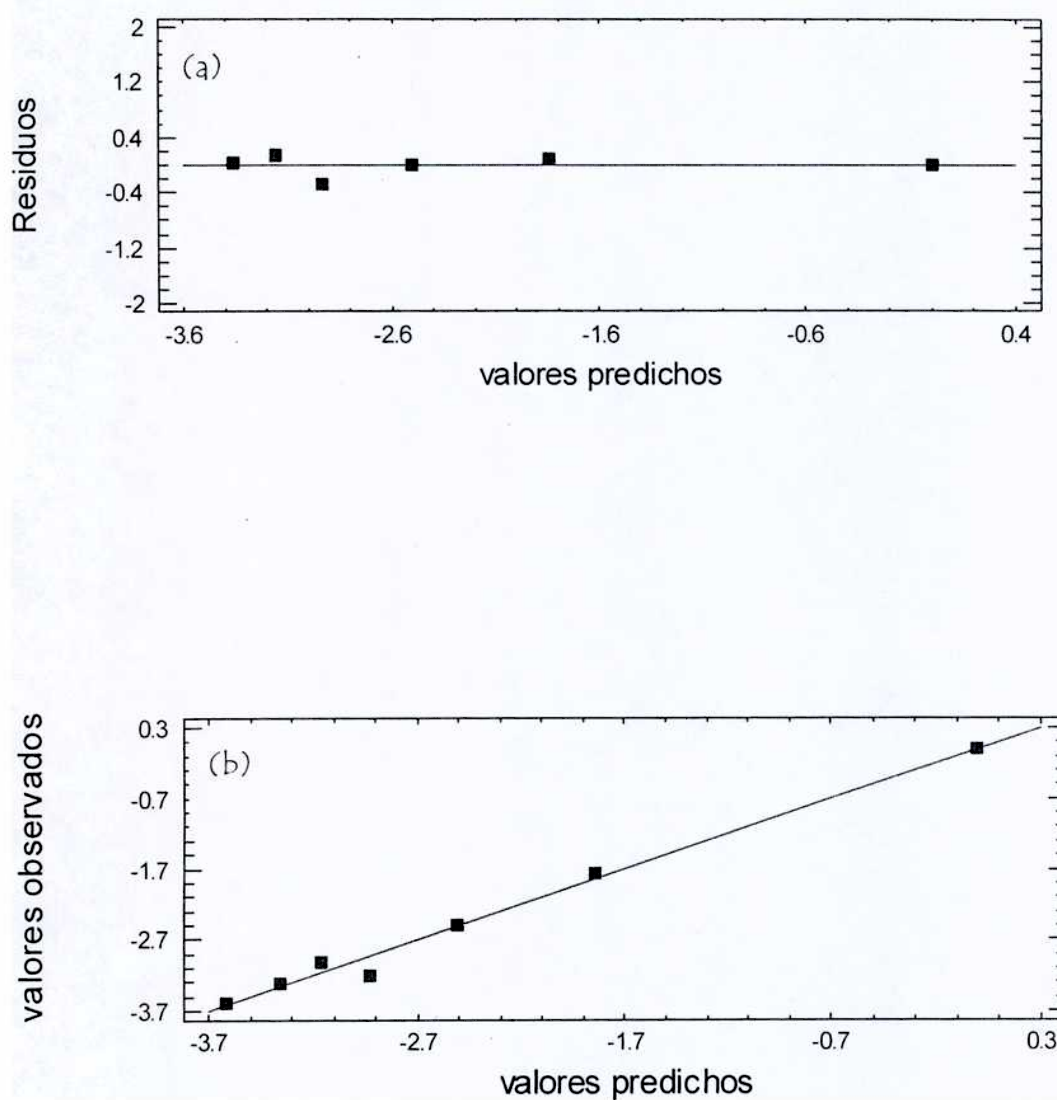
TABLA 4.5- Parámetros correspondientes al modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull, para el comportamiento de los distintos microorganismos inoculados en sistema modelo con pH ajustado a 3,0 y sometido a irradiación con luz UV-C durante 15min (dosis máxima 14 kJ/m²) a 28°C.

Tratamiento	b	n	R ² ajustado	F	Nivel de significación (α)
<i>E.coli</i>	2,56	0,28	98,3	1059	<0,00001
<i>S.cerevisiae</i>	1,60	0,35	99,8	6924	<0,00001

Figura 4.9. Validación interna del modelo propuesto que relaciona el Número de reducciones logarítmicas de los distintos microorganismos en sistema modelo acidificado tras el tratamiento con luz UV durante 15min (dosis máx. 14 kJ/m²) a 28° C.

- Valores observados versus valores predichos por el modelo propuesto
- Residuales versus valores predichos por el modelo propuesto

S. cerevisiae



...Figura 4.9 (continuación)

E.coli

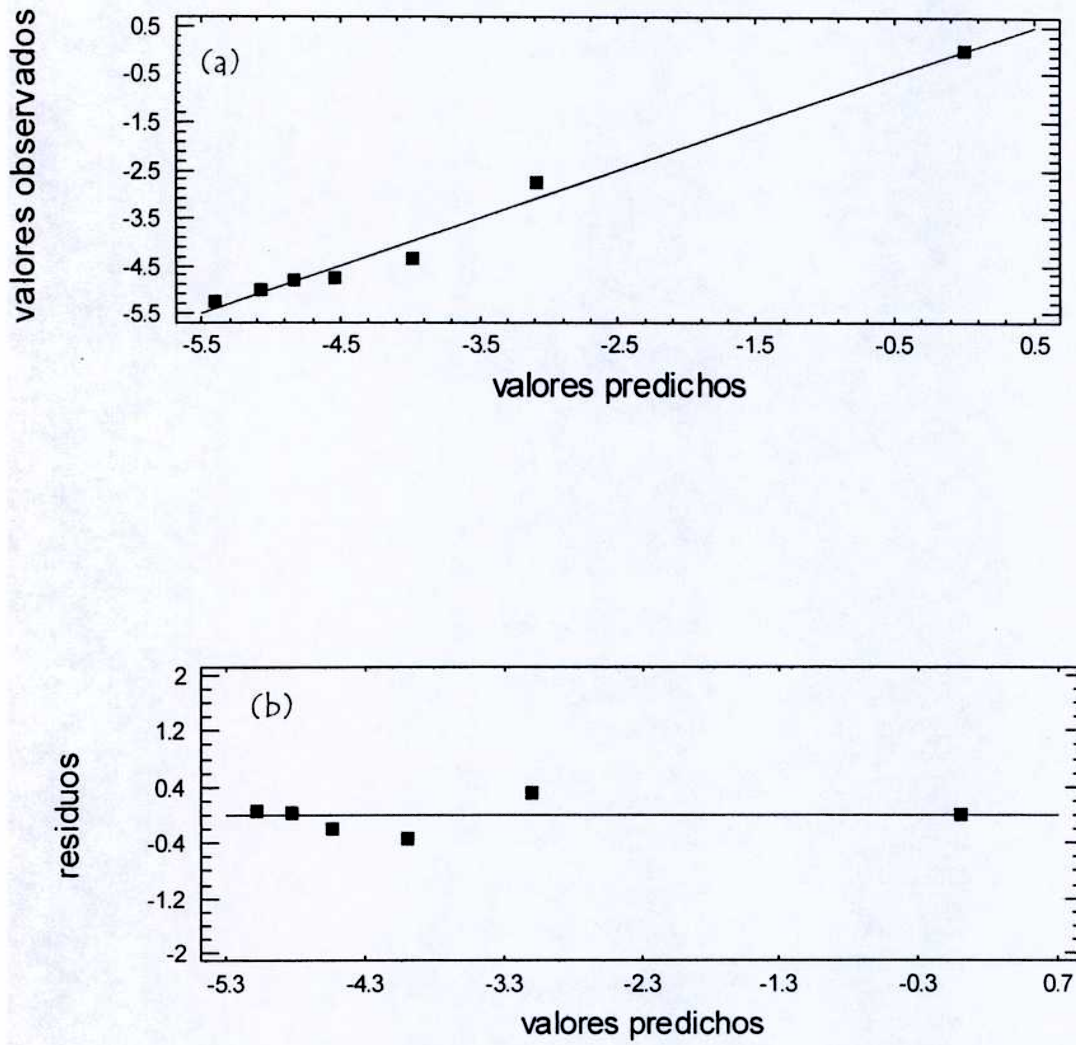


Figura 4.10 Distribuciones de frecuencias de resistencias en función del tiempo (minutos), calculadas según el modelo de Weibull para la inactivación de los distintos microorganismos en sistema de modelo acidificado sometido a irradiación UV-C durante 15 minutos (dosis máx 14 kJ/m^2) a 28°C

a. *Escherichia coli*

b. *Saccharomyces cerevisiae*

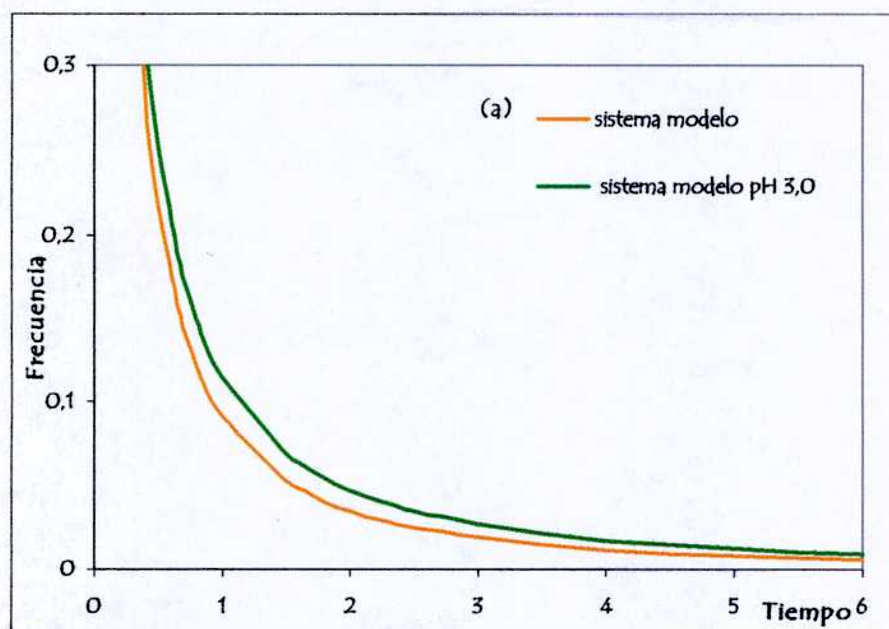
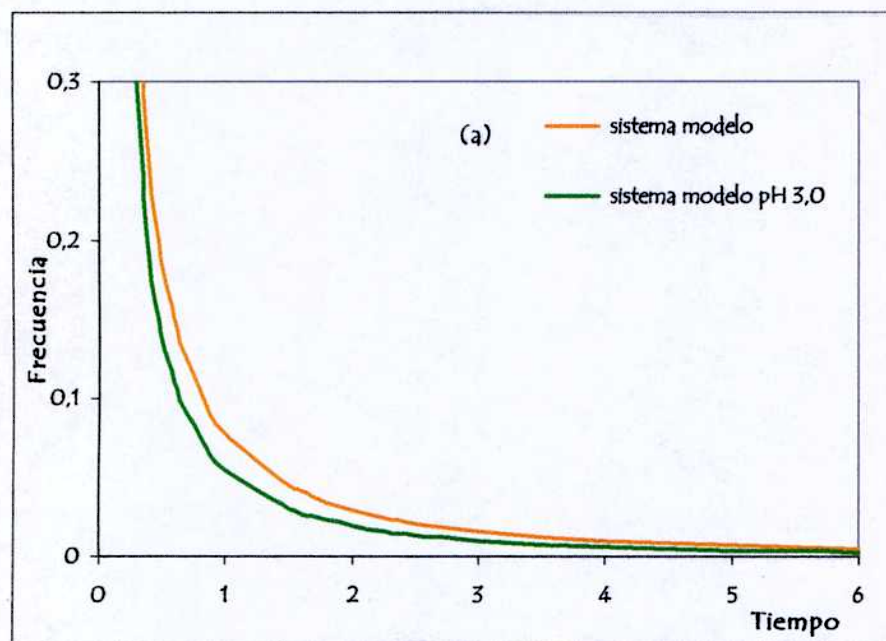


Tabla 4.6 Análisis estadístico de las curvas de distribución de frecuencia de la inactivación de los distintos microorganismos en sistema de modelo acidificado sometido a irradiación UV-C durante 15 minutos (dosis máx 14kJ/m²) a 28°C

Tratamiento	Moda (min)	Media (min)	Coefficiente de sesgo (-)	Varianza (min ²)
<i>E.coli</i>	-	0,5	38	9
<i>S.cerevisiae</i>	-	1,3	15	24

4.4.3.- Jugo comercial

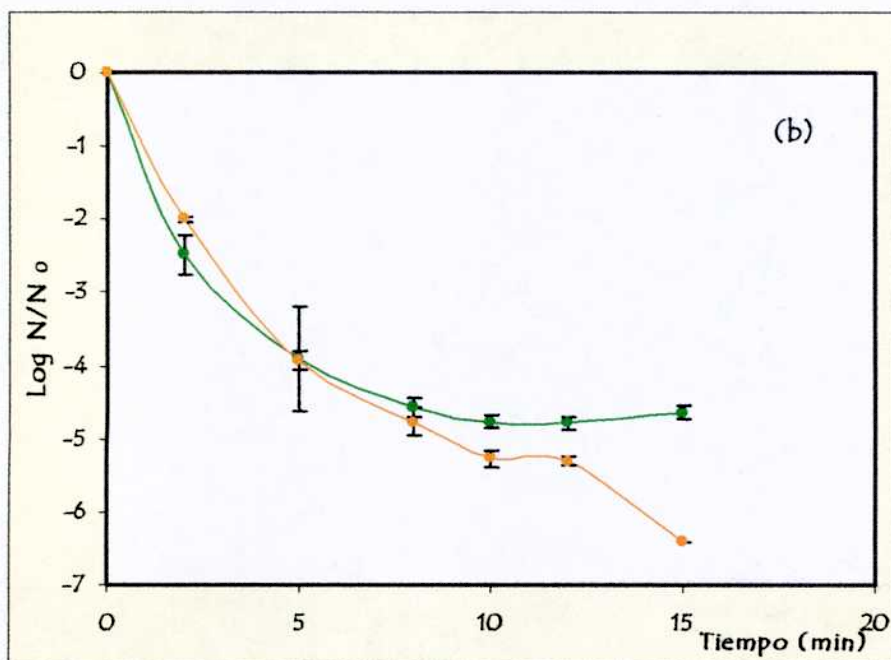
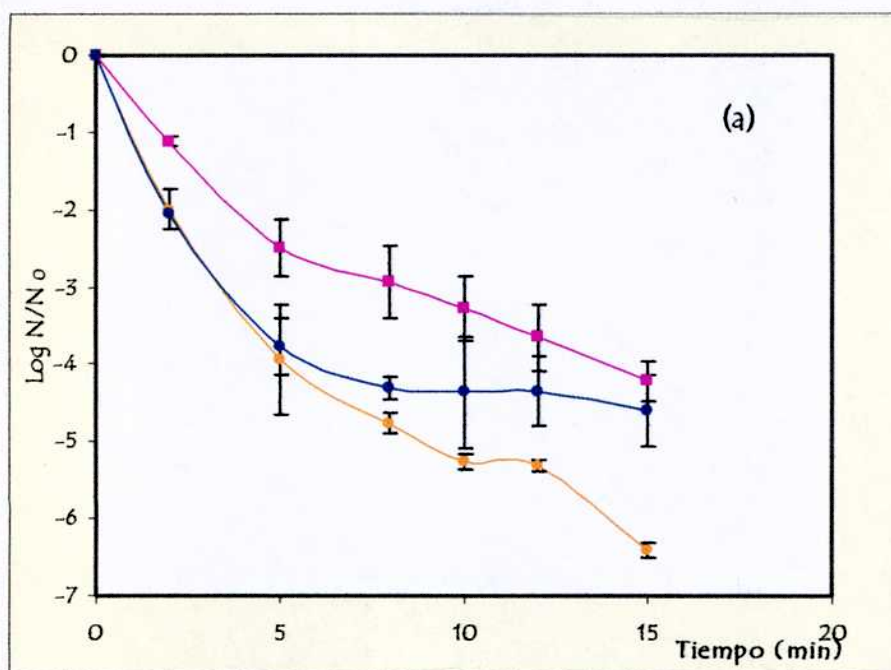
En esta etapa se quiso evaluar las respuestas individuales de *E. coli*; *S. cerevisiae* y *L. innocua* y de 2 cócteles: uno correspondiente a 4 cepas de *E. coli* y otro a 5 especies de levaduras, en sistemas frutales reales procesados en flujo continuo con el equipo de irradiación UV-C, tal como se describe detalladamente en los apartados 3.5.1; 3.5.2 y 3.10. Por este motivo, se eligió un jugo de manzana adquirido en el mercado local (TROPICANA, S.A, Entre Ríos, Argentina), pasteurizado, clarificado, sin conservantes y de vida útil extendida. Se determinó el pH del jugo, el cual osciló entre 3,0 y 3,3, y los grados Brix se encontraron entre 11,8 y 12,4.

4.4.3.1.- Curvas de inactivación

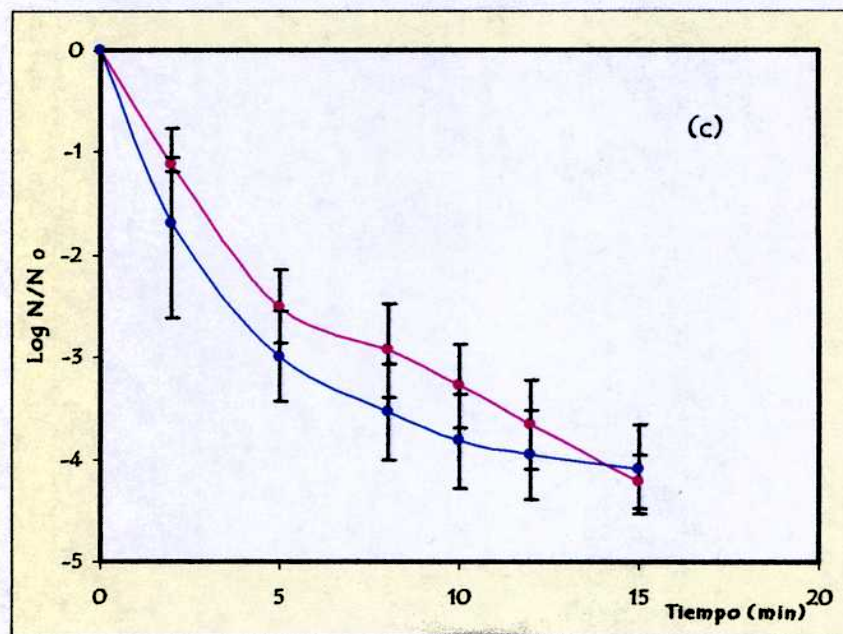
La Figura 4.11.a muestra los resultados del estudio del comportamiento de las poblaciones individuales (*S.cerevisiae*; *L. innocua* y *E. coli*) en jugo de manzana comercial (JMC) procesado con luz UV-C. Las curvas presentaron, en general, una marcada concavidad hacia arriba con un perfil de inactivación semejante al observado en el caso de sistema modelo (ver apartado 4.4.1.1) alcanzando en promedio entre 4,2 y 6,5 reducciones logarítmicas luego de 15 minutos de procesamiento. No se observó en ningún caso presencia de un hombro inicial. En JMC sin tratamiento UV-C (control) el recuento de los tres microorganismos se mantuvo durante el tiempo de muestreo aproximadamente constante e igual al valor inicial (no se muestran estas curvas). En los sistemas JMC expuestos al UV, *E. coli* y *L. innocua*, mostraron una inactivación similar a tiempos cortos de exposición ($t \leq 5$ minutos; $4,7 \text{ kJ/m}^2$) mientras que al aumentar la dosis (tiempos de tratamiento mayores) la inactivación para *E. coli* fue significativamente más pronunciada. Esto puede explicarse a un posible efecto sinérgico del pH del jugo comercial ($\text{pH} \sim 3,2$) con la acción de la luz UV-C. En el caso de *S. cerevisiae*, se obtuvo una inactivación similar a las observadas en sistema modelo y sistema

Figura 4.11. Curvas de inactivación de los distintos microorganismos inoculados en jugo comercial sometidos a irradiación con UV-C durante 15min (dosis máxima 14 kJ/m²) a 28°C

- S. cerevisiae* (●), *E. coli* (○), *L. innocua* (●); desviación estándar (I)
- E. coli* (○), cóctel de *E. coli* (●); desviación estándar (I)
- S. cerevisiae* (●), cóctel de levaduras (●); desviación estándar (I)



... Figura 4.11 (continuación)



modelo acidificado. Tal como era esperado, el pH del jugo de manzana comercial no tuvo un efecto significativo en la inactivación de la levadura por acción de la luz UV-C. Existe información limitada en bibliografía acerca de la inactivación microbianas en equipos de irradiación UV-C de características similares y en muchos de estos trabajos la información es incompleta con respecto a la composición del medio; dosis UV-C; etc.)

Guerrero-Beltrán y col. (2005), estudiando la inactivación obtenida para *E. coli*; *S. cerevisiae* y *L. innocua*, entre otros, por acción de la luz UV-C en jugo de manzana comercial (pH 3,75 ; 11,82° Brix), aplicando dosis de 75/450 kJ/m² con flujos entre 0,073 y 0,55 L/min. Estos autores establecieron el mismo orden de sensibilidad para los tres microorganismos utilizados en este estudio, siendo la levadura la más resistente, seguida por *L. innocua*, cuyo número de reducciones logarítmicas se acerca al obtenido para el microorganismo más sensible, *E. coli*.

López- Malo y col. (2001) investigando sobre el efecto de la luz UV-C en jugo de zanahoria trabajando con equipo continuo y flujos entre 0,36-0,96 L/min reportaron una inactivación que superó los límites de detección (< 10 UFC/ mL) para las bacterias tras tratamientos de 30 o 12 minutos (tiempos correspondientes a los distintos flujos) mientras que para hongos y levaduras la inactivación obtenida fue del orden de 1-1,5 ciclos logarítmicos (10² UFC/mL).

En los ensayos con jugo comercial, se trabajó también con cócteles de microorganismos, intentando ver el comportamiento de los mismos en condiciones más cercanas a las reales donde normalmente se trata de flora contaminante compuesta de diferentes cepas de las distintas especies microbianas con las consiguientes interacciones intra e inter-especie. Del mismo modo que en los ensayos realizados en sistema modelo con pH sin ajustar, se utilizó un cóctel de *E.coli* (ver apartado 3.5.2) y un cóctel de las levaduras que constituyen en gran parte la flora nativa contaminante de los jugos frutales compuesta de: *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida parapsilosis* y *Picchia anomala*. Las curvas obtenidas en esta matriz fueron bastante parecidas en cuanto a su forma (Figura 4.11.b, c). En ningún caso se hizo notable la presencia de hombro mientras que en casi todas las curvas se confirmó la presencia de cola. No existieron diferencias muy marcadas en el comportamiento de las

poblaciones mixtas respecto de las respuestas individuales pero se puede apreciar que a dosis elevadas, el cóctel de *E. coli*, fue levemente más resistente que el inóculo simple mientras que a dosis bajas el comportamiento fue inverso. Esto puede deberse a una menor eficacia del proceso de desinfección UV-C debido a la heterogeneidad de la población y a un posible aumento de la resistencia debido a la comunicación célula-célula mediante autoinductores (moléculas liberadas al medio) que puede darse dentro de una población mixta ("quorum sensing" en el habla inglesa) (Miller y Bassler, 2001; Waters y Bassler, 2005).

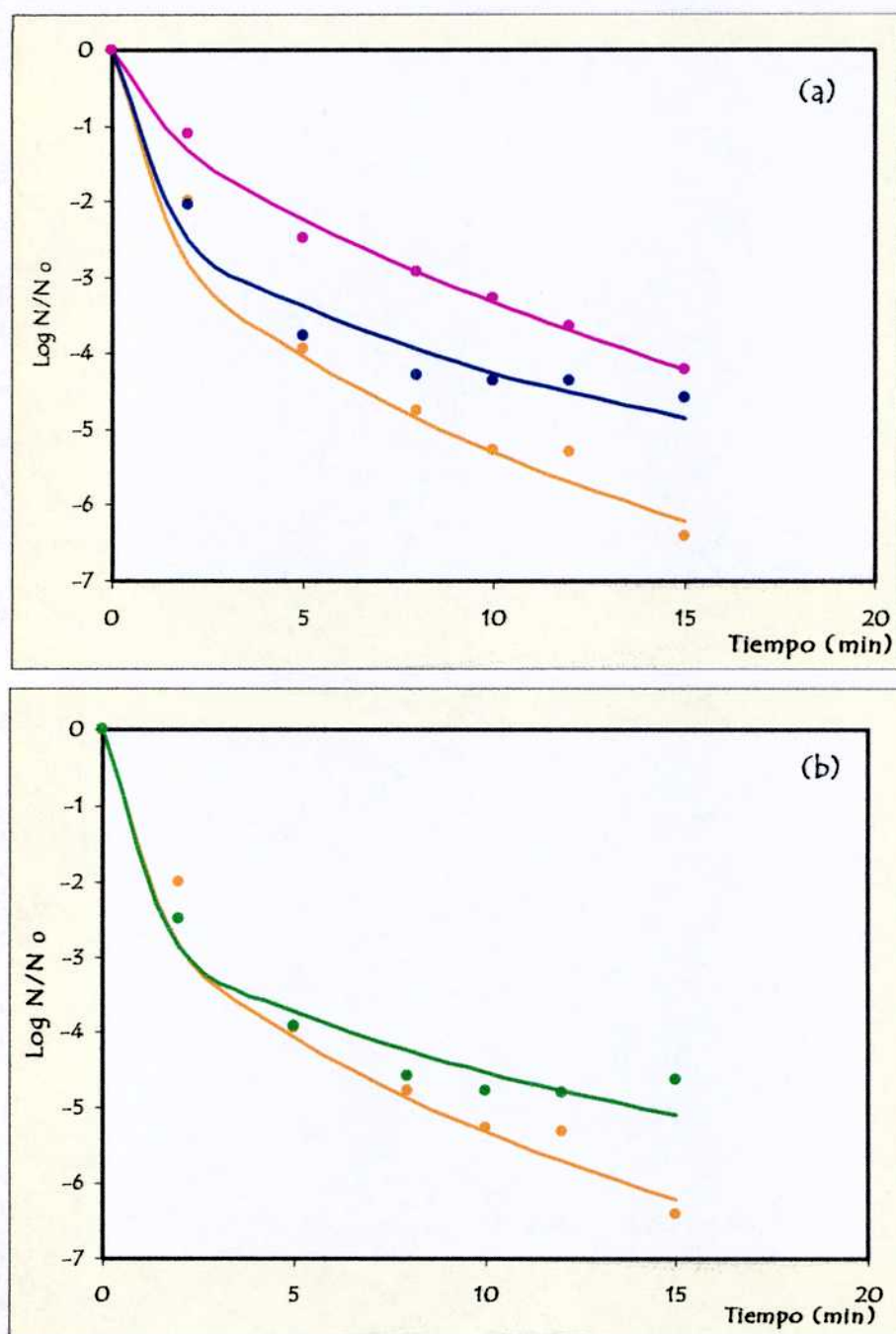
En el caso de *S. cerevisiae*, la misma fue algo más resistente que el cóctel de levaduras (Figura 4.11c) validando el uso de la misma para estudios de flora deteriorativa.

4.4.3.2 –Utilización de la microbiología predictiva: Aplicación de un modelo de distribución de frecuencias de resistencias Weibulliano

La Figura 4.12 muestra las curvas predichas por el modelo de Weibull, junto a los datos experimentales de las curvas de inactivación en JMC. La Tabla 4.7 informa los parámetros b y n característicos del mismo. El modelo weibulliano ajustó adecuadamente a los datos experimentales con valores del coeficiente de determinación, R^2 en el rango de 96 a 99% y niveles de significación para el estadístico Fisher muy altos ($\alpha \leq 0,0001$). La aplicación del modelo de Weibull muestra más claramente las diferencias en la respuesta de los microorganismos en jugo de manzana comercial (JMC).

Figura 4.12. Aplicación del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull a las curvas de inactivación de los distintos microorganismos inoculados en jugo comercial sometido a radiación UV-C durante 15 min (dosis máxima 14 kJ/m^2); a 28°C . (—) valores predichos; (●) datos experimentales

- a. *S. cerevisiae* (●), *E. coli* (●), *L. innocua* (●)
- b. *E. coli* (●), cóctel de *E. coli* (●)
- c. *S. cerevisiae* (●), cóctel de levaduras (●)



... Figura 4.12 (continuación)

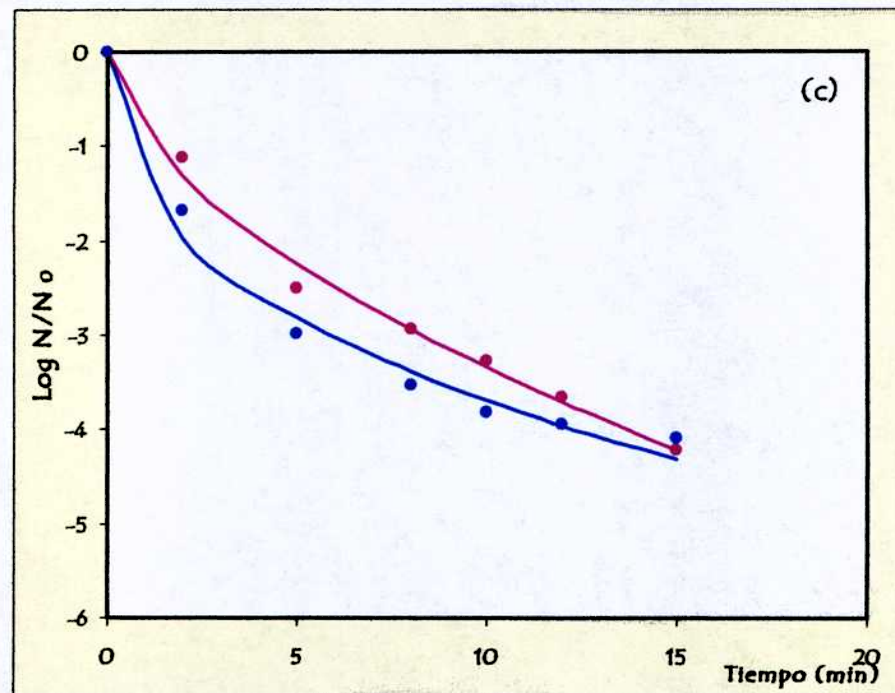


TABLA 4.7 Parámetros correspondientes al modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull, para el comportamiento de los distintos microorganismos inoculados en jugo de manzana comercial sometidos a irradiación con luz UV-C durante 15min (dosis máxima 14 kJ/m^2) a 28°C .

Tratamiento	b	n	R ² ajustado	F	Nivel de significación (α)
<i>E.coli</i>	2,61	0,39	98,6	1027	<0,00001
Cóctel de <i>E.coli</i>	2,34	0,29	96,6	508	0,0001
<i>S.cerevisiae</i>	0,89	0,58	99,0	1258	<0,00001
Cóctel de levaduras	1,50	0,39	98,2	873	0,00001
<i>L.innocua</i>	2,00	0,33	96,1	413	0,0001

El buen ajuste del modelo a los datos experimentales se pudo analizar también mediante los métodos gráficos de validación interna representados en la Figura 4.13 donde, para todos los microorganismos estudiados, los datos experimentales se distribuyen cerca de la línea de regresión predicha por el modelo y los residuales se distribuyeron en una banda homogénea en función de los valores predichos. En todos los casos se obtuvieron valores de $n < 1$, hecho que se pone de manifiesto por la marcada concavidad hacia arriba de las curvas, ya comentado en apartados anteriores. Las curvas de inactivación correspondientes a *L. innocua* y el cóctel de *E. coli* con un quiebre más pronunciado en su concavidad exhibieron los valores más bajos de n .

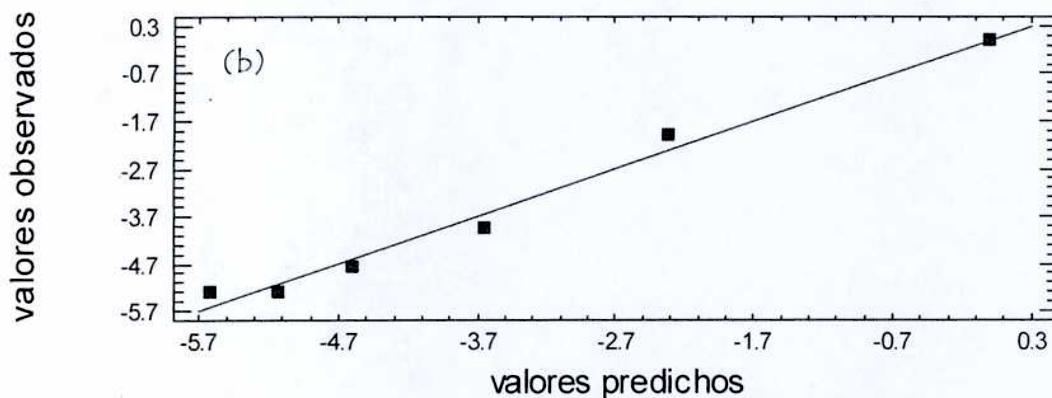
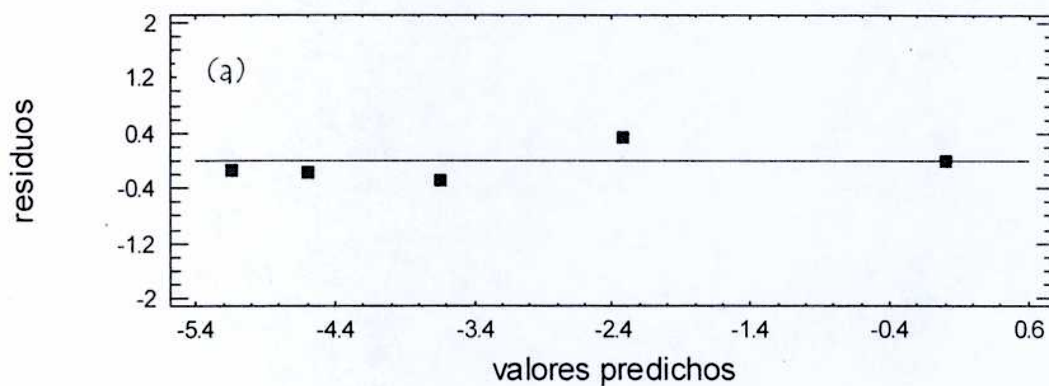
Los valores de los parámetros b y n fueron utilizados para obtener las distribuciones de frecuencias de resistencias correspondientes a los distintos microorganismos estudiados (Figura 4.14), calculando los estadísticos asociados a cada distribución (Tabla 4.8).

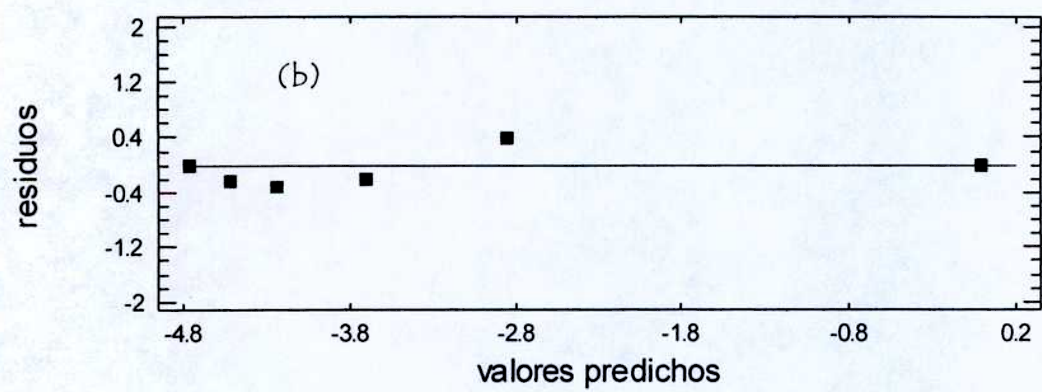
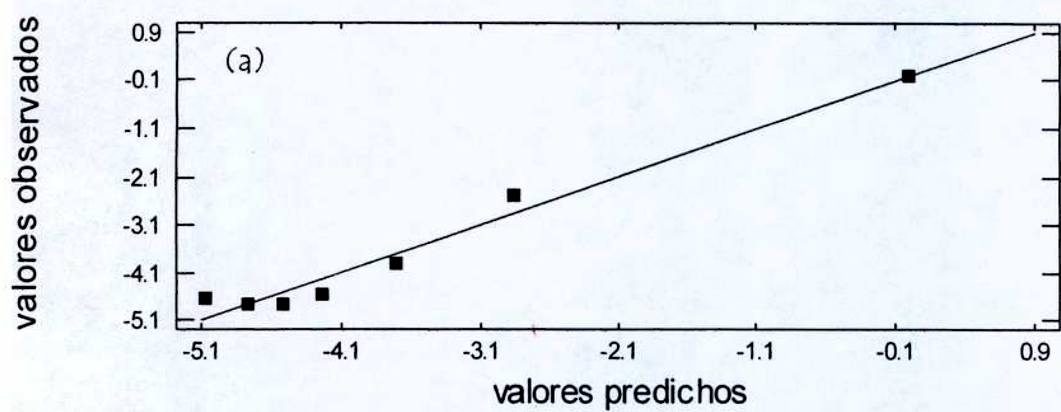
Las distribuciones de frecuencias de resistencias carecieron, al igual que en los otros ensayos realizados, de moda, presentando un fuerte desvío a la derecha el cual se evidencia por valores elevados de coeficiente de sesgo y se presentan hasta el minuto 6 de tratamiento con el propósito de una mejor comprensión de las distribuciones, dado que más allá de ese tiempo las curvas no presentan cambios significativos. *E. coli* presentó el menor valor de media y varianza en la distribución de tiempos de muerte indicando que la mayor parte de la población muere a una dosis muy baja (tiempo muy corto) y dejando una muy baja proporción de resistentes. El cóctel de *E. coli* y *L. innocua* siguieron con valores de media levemente mayores ($t_c = 0,6$ y $0,8$ min., respectivamente) presentado distribuciones con mayor varianza en los tiempos de muerte, factor que eleva la media obtenida. En particular, el cóctel de *E. coli* presentó un coeficiente de sesgo muy elevado. En este caso, si bien a dosis muy bajas la mayor parte de la población muere, deja una fracción de resistentes que se evidencia a tiempos mayores. Este comportamiento

Figura 4.13. Validación interna del modelo propuesto que relaciona el Número de reducciones logarítmicas de los distintos microorganismos en jugo de manzana comercial sometido a irradiación con luz UV-C durante 15 min. (dosis máxima 14 kJ/m^2) a 28° C .

- a. Valores observados versus valores predichos por el modelo propuesto
- b. Residuales versus valores predichos por el modelo propuesto

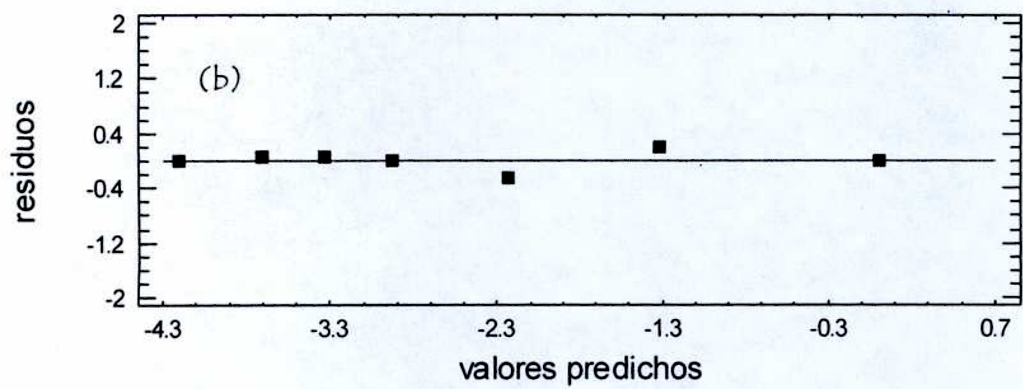
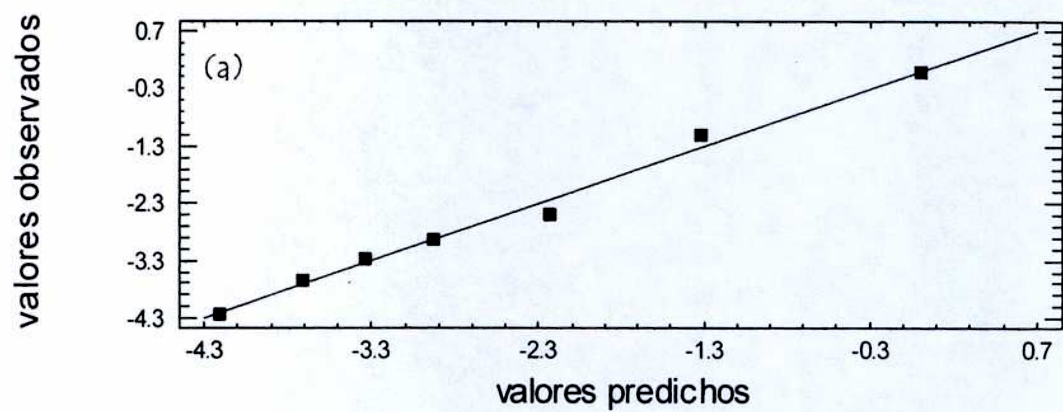
E.coli





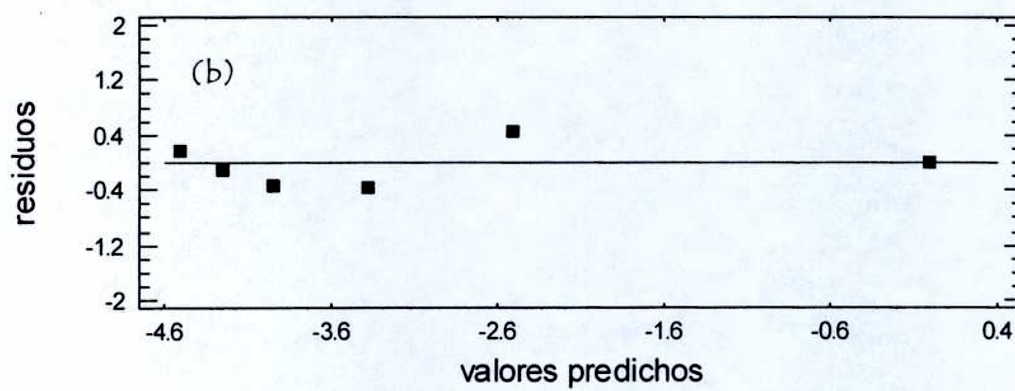
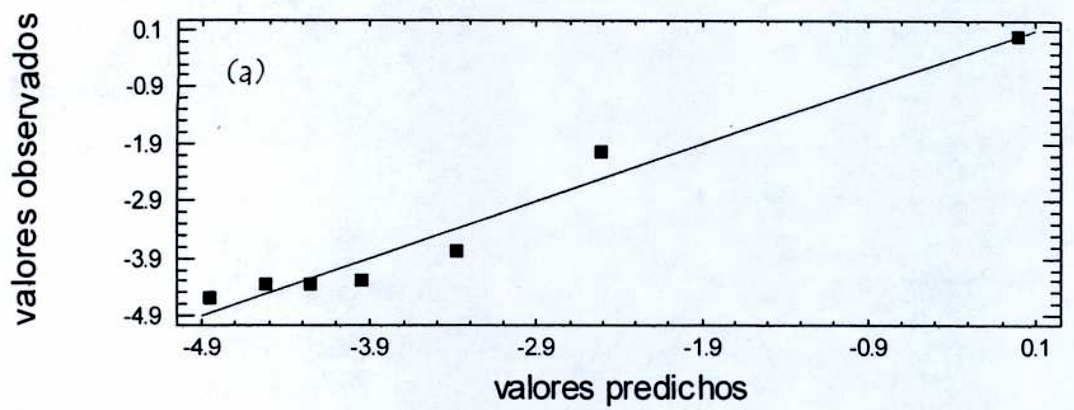
...Figura 4.13 (continuación)

S.cerevisiae



....Figura 4.13 (continuación)

L. innocua



....Figura 4.13 continuación

cóctel de levaduras

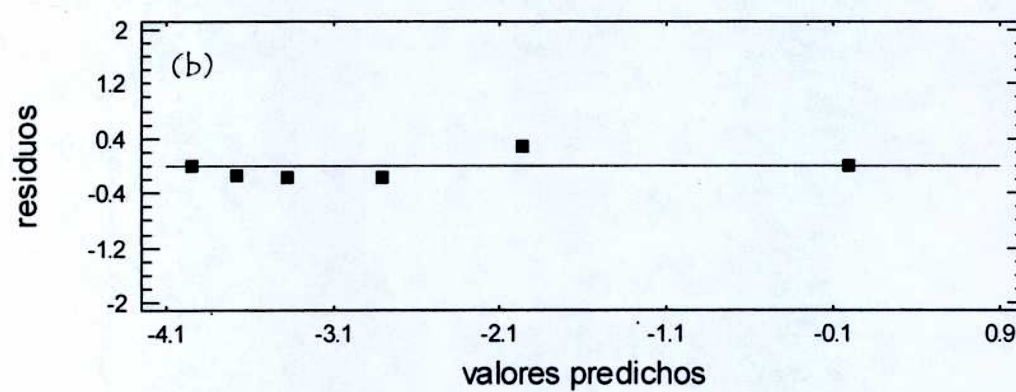
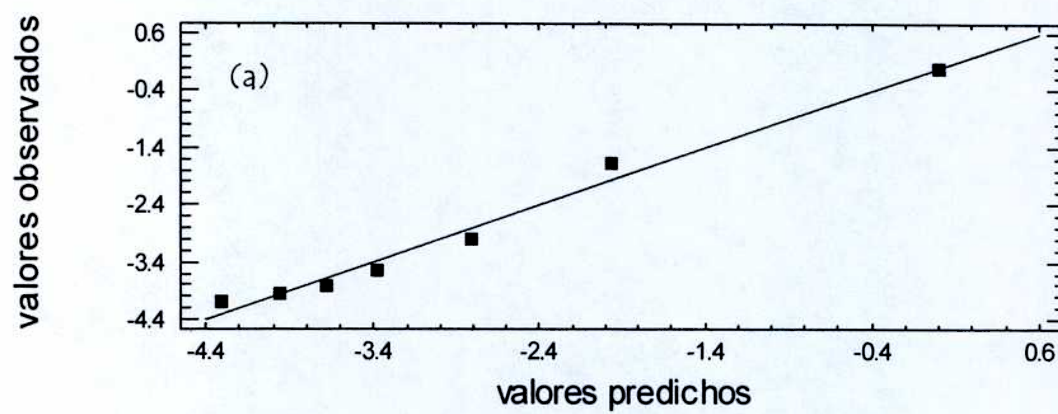
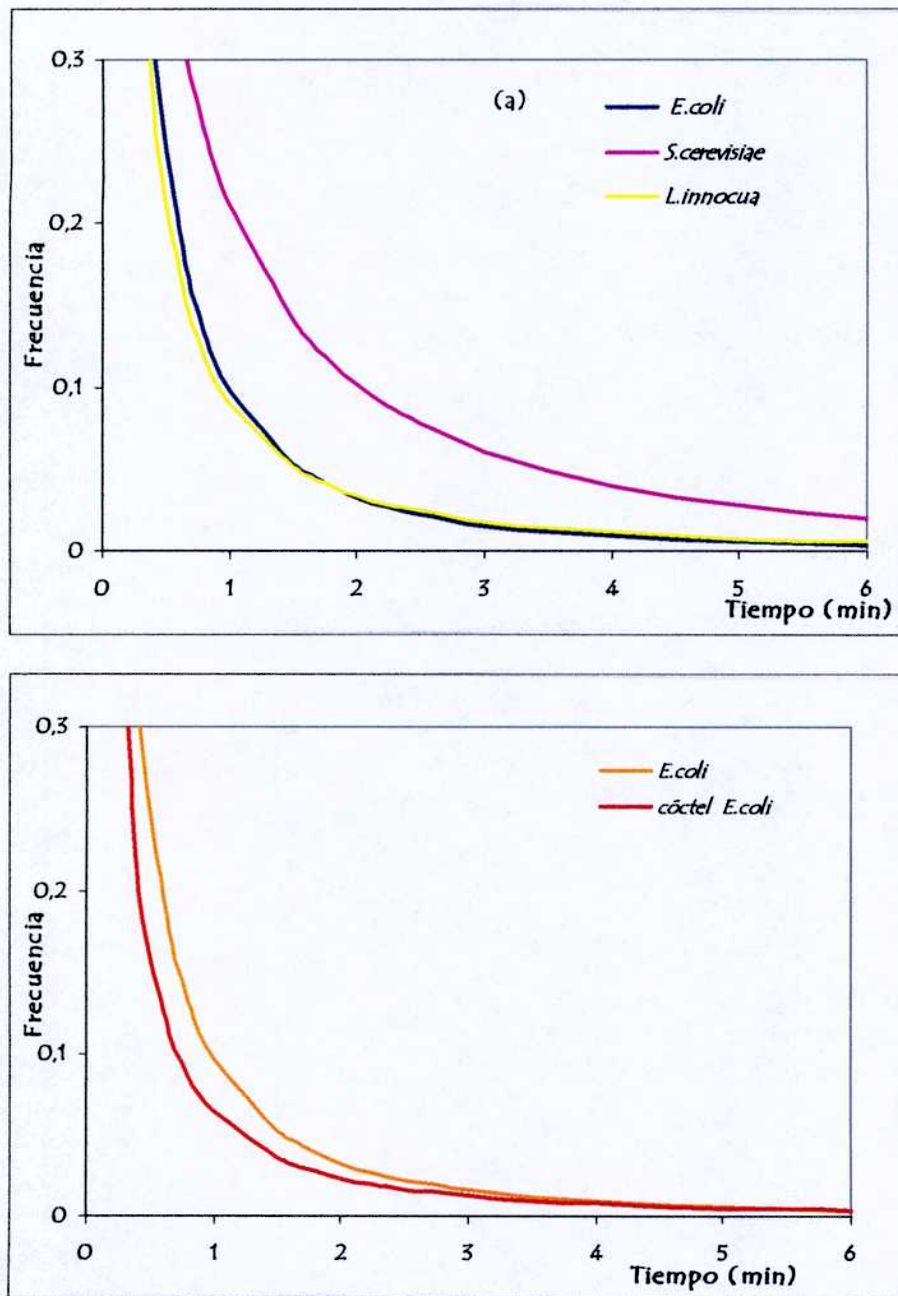


Figura 4.14 Distribuciones de frecuencias de resistencias calculadas según el modelo de Weibull para la inactivación de los distintos microorganismos en jugo de manzana comercial durante 15min (dosis máxima 14 kJ/m^2) a 28°C



....Figura 4.14 (continuación)

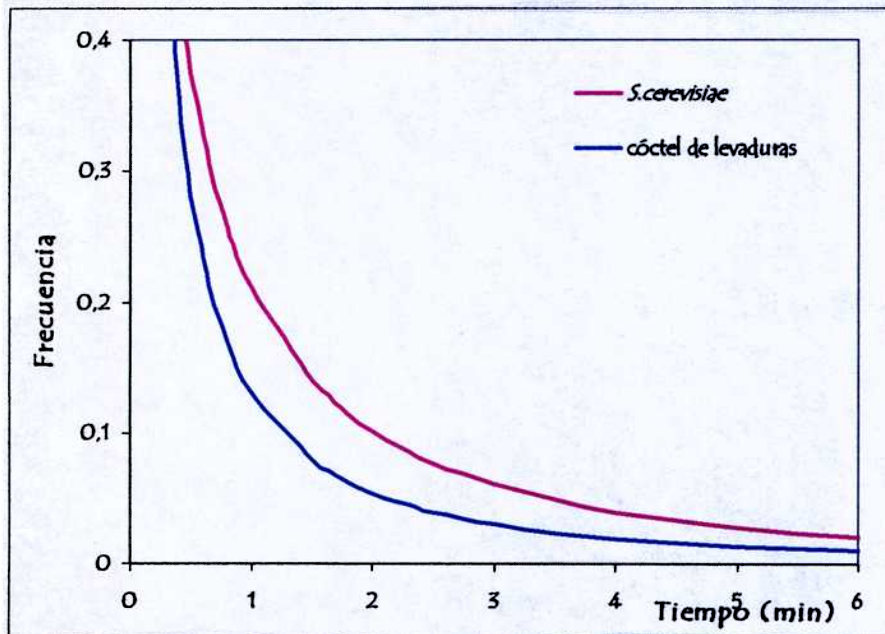


Tabla 4.8. Análisis estadístico de las curvas de distribución de frecuencia de la inactivación de los distintos microorganismos inoculados en jugo comercial (pH 3,2) sometidos a irradiación UV-C durante 15 minutos (dosis máx. 14kJ/m²) a 28°C.

Tratamiento	Moda (min)	Media (min)	Coefficiente de sesgo (-)	Varianza (min ²)
<i>E. coli</i>	-	0,5	12	3
cóctel de <i>E. coli</i>	-	0,6	33	13
<i>S. cerevisiae</i>	-	2,0	5	13
Cóctel de levaduras	-	1,3	12	17
<i>L. innocua</i>	-	0,8	20	12

está en concordancia con lo observado en la correspondiente curva de inactivación (Figura 4.12b). *S. cerevisiae* presentó una distribución con media elevada ($t_c=2$ min) y con el menor sesgo. El cóctel de levaduras resultó más sensible al tratamiento que la levadura estudiada presentando una distribución más sesgada y con media más baja, hecho que pondría de manifiesto que la mayor parte de la población murió al comienzo del tratamiento, dejando un reducido número de sobrevivientes más resistentes (Peleg y Cole, 2000)

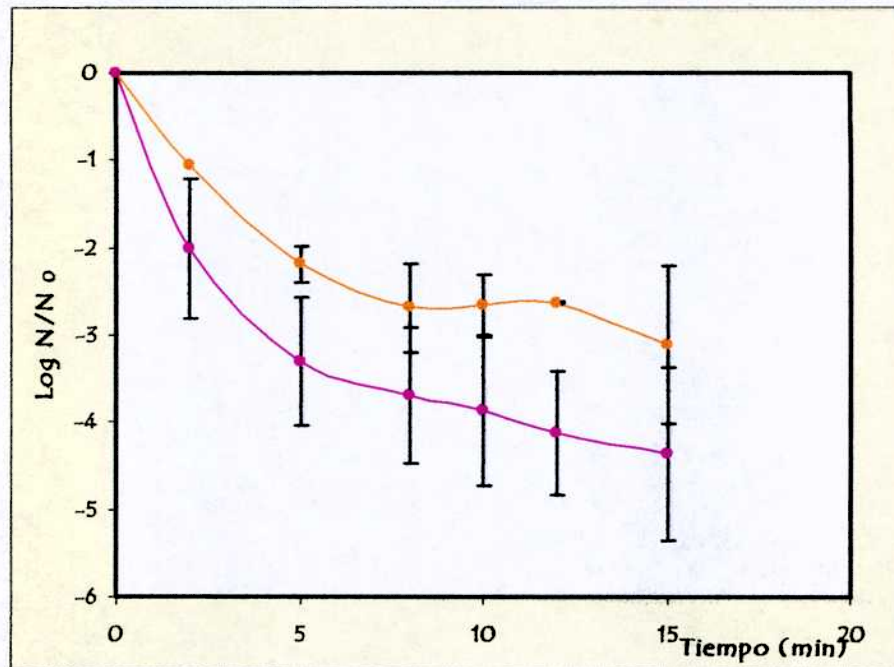
4.4.4- Jugo exprimido integral (JMI)

En esta etapa se estudió la respuesta de *E. coli* y *S. cerevisiae* en jugo de manzana fresco, integral expuesto a la luz UV-C. El jugo de manzana integral (JMI) fue obtenido en el laboratorio según se describe detalladamente en el apartado 3.6 de Materiales y Métodos. Se trató de un jugo turbio que guardaba parte de la pulpa de la fruta ya que no se había sometido a despectinización, similar a una sidra de manzana. El pH del este jugo fue ajustado a $3,0 \pm 0,2$ y la concentración de sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) fue de 13,1-13,6. El JMI inoculado fue procesado en flujo continuo con el equipo de irradiación UV-C, tal como se describe detalladamente en los apartados 3.5.1 y 3.10

4.4.4.1.-Curvas de inactivación

La Figura 4.15 muestra los resultados del estudio del comportamiento de las poblaciones individuales en JMI procesado con luz UV-C. Las curvas presentaron una marcada concavidad hacia arriba con un perfil de inactivación semejante al observado en el sistema modelo y en el jugo comercial (ver apartados 4.4.1.1 y 4.4.3.1) alcanzando en promedio 3,1 y 4,4 reducciones logarítmicas luego de 15 minutos de procesamiento para *S. cerevisiae* y *E. coli*, respectivamente.

Figura 4.15 Curvas de inactivación de los distintos microorganismos en JMI sometido a irradiación con luz UV-C durante 15 min. (dosis máx. 14 kJ/m^2) a 28°C . *S.cerevisiae* (●), *E.coli* (●); desviación estándar (I)



Tanto en el caso de *S. cerevisiae* como en el caso de *E. coli*, la inactivación que se obtuvo en el sistema JMI fue inferior a las obtenidas con los demás sistemas ensayados. Se observa una diferencia de aproximadamente 1,7 y 1,1 ciclos logarítmicos en la inactivación de *S. cerevisiae* respecto del sistema modelo y del jugo comercial cuando se trabajó con jugo exprimido integral. Es probable que la mayor complejidad del medio y una mayor proporción de sólidos solubles ejerzan un efecto protector y aumenten la resistencia de esta levadura al tratamiento así como también dichas partículas ejerzan un efecto sombra o de dispersión de la luz UV-C (Koutchma y col., 2004).

En el caso de *E. coli* como se puede observar en la Figura 4.15 el efecto protector de la matriz del JMI fue distinto, alcanzando una inactivación aproximadamente de 4,4 ciclos logarítmicos, valor muy cercano al obtenido en sistema modelo (4,5 reducciones logarítmicas) y 2 ciclos logarítmicos inferior a lo obtenido en JMC.

Wright y col (2000), trabajando con irradiación UV-C en flujo continuo con 10 cámaras de irradiación conectadas en serie (dosis= 0,61 kJ/m²; 1 L/min) y sidra de manzana sin pasteurizar inoculada con una mezcla de cinco cepas distintas de *E. coli* O157: H7 obtuvieron 3, 81 reducciones logarítmicas. Koutchma y col. (2004) estudiando el efecto de la luz UV-C sobre *E. coli* K-12 en distintas sidras de manzana en un equipo de ocho lámparas con espacio anular de 0,08 cm, colocadas en tres cámaras distintas, y una potencia emitida por el total de las lámparas igual a 312 W obtuvieron 1,3 reducciones logarítmicas con tiempos de residencia de tan solo 15 segundos y empleando flujo laminar de 3,42 L/min.

Char y col. (2008) estudiaron la inactivación de *E. coli* 35218 en jugo de naranja fresco integral (pH 3,5; 9,5 °Brix) procesado con luz UV-C en flujo continuo con el equipo de este laboratorio (Fv= 1 L/min; 30 °C; 15 min) combinado o no con ultrasonido de alta intensidad (20 kHz ; 95.2 µm) . Estos autores observaron cuando trabajaron solo con luz UV-C, un escaso número de reducciones logarítmicas (~ 1,5 ciclos log) respecto del observado en este estudio, confirmando la influencia notable de la composición de la matriz dado que en este caso se trabajó en idénticas condiciones y con un jugo de pH algo mayor que en el presente estudio.

4.4.4.2.-Aplicación del modelo de distribución de frecuencias tipo Weibull

La Figura 4.16 muestra las curvas de inactivación predichas por el modelo, junto a los datos experimentales. La Tabla 4.8 muestra los parámetros b y n característicos del modelo aplicado para cada condición ensayada junto a los estadísticos de la regresión (R^2 y F). El modelo Weibulliano ajustó adecuadamente a los datos experimentales, con valores de R^2 ajustado por grados de libertad entre el 96 y el 98 %. Asimismo, los valores del estadístico Fisher (F) para el modelo resultaron muy significativos ($\alpha \leq 0,00001$). Los valores de n obtenidos fueron nuevamente sensiblemente menores a la unidad ($0,35 \leq n \leq 0,42$) pero mayores a los obtenidos que en el caso de jugo comercial. Como ya se ha mencionado en el apartado 4.4.1.2, estos niveles de n son descriptivos de curvas de inactivación con una concavidad hacia arriba y cola marcada.

La Figura 4.17 presenta distintos instrumentos gráficos de validación interna del modelo elegido, los cuales permiten verificar la adecuación del mismo. El análisis de la gráfica de los valores observados en función de los valores predichos por el modelo (Figura 4.17.a) 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 (Figura 4.17.b) se observa para ambos microorganismos una distribución uniforme horizontal de los residuales en torno de los valores predichos sin formación de cono o herradura.

A partir de los valores obtenidos de los parámetros b y n se graficaron las distribuciones de frecuencias de resistencias de *E. coli* y *S. cerevisiae* en jugo exprimido integral (JMI) (Figura 4.18). La Tabla 4.9 exhibe, de modo complementario, los estadísticos que las caracterizan, calculados utilizando las ecuaciones 1.10 -1.13 presentes en el apartado 1.8.1.

Se obtuvieron distribuciones de frecuencias de resistencias con un patrón similar a los obtenidos con los sistemas antes estudiados, es decir, distribuciones sin moda, sesgadas a la derecha y con presencia de cola. El análisis de las mismas indica la mayor eficiencia del proceso en cuanto a la inactivación de *E. coli* respecto de la levadura puesto en evidencia

por la obtención de una distribución de frecuencias más sesgada con menor valor de media y menor varianza en los tiempos de muerte de la población (Figura 4.18 y Tabla 4.9).

Adicionalmente y a los fines de comparación, se graficaron las curvas de frecuencia de los dos microorganismos en los tres sistemas de bajo pH utilizados en este estudio (sistema modelo acidificado; JMC y JMI) (Figura 4.19). Si bien el tratamiento de desinfección se extendió hasta los 15 minutos, las distribuciones de frecuencias de resistencias se grafican hasta el minuto 6 con el propósito de una mejor comparación y dado que a tiempos mayores la frecuencia para cada distribución se mantiene aproximadamente constante. Es interesante destacar que si bien las distribuciones de frecuencias para ambos microorganismos siguieron la misma evolución en el tiempo existieron algunas diferencias.

Para ambos microorganismos, en sistema modelo acidificado, se obtuvieron curvas más sesgadas. Las distribuciones correspondientes a los jugos JMC y JMI fueron más parecidas aunque la respuesta de ambos microorganismos fue distinta en cada sistema evaluado si bien ambos sistemas tuvieron similares coeficientes de absortividad (ver apartado 4.1.2).

Figura 4.16 Aplicación del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull a las curvas de inactivación de los distintos microorganismos en jugo de manzana exprimido integral (JMI) sometido a irradiación con luz UV-C durante 15min (dosis máx. 14 kJ/m²) a 28°C. *S.cerevisiae* (●), *E.coli* (●). Valores predichos (—); datos experimentales(●).

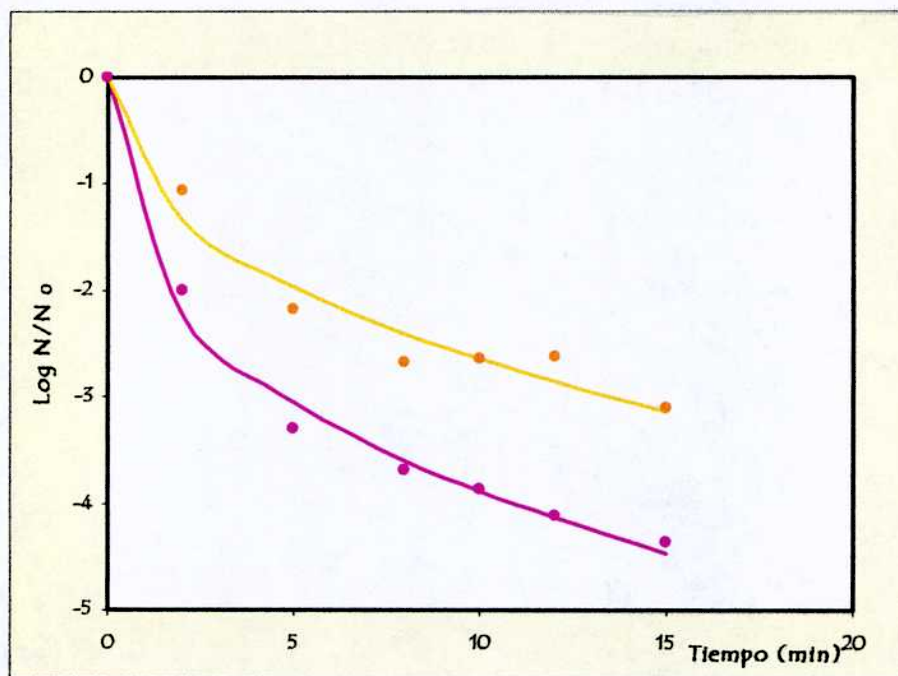


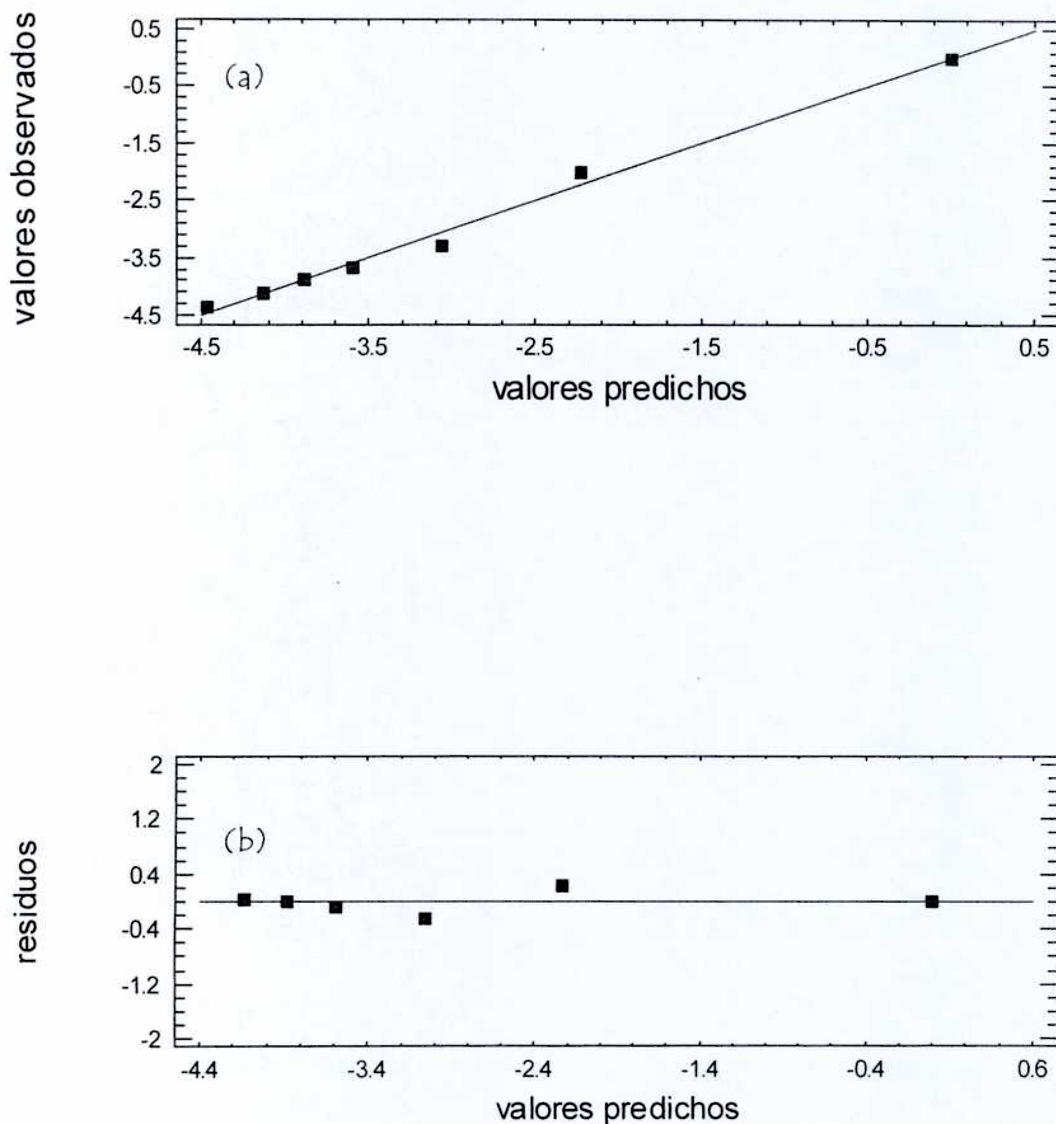
TABLA 4.8 Parámetros correspondientes al modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull, para el comportamiento de los distintos microorganismos inoculados en jugo de manzana exprimido integral (JMI) sometido a irradiación con luz UV-C durante 15min (dosis máxima 14 kJ/m²) a 28°C.

Tratamiento	b	n	R ² ajustado	F	Nivel de significación (α)
<i>E. coli</i>	1,76	0,35	98,1	1514	<0,000001
<i>S. cerevisiae</i>	1,00	0,42	95,9	364	0,000004

Figura 4.17. Validación interna del modelo propuesto que relaciona el número de reducciones logarítmicas de los distintos microorganismos en jugo exprimido integral (JMI) sometido a tratamiento con luz UV-C durante 15min (dosis máx 14 kJ/m^2) a 28°C .

- Valores observados versus valores predichos por el modelo propuesto
- Residuales versus valores predichos por el modelo propuesto

E.coli



S.cerevisiae

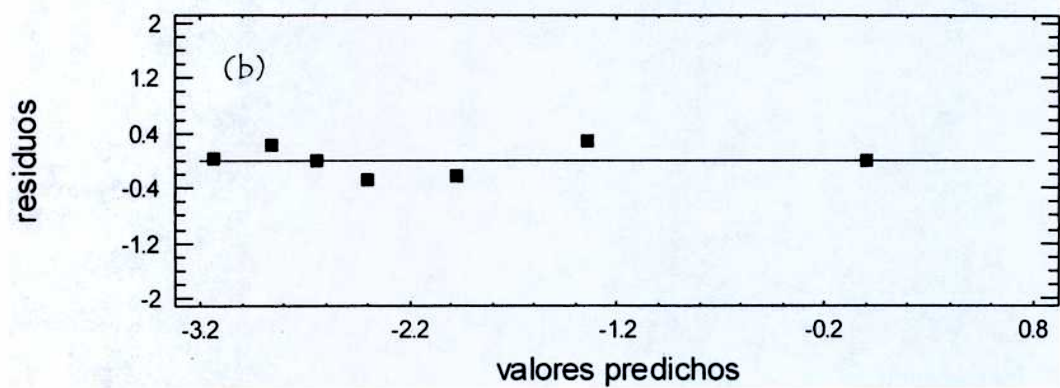
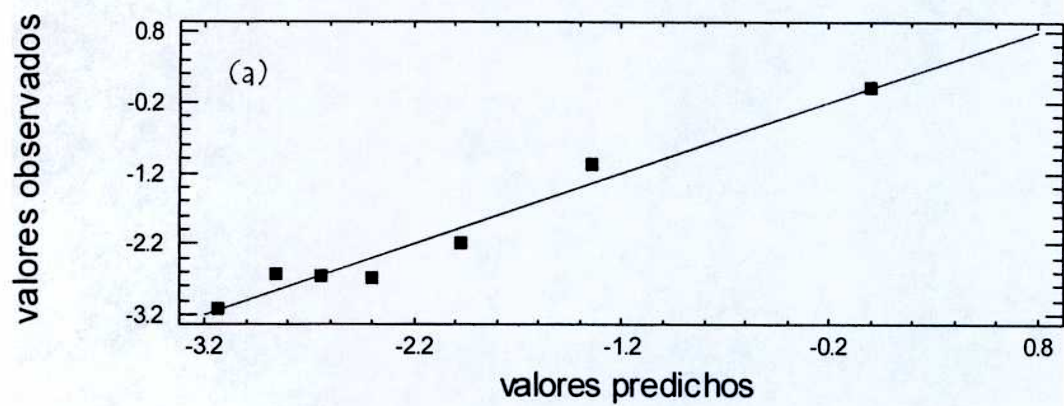


Figura 4.18 Distribuciones de frecuencias de resistencias calculadas según el modelo de Weibull para la inactivación de *E.coli* y *S.cerevisiae* en jugo exprimido integral (JMI) a 28°C durante 15min.

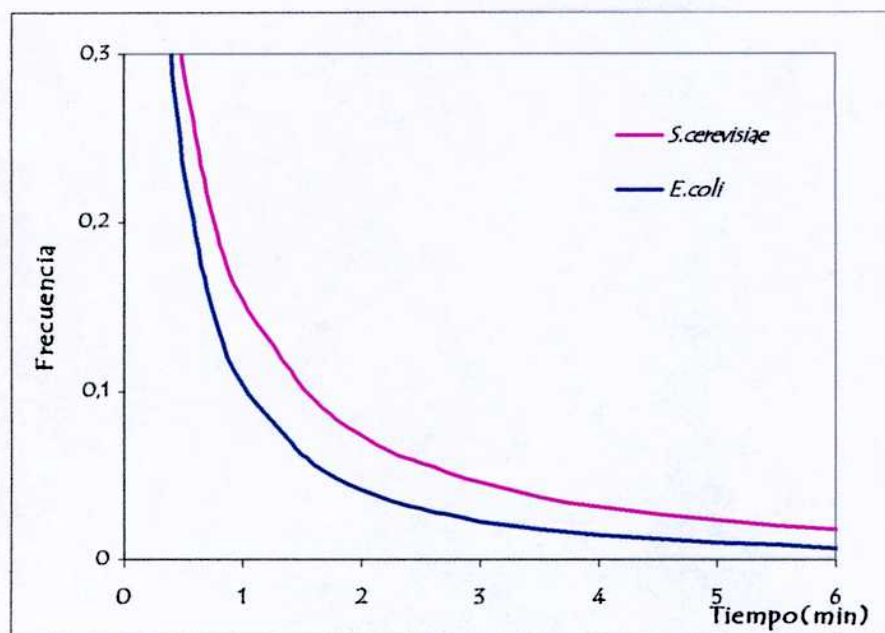
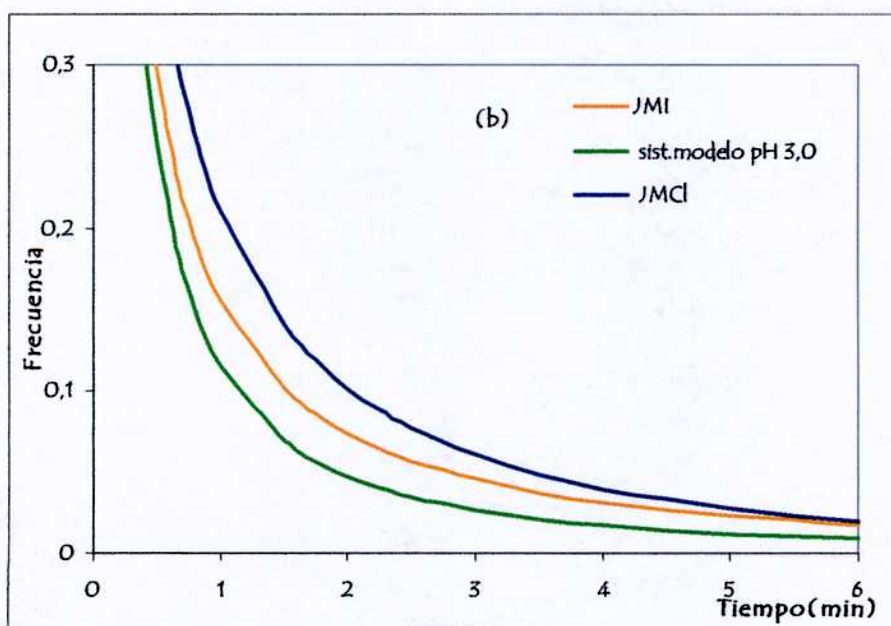
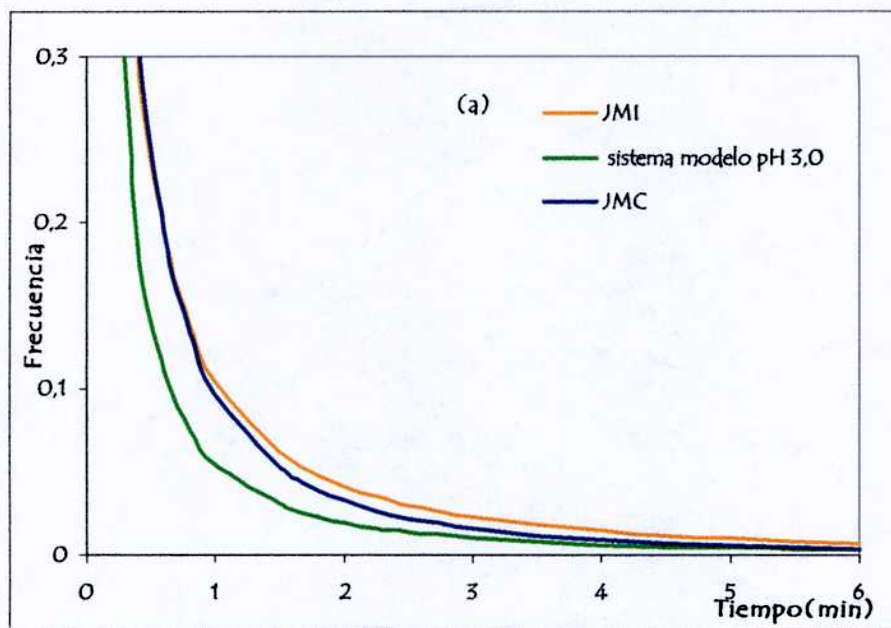


Tabla 4.9 Análisis estadístico de las curvas de distribución de frecuencia de la inactivación de los distintos microorganismos en jugo exprimido integral (JMI) sometido a irradiación UV-C durante 15 minutos (dosis máx 14 kJ/m²) a 28°C .

Tratamiento	Moda (min)	Media (min)	Coefficiente de sesgo (-)	Varianza (min ²)
<i>E.coli</i>	-	1,0	17	18
<i>S.cerevisiae</i>	-	2,9	9	70

Figura 4.19. Comparación de distribuciones de frecuencias de resistencias calculadas según el modelo de Weibull y obtenidas en este estudio para la inactivación de *E.coli* y *S. cerevisiae* en sistema modelo pH 3,0; JMC y JMI a 28°C durante 15min (dosis máx 14 kJ/m²). a) *E. coli*; b) *S. cerevisiae*



E. coli presentó las distribuciones más estrechas, sesgadas y con bajos valores de media, hecho que remarca la mayor sensibilidad de la misma al tratamiento de irradiación con luz UV-C (Figura 4.19a vs Figura 4.19b). Podría explicarse que en estos sistemas buena parte de la población se muere a tiempos muy cortos y conforme avanza el tiempo de tratamiento la proporción de la población remanente que muere es menor (Peleg y Cole, 1998). Para este microorganismo, Las distribuciones correspondientes a JMC y JMI se solaparon (Figura 4.19a), presentado una cola (fracción de miembros resistentes) algo más pronunciada que en la distribución correspondiente al sistema modelo pH 3,0. *S. cerevisiae* presentó un comportamiento similar aunque sus distribuciones presentaron mayor varianza en los tiempos de resistencia y una cola más pronunciada que en el caso de *E. coli*, hecho que concuerda con la menor inactivación observada en el caso de la levadura para todos los sistemas ensayados. La distribución de frecuencias de resistencias correspondiente a *S. cerevisiae* en JMI en comparación con JMC fue más sesgada pero con mayores valores de media y varianza (Figura 4.19 y Tablas 4.7 y 4.9) por presentar una cola más marcada en el tiempo, asociada a una proporción mayor de la población que se mantiene viable,

Es sabido que la presencia de partículas en el fluido afectan notoriamente la efectividad del tratamiento de desinfección por luz UV-C debido a problemas de desvío, sombra y rebote de la luz incidente. Además, la presencia de estas partículas lleva a que exista en el medio una distribución amplia de tiempos de residencia dado que algunas partículas recorrerán el reactor más rápido que otras (Unluturk y col., 2004). Estos hechos llevan a una distribución no uniforme en la matriz de la dosis de luz recibida y sería la causa probable de la menor inactivación observada en el caso del jugo exprimido integral (JMI).

4.5- Evolución de la población microbiana inoculada durante el almacenamiento refrigerado de jugo de manzana

Ya se ha comentado de la posibilidad de fotorecuperación celular que se puede presentar en el almacenamiento del alimento procesado con luz UV debido a un daño subletal (ver apartado 1.7.1.7.) Es por ello que, con el propósito de evaluar la efectividad del tratamiento en jugo de manzana comercial procesado con luz UV-C bajo las condiciones de este estudio, se siguió la evolución de la población microbiana remanente durante 7 días de almacenamiento en refrigeración ($\sim 4^{\circ}\text{C}$) analizando distintos aspectos y siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.14. El tiempo de almacenamiento se seleccionó teniendo en cuenta el desarrollo a futuro de un derivado frutal con mínimo procesamiento de corta vida útil para consumo de catering ;etc.

En primer lugar se analizó la respuesta comparada de una levadura y su cóctel simulando condiciones más cercanas a una contaminación real.

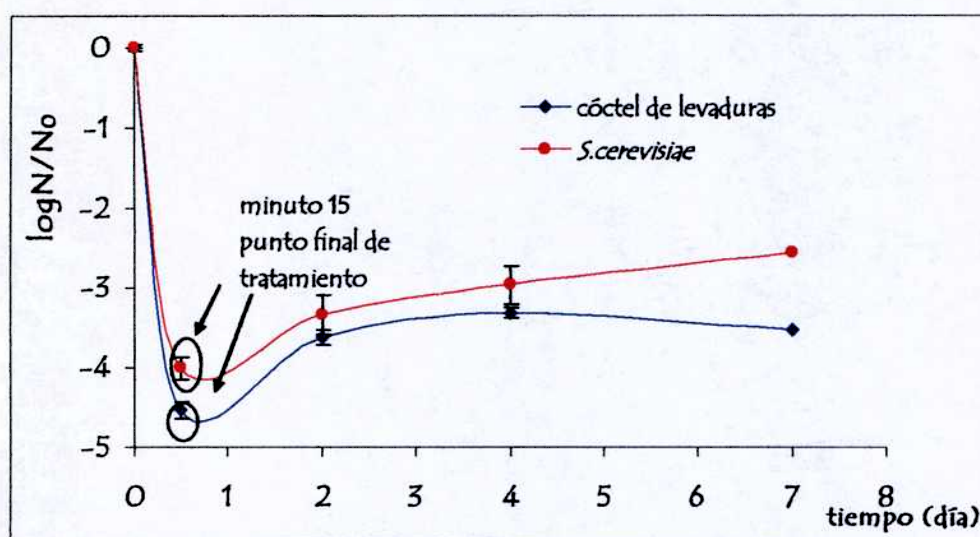
Dado que en las etapas anteriores de este estudio se obtuvieron en muchos casos, curvas de inactivación con concavidad hacia arriba y bifásicas, con un quiebre en la velocidad de inactivación notorio a partir de los 5 minutos de exposición a la luz UV-C (ver apartados 4.4.1.1; 4.4.2.1 ; 4.4.3.1 y 4.4.4.1) y con pocas reducciones adicionales a partir de este tiempo, se estudió la respuesta en el almacenamiento refrigerado de dos poblaciones individuales (*S. cerevisiae* y *E.coli*) presentes en JMC que había sido sometido a dos tiempos de exposición a luz UV-C: 5 y 15 minutos.

4.5.1. Poblaciones mixtas

En primer lugar, se estudió la evolución de la población de un cóctel de levaduras (*Candida parapsilosis*; *Zygosaccharomyces bailii*; *Zygosaccharomyces rouxii*; *Picchia anomala* NRRL y *Saccharomyces cerevisiae*) y de un inóculo simple, *S. cerevisiae* en JMC expuesto a la luz UV-C (28°C; 15min; dosis 14 kJ/m²). Como sistema control se utilizó JMC inoculado en idénticas condiciones pero no expuesto a la irradiación UV-C. La Figura 4.19.a muestra la evolución de *S. cerevisiae* y del cóctel de levaduras en jugo de manzana comercial, inoculado y procesado según el tratamiento propuesto. La primera parte de la escala en el eje del tiempo (la correspondiente al primer día de almacenamiento) exhibe la inactivación obtenida tras la exposición a luz UV-C mientras que a partir del día 1 se muestran los resultados del ensayo evolución de la flora remanente durante el almacenamiento del producto (~4°C). El sistema control mostró un aumento de más de 3 ciclos en los dos primeros días de almacenamiento refrigerado con signos de deterioro organoléptico evidente por lo cual fue descartado (no se muestra la curva)

El cóctel de levaduras mostró mayor sensibilidad al tratamiento de irradiación con luz UV-C tal como fuera comentado en el apartado 4.4.3.1. Durante los primeros días de almacenamiento, la población del cóctel de levaduras aumentó menos de un ciclo logarítmico y luego la misma se estabilizó con una tendencia a disminuir. Por otra parte, *S. cerevisiae* mostró en el almacenamiento un aumento en la población de aproximadamente 1,4 ciclos logarítmicos, hecho que pone en evidencia la recuperación parcial y/o total de la fracción resistente que había sido detectada mediante la aplicación del modelo weibulliano (ver apartado 4.4.3.2). Considerando la recuperación observada, el tratamiento de desinfección con luz UV-C lograría una reducción aproximada de entre 3 y 4 ciclos logarítmicos en la carga de las poblaciones estudiadas.

Figura 4.19 Evolución de *S.cerevisiae* y el cóctel de levaduras en jugo de manzana comercial (JMC) inoculado e irradiado con luz UV- C durante 15 minutos (dosis= 14 kJ/m²) durante el almacenamiento en refrigeración (~4°C).



4.5.2- Tiempo de exposición a la luz UV-C

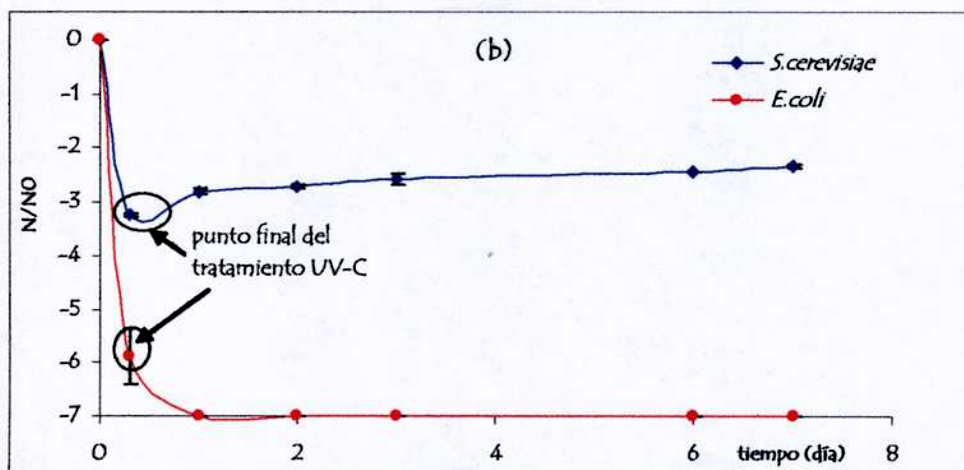
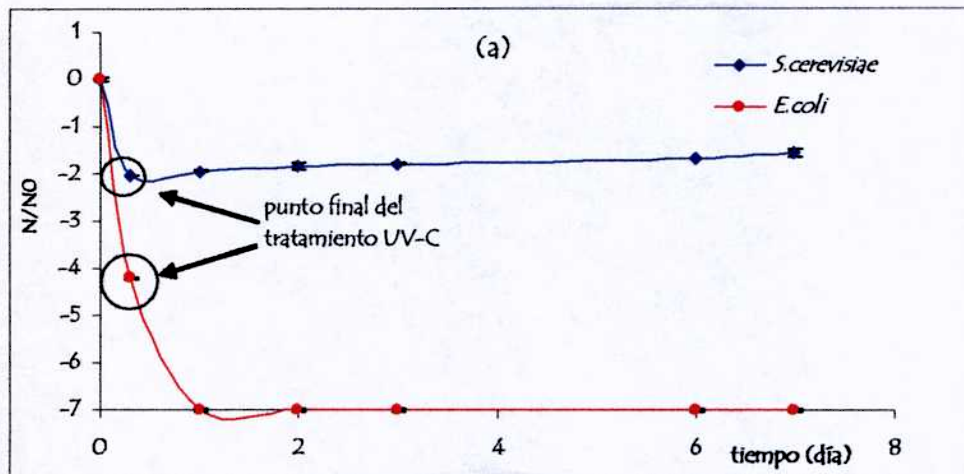
A continuación se quiso evaluar el comportamiento de *E. coli* y *S. cerevisiae* luego del tratamiento propuesto con luz UV-C de 15 minutos (dosis = 14 kJ/m²) y también un tiempo corto de 5 minutos de exposición a la luz UV-C (dosis = 4,7 kJ/m²) en donde, en general, se había observado un quiebre en las curvas de inactivación. Nuevamente como sistema control se utilizó JMC inoculado en idénticas condiciones pero no expuesto a la irradiación UV-C. La Figura 4.20 muestra la evolución de *S. cerevisiae* y *E. coli* en el almacenamiento refrigerado de JMC procesado 5 y 15 minutos con luz UV. El sistema control correspondiente a *S. cerevisiae* mostró el mismo comportamiento que el descrito en el apartado anterior mientras que la población de *E. coli* sin irradiar se mantuvo aproximadamente constante ($N \sim 10^7$ UFC/mL) durante los 3 primeros días de almacenamiento y luego no se detectaron sobrevivientes (no se muestra la curva). Este resultado corrobora la necesidad de la aplicación de un tratamiento de desinfección que garantice la inocuidad del producto en todo el periodo de almacenamiento refrigerado.

Luego del tratamiento corto de irradiación con luz UV-C (5 minutos; 4,7 kJ/m²) se observaron valores equivalentes de inactivación a los informados en el estudio de reto microbiano en JMC para estos microorganismos (apartado 4.4.3.1). *S. cerevisiae* mostró una reducción de la población de 2 ciclos logarítmicos (Figura 4.20.a) para mantenerse luego constante la población durante el resto del almacenamiento. *E. coli* alcanzó una reducción luego de la exposición de 5 minutos a la luz UV-C, de 4 ciclos logarítmicos para descender luego del segundo día de almacenamiento a 7 ciclos logarítmicos, hecho que demuestra que la población de *E. coli* remanente al tratamiento fue severamente afectada por la luz UV-C y no fue capaz de sobrevivir en el almacenamiento.

Cuando el jugo se trató con luz UV-C por 15 minutos (dosis= 14 kJ/m²) *S. cerevisiae* mostró una importante disminución de su población de 3,2 ciclos

Figura 4.20 Evolución de *S.cerevisiae* y *E.coli* en JMC inoculado e irradiado con luz UV- C durante 15 minutos (dosis = 14 kJ/m²) y 5 minutos (dosis = 4,7 kJ/m²) durante el almacenamiento en refrigeración (~4°C).

- Tiempo de exposición: 5 minutos
- Tiempo de exposición: 15 minutos



logarítmicos . Durante el primer día de almacenamiento se observó una recuperación leve ($\sim 0,3$ ciclos logarítmicos), nivel que se mantuvo aproximadamente constante en el resto del almacenamiento. Puede determinarse que la mayor dosis de irradiación UV-C aplicada no sólo provocó una reducción inicial más elevada sino mayor efectividad en el daño impartido a la población remanente (Figura 4.2Ob).

Por su parte, *E. coli* mostró luego de recibir la dosis máxima de UV-C, niveles de inactivación similares a los observados en el estudio de reto microbiano en JMC y la población remanente fue incapaz de recuperarse en el almacenamiento dada la injuria recibida por el tratamiento y las condiciones del medio de almacenamiento (pH: 3,0).

Oteiza (2007) informó que algunas cepas de *E.coli* O157:H7 mostraron gran resistencia al pH del medio persistiendo en jugo de naranja después de 30 días de almacenamiento a 4°C, observando una disminución de su población de menos de 3 ciclos logarítmicos. En el mismo estudio la cepa no patógena *E.coli* ATCC 25922 muestra resultados similares a los obtenidos en este estudio careciendo de recuento tras solamente 5 días de almacenamiento.

Ryu y col. (1998) trabajando con una cepa de *E.coli* O157:H7 y diferentes tipos de jugo de manzana con pH 3,6- 3,9, almacenados a 5°C obtuvieron entre 2,4 y 3,8 reducciones logarítmicas según las características de los distintos tipos de jugo luego de 42 días de almacenamiento.

Como puede apreciarse en la bibliografía los datos sobre la supervivencia de *E.coli* en alimentos ácidos tales como los jugos frutales varían según la cepa utilizada y las condiciones de almacenamiento. En este estudio, la cepa de *E. coli* utilizada (35218) no sería la cepa más apropiada a utilizar en estudios posteriores como subrogante de la cepa patógena (*E. coli* O157:H7) pues si bien la irradiación con UV-C provoca una caída brusca de la población en pocos minutos, la cepa no resiste en el tiempo las condiciones del jugo de manzana y por lo tanto sería conveniente seleccionar una cepa de mayor resistencia .

4.5.1- Evolución de la flora nativa

Con el propósito de evaluar la calidad microbiológica del jugo de manzana procesado por la metodología propuesta, se estudió en primera instancia la evolución de la flora nativa del jugo de manzana exprimido integral (JMI) procesado en equipo de flujo continuo de luz UV-C (1L/min; 15 min.; 14 kJ/m²) y almacenado en refrigeración (4°C) durante 11 días. Paralelamente, se analizó el jugo de manzana natural, sin procesamiento (Figuras 4.21 y 4.22). En esta etapa del estudio se utilizaron manzanas deterioradas, con el propósito de situarse en el peor escenario de prueba para verificar la eficiencia de los procesos propuestos. Tal como se describió en el apartado 3.4 se siguió el recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales y; hongos y levaduras.

El tratamiento propuesto con luz UV-C resultó altamente efectivo, inhibiendo casi por completo todos los microorganismos integrantes de la flora nativa del jugo de manzana durante el tiempo de almacenamiento evaluado (Figuras 4.21 y 4.22).

No se detectó la presencia de hongos en el jugo de manzana procesado con luz UV-C durante los 11 días de almacenamiento correspondiendo la carga presente exclusivamente a levaduras (Figura 4.21). Al inicio del almacenamiento, los recuentos de levaduras correspondientes al jugo de manzana procesado por luz UV-C resultaron similares a los del jugo sin tratamiento ($\sim 10^2$ UFC/mL de jugo). Sin embargo, el recuento en el jugo control aumentó rápidamente con el tiempo de almacenamiento, hasta alcanzar niveles superiores a 10^5 UFC/mL de jugo, evidenciando un deterioro del producto.

Los recuentos de los microorganismos aerobios mesófilos del jugo sin tratar aumentaron 1 ciclo logarítmico el primer día, permaneciendo constante en $\sim 1 \times 10^5$ UFC/mL de jugo durante el resto tiempo de almacenamiento. Por el contrario, los recuentos correspondientes al jugo sometido al tratamiento con luz UV-C se mantuvieron en niveles bajos (5×10^1 UFC/mL de jugo) durante todo el almacenamiento del jugo de manzana en refrigeración (Figura 4.22).

Donahue y col. (2002) evaluaron la vida útil de sidra de manzana tratada con UV-C en equipo continuo, trabajando con flujo laminar (6,3 L/min) y empleando dosis de $87,7 \text{ J/m}^2$ – 351 J/m^2 . Dicha sidra de manzana fue tratada y almacenada con UV-C durante 3 semanas a temperaturas de refrigeración (4°C). En el estudio se mostró que tanto el jugo almacenado sin tratar (control) como el jugo sometido a las dosis de UV-C mencionadas anteriormente mostraron una tendencia a incrementarse. Dentro de este tiempo el jugo almacenado no sometido a irradiación aumentó su población de 9 a 12,4 ciclos logarítmicos mientras que la sidra sometida a la mayor dosis tuvo una evolución de 5,5 hasta 10,1 ciclos logarítmicos.

Oteiza (2007) trabajando con jugo de naranja natural reportó que en dicho jugo (jugo no sometido a ningún tratamiento) almacenado a 4°C el recuento de hongos y levaduras alcanzó el orden de 10^5 UFC/mL después de 20 días. El recuento inicial del jugo utilizado fue de dos ciclos logarítmicos aproximadamente. Al someter el mismo jugo a tratamiento con UV-C (dosis 16 kJ/m^2) el recuento inicial que obtuvo fue menor al límite de detección mientras tras el almacenamiento a las mismas condiciones la concentración de la flora nativa del jugo alcanzó 2 ciclos logarítmicos.

Con respecto a la inactivación de los hongos observados en el jugo control, los cuales no fueron detectados en las muestras del jugo tratado con UV-C analizadas, se encontró escasa información en la bibliografía sobre estudios que demuestren el comportamiento de hongos frente al tratamiento con UV-C. Marquenie y col. (2001) sometieron suspensiones de *Botrytis cinerea* y *Monilia fructigena* a dosis en el rango de $0,1 \text{ kJ/m}^2$ – 15 kJ/m^2 durante distintos tiempos entre 3–20 minutos. Obtuvieron inactivaciones que guardaron una relación lineal con la dosis de UV-C aplicada, siendo una dosis de $1,1 \text{ kJ/m}^2$ capaz de producir más de 4 reducciones logarítmicas para ambos microorganismos.

Es posible concluir que el jugo de manzana procesado por luz UV-C mantuvo óptima estabilidad microbiológica durante los 11 días de almacenamiento en refrigeración. Lo último se evidencia también tomando en cuenta que el tiempo de vida útil de jugos

frutales se considera como el tiempo de almacenamiento para el cual los recuentos de hongos y levaduras (microorganismos predominantes en este tipo de alimento) resultan menores de 10^6 UFC/mL (Howard y col, 1995).

Es de destacar que el tratamiento propuesto si bien mostró menor severidad destruyendo la flora nativa inicial del jugo, mantuvo un control efectivo sobre los microorganismos sobrevivientes inhibiendo su proliferación e incluso inactivándolos, durante el almacenamiento refrigerado del producto. Este efecto estaría relacionado con el daño subletal provocado por el procesamiento con luz UV-C.

Figura 4.21- Evolución de la flora nativa durante el almacenamiento en refrigeración (4 °C) de jugo de manzana exprimido integral (JMI) . Hongos y levaduras: ● JMI sin tratar (control); ● JMI procesado con luz UV-C

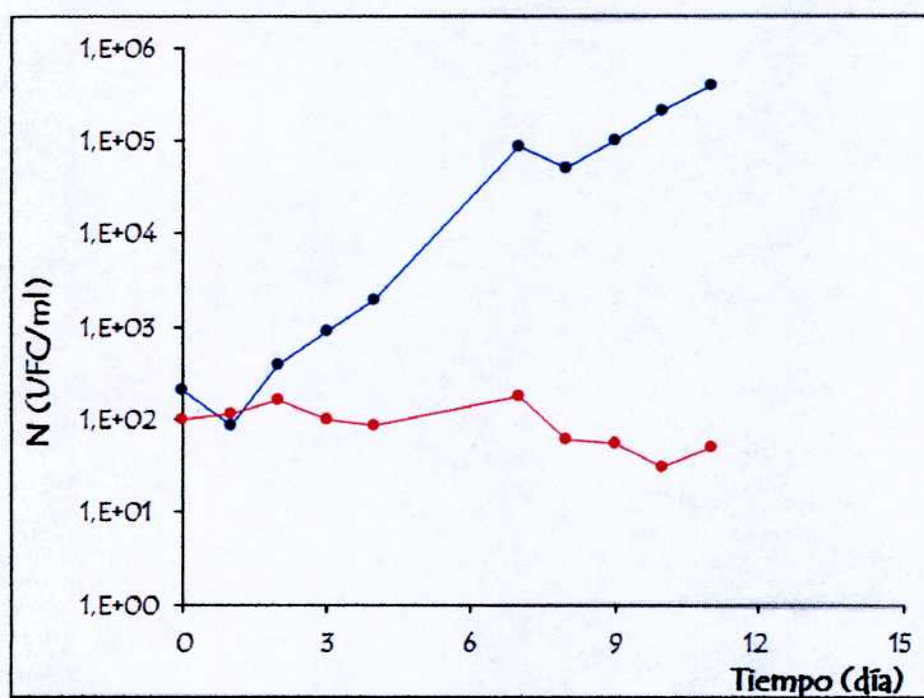
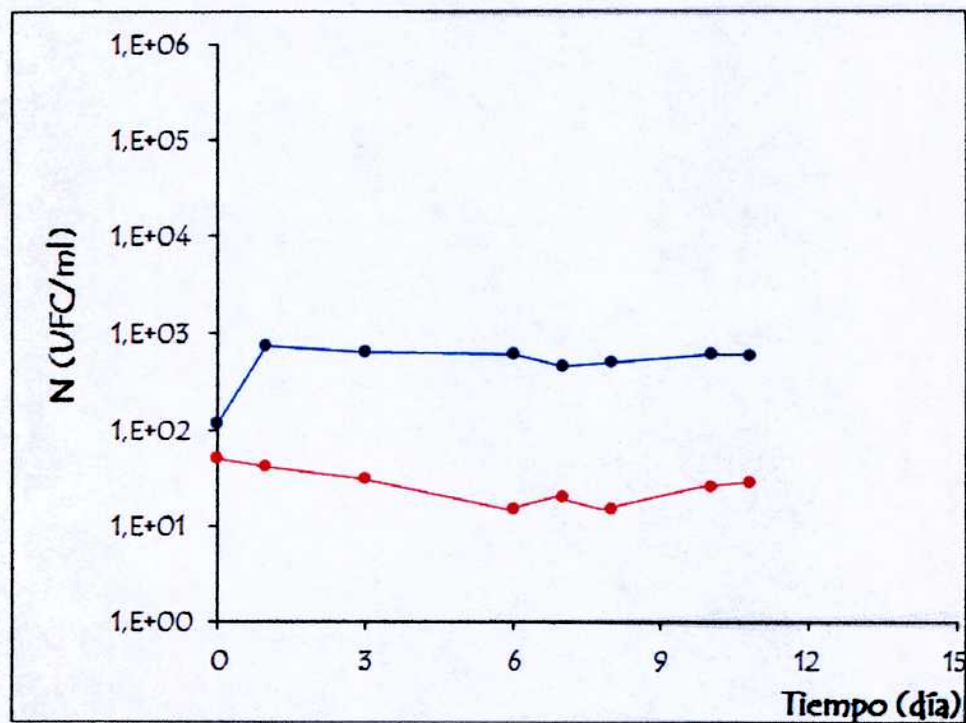


Figura 4.22- Evolución de la flora nativa durante el almacenamiento en refrigeración (4 °C) de jugo de manzana exprimido integral (JMI). Aerobios mesófilos ● JMI sin tratar (control); ● JMI procesado con luz UV-C (14 kJ/m²).



5-CONCLUSIONES



Este estudio permitió aportar información cuantitativa relevante acerca de la influencia de una tecnología de preservación de jugo de manzana innovadora, la luz UV de onda corta, sobre el desarrollo de algunos microorganismos de relevancia. También proveyó valiosa información acerca de la implementación de la misma en flujo continuo con el propósito de obtener jugos con mínimo procesamiento y/o mayor eficiencia en la inactivación. En particular se puede afirmar que:

- El mismo permitió diseñar y optimizar el funcionamiento de un equipo escala laboratorio, en flujo continuo, para el tratamiento de líquidos con luz UV-C que operara en flujo laminar pero con múltiples pasadas de modo de asegurar la posibilidad que todos los elementos de volumen queden expuestos a la luz UV-C.
- La solución actinométrica de yoduro/yodato utilizada en este trabajo de investigación probó ser una herramienta muy útil e importante para medir la intensidad de una lámpara de UV-C. Presenta varias ventajas sobre otros sistemas convencionales como el radiómetro por que se puede usar en equipos de flujo. De igual forma se puede usar de manera fácil para determinar la vida útil de una lámpara. El par actinométrico utilizado fue eficiente a tiempos cortos de tratamiento (inferiores a 4 minutos) aunque presentó saturación en la formación de moles de triioduro a tiempos mayores, obligando a utilizar un método de extrapolación para calcular las correspondientes dosis.
- La utilización de tres matrices líquidas conceptualmente diferentes (sistema modelo, jugo clarificado y jugo integral) permitió concluir sobre los beneficios y limitaciones de esta tecnología emergente. La obtención en laboratorio de un jugo integral, similar a la sidra de manzana y su comparación con el jugo comercial fue de marcada importancia dada la elevada incidencia de los brotes de *E. coli* O157:H7 reportados en bibliografía para ese tipo de derivado frutal.
- El patrón de inactivación microbiana observado en todos los sistemas tratados por irradiación con luz UV-C en flujo continuo correspondió, en general, a curvas con marcada concavidad hacia arriba; presencia de hombro en algunos casos y en su mayoría, con cola definida. Este tipo de curvas de inactivación, más relacionado

a la aplicación de tecnologías novedales obligó a la utilización de un modelo matemático que permitiera una mejor comprensión y cuantificación del modo de acción de la luz UV-C.

- La aplicación de un modelo matemático no lineal conceptualmente diferente, como el modelo de distribución de frecuencias de resistencias weibulliano, resultó muy útil para explicar de forma más completa la inactivación de los microorganismos estudiados en los distintos sistemas evaluados y sus diferencias, brindando información complementaria acerca del comportamiento de la población durante el tratamiento de exposición a la luz UV-C. Se obtuvieron mediante la aplicación del mismo, distribuciones de frecuencias de resistencias que indicaron que la mayor parte de la población microbiana moría a dosis muy bajas pero dejaba, según la especie considerada y el medio de tratamiento, una fracción de la población resistente al tratamiento. Este resultado concluye sobre la futura utilización de luz UV-C en combinación con otros posibles factores de stress dentro del marco de la obtención de productos mínimamente procesados.
- La reducción del pH en el sistema modelo no tuvo influencia marcada en la inactivación por luz UV-C en el caso de la levadura estudiada pero aumentó levemente la inactivación observada en el caso de *E. coli*.
- *E. coli* demostró ser la especie más sensible al tratamiento con luz UV-C, seguida de *L. innocua* y *Saccharomyces cerevisiae*. La complejidad del medio disminuyó, en general, la eficacia del tratamiento UV-C. Así la inactivación observada para los microorganismos estudiados fue algo menor en el jugo integral respecto del jugo claro y del sistema modelo. *E. coli* alcanzó las 5 reducciones decimales exigidas por la FDA para tecnologías emergentes en el jugo clarificado y 4,5 reducciones en el caso del jugo integral. Dado que este microorganismo mostró que al final del tratamiento propuesto se seguía inactivando, aunque a menor velocidad, un incremento en la dosis UV-C o bien su combinación con factores de stress en el caso de jugos integrales aseguraría el requerimiento impuesto por este organismo.
- La utilización de poblaciones mixtas demostró que, en el caso de *S. cerevisiae* KE 162, la misma resultó un adecuado representante de poblaciones deteriorativas de

jugos frutales ya que fue más resistente que un cóctel de 5 especies de levaduras comunes contaminantes de jugo de manzana. La respuesta del cóctel de cepas de *E. coli* dependió de la matriz irradiada y por lo tanto la cepa de *E. coli* elegida (*Escherichia coli* ATCC 35218) no fue la más adecuada para representar a la especie patógena *E. coli* O157:H7.

- No se vio una correlación entre los coeficientes de absortividad de los jugos evaluados y la inactivación observada en los mismos tras su exposición a luz UV-C. En este estudio aunque los coeficientes de absortividad fueron similares, en el jugo exprimido se obtuvo siempre menor inactivación para los microorganismos estudiados.
- Los estudios de respuesta durante el almacenamiento refrigerado (4 °C) de las poblaciones microbianas tratadas con luz UV-C mostraron, en el caso de levaduras, una recuperación de entre 0,5 a 1 ciclo logarítmico para luego mantenerse aproximadamente constante, sin signos evidentes de recuperación. En el caso de *E. coli*, la población no solo fue incapaz de recuperarse sino que perdió su viabilidad al comienzo del almacenamiento, incluso para una dosis tan baja como 4,7 kJ/m² (equivalente a 5 minutos de tratamiento).
- Es de destacar que el tratamiento propuesto si bien mostró menor severidad destruyendo la flora nativa inicial del jugo, mantuvo un control efectivo sobre los microorganismos sobrevivientes inhibiendo su proliferación e incluso inactivándolos, durante el almacenamiento refrigerado del producto. Este efecto estaría relacionado con el daño subletal provocado por el procesamiento con luz UV-C.

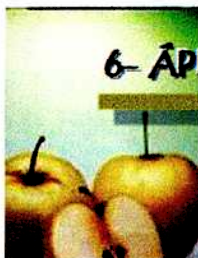
En cuanto los estudios pendientes es necesario avanzar sobre los siguientes aspectos más urgentes no dilucidados hasta el momento:

- 1) Estudiar los cambios de color y sensoriales en el jugo de manzana procesado utilizando el equipo propuesto en este estudio.

- 2) Incrementar la inactivación microbiana observada aplicando distintas estrategias tales como: el diseño de un equipo multietapa de varias fuentes de emisión de luz ubicadas en serie y/o la combinación de esta tecnología con otras tecnologías emergentes y/o tradicionales tal como el ultrasonido de alta intensidad; antimicrobianos naturales; pulsos de luz; etc.

Finalmente, se espera que en un futuro cercano se disponga de una tecnología de conservación de productos frutícolas símil frescos, basada en la utilización de luz UV germicida que está siendo recién estudiada/aplicada a nivel mundial. Ello permitirá a la pequeña y mediana industria nacional contar con técnicas de mínimo procesamiento sencillas y de no muy alto costo en su implementación pero de avanzada en cuanto a fundamentos científicos y know-how, y con el soporte necesario de conocimientos científicos, el cual todavía no existe o bien por falta de investigación suficiente y/o bien no es accesible ya que muchos avances en la investigación están en trámite de patentamiento. Esta técnica posibilitaría la disponibilidad de productos de excelencia de mayor vida útil/mayor inocuidad, permitiendo el acceso a mercados más alejados, facilitando la comercialización de frutícolas bajo nuevas formas de presentación, por ejemplo, los llamados "jugo símil fresco".

6- ÂPENDICE ESTADÍSTICO



Este capítulo incluye información con respecto a los métodos estadísticos que se utilizaron para el análisis de los resultados, definiciones y fórmulas.

6.1 Definiciones y Fórmulas

6.1.1- Población estadística

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.

6.1.2-Distribución normal

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

$$f(x) = \left(1 / \sqrt{2\pi\sigma}\right) * \exp\left[(Y - \bar{Y})^2 / 2\sigma^2 \right] \quad (6.1)$$

Donde:

exp = función exponencial con base e

Y= medición realizada

$\bar{Y}$ = media del total de las mediciones

σ = desviación estándar

σ^2 = varianza

6.1.3- 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 ($\bar{Y}$): es el promedio aritmético de las mediciones realizadas:

$$\bar{Y} = \frac{\sum_{i=1}^N Y_i}{N} \quad (6.2)$$

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:

$$\sigma = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^N (Y_i - \bar{Y})^2}}{\sqrt{(N-1)}} \quad (6.3)$$

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 .

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (Y_i - \bar{Y})^2}{N-1} \quad (6.4)$$

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:

$$SE = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \quad (6.5)$$

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 $\bar{Y}$:

$$\bar{Y} \pm t_{\alpha/2, n-1} \cdot \sqrt{\frac{\sigma^2}{N}} \quad (6.6)$$

Donde

$t_{\alpha/2, n-1}$ = el estadístico t de Student de nivel de confianza $\alpha/2$ 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.

$$gl = n - r \quad (6.7)$$

donde:

n = el número de sujetos en la muestra

r = el número de sujetos estadísticamente dependientes.

Cuando se trata de ajustar modelos estadísticos a un conjunto de datos, los residuos se encuentran habitualmente en un espacio de menor dimensión que aquél en el que se encontraban los datos originales. Los grados de libertad del error los determina, precisamente, el valor de esta menor dimensión.

La prueba t puede ser usada para demostrar la idea. La fórmula del estadístico t para comparar dos grupos de medidas independientes es :

$$t = \frac{\bar{Y}_a - \bar{Y}_b}{SE_{a-b}} \quad (6.8)$$

$$\text{entonces } \Rightarrow \quad gl = N_a + N_b - 2$$

donde N_a = número de medidas en el grupo a

N_b = número de medidas en el grupo b

El denominador del estadístico t ya se ha definido como el error standard de la diferencia entre medias. En el cálculo de los grados de libertad involucrados, se ha impuesto una restricción algebraica sobre cada grupo de datos (de allí, los dos grados de libertad que se restan al total).

6.1.4 - 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 la esa decisión muchas veces se usa el valor P donde $P = 1 - \alpha$. 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 mientras que 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 comunmente representado por el símbolo griego α (alpha). Cuando se hacen este tipo de comparaciones es importante tomar en cuenta si el ensayo es unilateral o bilateral. Por ejemplo si el ensayo es unilateral y se trabaja en un nivel de significación $\alpha = 0,05$ 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 $P = 1 - 2\alpha = 0,90$.

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 (-) ó (NS); cuando dicho valor supera al valor tabulado para $P \geq 0,95$ 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)/(-)
$VE > VT(P \geq 0,95)$	*
$VE > VT(P \geq 0,99)$	**

$$VE > VT(P 0,999)$$

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) es un método general con aplicaciones muy variadas y que puede llegar a ser complejo de acuerdo a las derivaciones que tome. Se utiliza en reemplazo del uso de una batería de test t-Student cuando se poseen varias muestras. Cuanto mayor es el número de sistemas de análisis, realizar una batería de test t no solo resulta dificultoso sino que ofrece pocas ventajas. Esta técnica 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. El ANOVA debe ser considerado en la práctica un test de diferencias de medias a dos colas (ya que las medias en sí mismas pueden aumentar o decrecer) que opera vía un test de cambio de varianza a una cola, el cual se describirá más adelante (test F).

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 Y_i respecto de la media $\bar{Y}$.

$$SST = \sum_{i=1}^N (Y_i - \bar{Y})^2 \quad (6.9)$$

La Suma de cuadrados Totales tiene asociados N-1 grados de libertad ya que existe la restricción

$$\sum_{i=1}^N Y_i - \bar{Y} = 0 \quad (6.10)$$

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 $\bar{Y}$ muestral y el valor predicho del modelo $\hat{Y}_i$ para una corrida i.

$$SSR = \sum (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2 \quad (6.11)$$

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 la 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):

$$MSR = \frac{SSR}{p - 1} \quad (6.12)$$

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.

$$SSE = \sum_{i=1}^N (Y_i - \hat{Y}_i)^2 = \sum_{i=1}^N r_i^2 \quad (6.13)$$

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:

$$MSE = \frac{SSE}{N - p} \quad (6.14)$$

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

<i>Fuente</i>	<i>gl</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Media de cuadrados</i>
DEBIDO A LA REGRESION	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 comunmente se realiza para verificar la significancia de la regresión es el test F. Si el valor calculado de $F > F_{\text{tablas}}$ 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. Es de destacar que los test t-Student y F son esencialmente los mismos. Para un diseño completamente aleatorio donde se estudian sólo dos tratamientos y dos test t a dos colas para muestras independientes se verifica que:

$$F = t^2 \quad (6.15)$$

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.

$$H_0 = B_1 = B_2 = \dots = B_k = 0$$

$$H_a \text{ por lo menos un parámetro } B_j \neq 0$$

Cuando se hace la prueba de F-test en lugar de probar cada parámetro B por separado (como sería el caso de la prueba t-Student) se usa esta prueba que abarca todos los parámetros B_j .

Si la hipótesis nula es verdad ($B_j = 0$), 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:

$$F = \frac{MSR}{MSE} = \frac{SSR/(p-1)}{SSE/(N-p)} \quad (6.16)$$

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.

6.2.2 - 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:

$$R^2 = \frac{SSR}{SST} \cdot 100 \quad (6.17)$$

También se usa el coeficiente de determinación ajustado por los grados de libertad del modelo:

$$R_{aj}^2 = 1 - \frac{SSE/(N-p)}{SST/(N-1)} \quad (6.18)$$

Siempre se busca que tanto R^2 como R_{aj}^2 se acercan a lo 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.

6.2.3 - Análisis de residuales

En el análisis de los residuales siempre se asume que los errores:

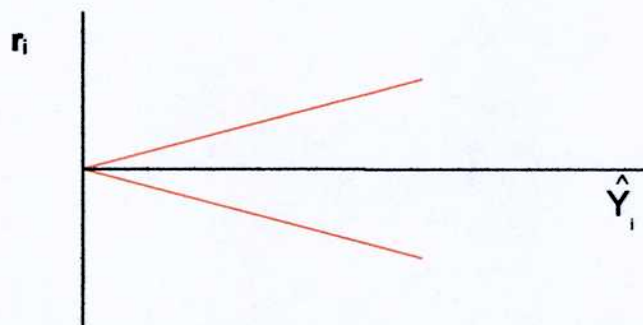
- son normalmente distribuidos con media igual a cero
- tienen varianza constante
- son independientes entre ellos

Existen herramientas gráficas y pruebas estadísticas se usan con fin de comprobar la validez de las suposiciones recién mencionadas.

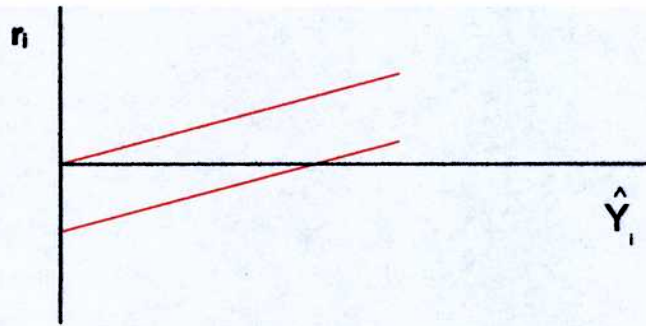
6.2.3.1- Versus valores predichos, $\hat{Y}_i$

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.

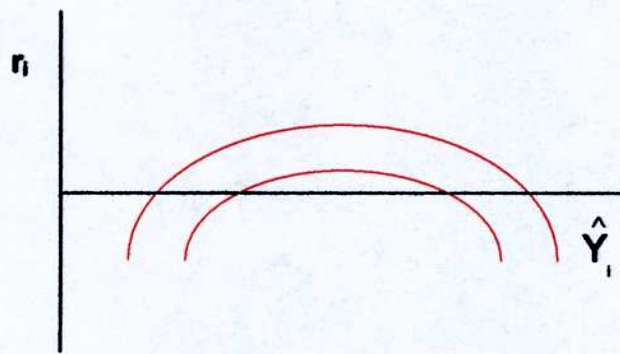
- Si la varianza del modelo no es constante y se incrementa, es necesario realizar un análisis de cuadrados mínimos especial o bien una transformación ($\ln(Y)$; $\sqrt{Y}$; $1/Y$; etc.) en la respuesta de interés :



- 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

7-BIBLIOGRAFÍA



- Adams, M.R. y Moss, M.O.(1995). Food Microbiology; The Royal Society of Chemistry: U.K.
- Alvarado, J.D. (1993). Viscosidad y energía de activación de jugos filtrados. Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 33(1):87-93.
- Alzamora, S.M.; Guerrero, S.N.; Nieto, A.B y Vidales, S.L. (2003). Preservation of Fruits and Vegetables with the Use of Combined Methods Technologies to Rural Families". Technical Manual, Agro-industries and Post-harvest Management Service, FAO.
- Alzamora, S.M; Cerrutti, P.; Guerrero, S. y López-Malo, A. (1995). Minimally processed fruits by combined methods". En Food Preservation by Moisture Control. Fundamentals and Applications. ISOPOW PRACTICUM II. Eds. G.V. Barbosa-Cánovas y J. Welti-Chanes. Technomic Publication, Pennsylvania, USA.
- Anellis, A. y Werkowski, S. (1968). Estimation of radiation resistance values of microorganisms in food products. Applied Microbiology, 16: 1300-1308.
- Anonymous (1999). An Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. Infection Associated with Unpasteurized Non-Commercial, Custom Pressed Apple Cider-Ontario, 1998. Disp. en <http://www.hcsc.gc.ca:80/hpb/lcdc/publicat/ccdr/99vol25/dr2513ea.html>.
- Anonymous (2000). [FDA] Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services. Disp. en : <http://vm.cfsan.fda.gov/~acrobat/fr98424b.pdf>.
- Barbosa-Cánovas, G.V.; Pothakamury, U.R.; Palou, E. y Swanson, B.G. (1998). Non Thermal Preservation of Foods. Eds. G.V. Barbosa-Cánovas; U.R. Pothakamury; E. Palou y B.G. Swanson. Marcel Dekker .New York, USA.
- Baumann, A.R.; Martin, S.E. y Feng, H.(2005). Power ultrasound treatment of *Listeria monocytogenes* in apple cider. Journal of Food Protection, 68: 2333-2340.
- Bintsis T.; Litopoulou-Tzanetaki, E. y Robinson, R. (2000). Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry - A critical review. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80:637-645.

- Bolton, J.R. Ultraviolet Application Handbook. (2001). Ed. J.R. Bolton Photosciences, Inc; Ayr, Ontario, Canada.
- Brackett, R.E. (1994). Microbiological spoilage and pathogens in minimally processed refrigerated fruit and vegetables. En "Minimally Processed Refrigerated Fruit and Vegetables". Ed. R. C. Wiley. Chapman& Hall, New York, USA.
- Bruzone, A. (2008). Análisis de la cadena de jugo concentrado de manzana. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Informe técnico. disp. en: <www.alimentosargentinos.gov.ar/O-3/bebidas/j_manzana/J_C_Manzana.htm>.
- Busch, S.V. y Donnelly, C.W. (1992) Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. Applied and Environmental Microbiology, 58 (1): 14-20.
- Castro A.J.; Barbosa-Cánovas G.V. y Swanson B.G. (1993). Microbial inactivation of foods by pulsed electric fields. Journal of Food Process and Preservation, 17: 47-73.
- Center for Disease Control y Prevention. (1999). Annual Report. Disp. en: http://www.cdc.gov/foodnet/annual/1999/html/1999_annual_report_foodnet.htm
- Center for Disease Control y Prevention. (2000). Surveillance for foodborne-disease outbreaks-United States, 1993-1997. CDC Surveillance Summaries (March). Morbidity and Mortality Weekly, vol. 49(no. SS-1). Disp. en: <http://www.cdc.gov/epo/mmwrhtml/ss4901a1.htm>
- Chang J.C.H., Ossoff S.F., Lobe D.C., Dorfman M.H., Dumais C.M., Qualls R.G. y Johnson J.D (1985). UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. Applied and Environmental Microbiology, 49(6):1361-1365.
- Char, C. (2006). Procesamiento mínimo de jugo de naranja mediante tratamiento térmico combinado con otros factores de estrés. Tesis Doctoral. Universidad de Bs. As. Tesis N° 4097 (www.bl.fcen.uba.ar).
- Char, C.; Mytilinaki, E.; Guerrero, S. y Alzamora, S.M. (2008). Inactivation of *E. coli* and *S. cerevisiae* in fruit juices processed by non-thermal emerging technologies. Presentado en : 2008 CIGR International Symposium On Food And Bioprocess

Technology (4th CIGR Section Vi International Symposium) , Foz do Iguazu, Brasil. Poster 1032.

- Christopher M. Waters y Bonnie L. Bassler. (2005). Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 21:319-346.
- Clarke, R. (1996). Report on USFDA meeting: Unpasteurized apple cider contaminated with *Escherichia coli* O157:H7 ", 8, January, 1996
- Cliver, D.O.(1997). Virus transmission via food. World Health Status Quo; 50(1-2):90-101 Disp. en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>
- Corte, F.V.; de Fabricio, S.V.; Salvatori, D.M. y Alzamora, S.M. (2005). Survival of *L. innocua* in apple juice as affected by vanillin or potassium sorbate. Journal of Food Safety, 24:1-15.
- Donahue W. D.; Canitez N.; Bushway A. A.(2004). UV Inactivation of E.coli O157:H7 in apple cider: quality, sensory and shelf-life analysis. Journal of Food Processing and Preservation, 28: 368-387
- Doyle, M. P. (1991). *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. International Journal of Food Microbiology, 12: 289 – 302.
- Dunn J.E.; Clark, R. W.; Asmus, J.F.; Pearlman, J.S; Boyer, K. y Painchaud F. (1988). Methods and apparatus for preservation of foodstuffs. Int. Patent WO 88/03369.
- Escartin, E. F., Ayala, A. C. y Lozano, J. S..(1989). Survival and growth of *Salmonella* and *Shigella* on sliced fresh fruit. Journal of Food Protection, 52 (7): 471-472.
- FDA, Food and Drug Administration. (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. Disp. en <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/spanish/spanO635.html>.
- FDA, Food and Drug Administration. (1999a). Potential for Infiltration, Survival and Growth Of Human Pathogens within Fruits and Vegetables. November 1999. Disp. en : <http://vm.cfsan.fda.gov/~comm/juicback.html>.
- FDA, Food and Drug Administration. (1999b). Report of 1997 Inspections of Fresh, Unpasteurized Apple Cider Manufacturers Summary of Results January 1999.

Summary of Good Manufacturing Practices Applied by Selected Apple Juice/Cider Producing States and Canada. Disp. en: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/ciderrp7.html>

- FDA, Food and Drug Administration. (2000a). FDA approves the use of ultraviolet radiation for juice. Food Safety Initiative. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Disp. en : <http://www.foodsafety.gov/~dms/fsiupd22.html>
 - FDA, Food and Drug Administration (2000b). Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies: Ultraviolet light. Rockville MD: Center for Food Safety and Applied Nutrition. Disp. en :<http://vm.cfsan.fda.gov/~comm/ift-uv.html>.
 - FDA, Food and Drug Administration. (2001). FDA publishes final rules to increase safety of fruit and vegetable juices. January 18, 2001. Disp. en: <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/hhsjuic4.html>.
 - Ferrante, S., Guerrero, S., y Alzamora, S. M. (2007). Combined use of ultrasound and natural antimicrobials to inactivate *Listeria monocytogenes* in orange juice. *Journal of Food Protection*, 70, 1850–1856.
- Gailunas, K. M. (2003). Use of Ultraviolet light for the inactivation of *L.monocytogenes* and Lactic acid bacteria species in recycled chill brines. (Master Degree Thesis).Virginia Polytechnic Institute. Disp. en: <http://scholar.lib.vt.edu/thesis/available/etd-07092003-140629/unrestricted/karolsthesis.pdf>
- Golden, D. (2000). Making Cider Safer. *UT Agriculture Magazine*, Fall Issue.
 - Gray, N.F.(1994). *Drinking Water Quality. Problems y Solutions*. Ed. N.F. Gray. Wiley, Chichester, USA,
 - Guerrero, S., Tognon, M., y Alzamora, S. M. (2005). Modeling the response of *Saccharomyces cerevisiae* to the combined action of ultrasound and low weight chitosan. *Food Control*, 16:131–139.
 - Guerrero-Beltrán J. A. y Barbosa-Cánovas G.V.(2004). Review : Advantages and Limitations on Processing Food by UV Light. *Food Science Technology International*, 10 (3): 137–146.

- Guerrero-Beltrán J. A. y Barbosa-Cánovas, G.V. (2005). Reduction of *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice by ultraviolet light. *Journal of Food Process Engineering* 28, 437-452.
- Hatcher, Jr., W.S.; Parish, M.E.; Weih, J.L.; Splittstoesser, D.F. y Woodward, B.B. (2000). Fruit beverages. En: *Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Eds. F.P. Downes, y K. Ito. American Public Health Association, Washington, DC, USA.
- Hoyer, O. (1998) Testing performance and monitoring of UV systems for drinking water disinfection. *Water Supply*, 16(1/2), 419-442.
- Jagger, J. (1967). Introduction to research in Ultraviolet Photobiology. Eds J. Jagger. Englewood Cliffs. Prentice-Hall Inc., New Jersey, USA.
- Juneja, V.K. y Sofos, J.N. (2002). Control of Foodborne Microorganisms. Eds. V.K. Juneja y J.N. Sofos. Marcel Dekker, New York, USA
- 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.
- Kushad, M. M. (1997). History of apple cider. Unpublished date.
- 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.
- López-Malo, A.; Palou, E.; Acre-García, M.R.; Bermúdez-Aguirre, D. y Gómez-Díaz, J.J. (2001). Short wave ultraviolet light irradiation effects on carrot juice. Institute of Food Technologists Annual Meeting, New Orleans, LA, June 2001.
- López - Malo y Palou, E. (2005). Ultraviolet light and food preservation. En: *Novel Food Processing Technologies*. Eds. G. Barbosa Cánovas M.D. Tapia y M.P. Cano CRC Press, Londres, Inglaterra.
- Marquenie, D.; Lammertyn, J.; Geeraerd, A. H.; Soontjens, C.; Van Impe J. F.; Nicolaï, B.M.; Michiels, C. W. (2001). Inactivation of conidia of *Botrytis cinerea* and *Monilia fructigena* using UV-C and heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 27-35

- McMeekin, 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., Londres, Gran Bretaña.
- MDAR, Commonwealth of Massachussetts. Department of Agricultural Resources. Disp. en <http://www.mass.gov/agr/massgrown>.
- Melissa B. Miller y Bassler, B.L.(2001). Quorum Sensing in Bacteria. Annual Review Microbiology, 55: 165–99.
- Mendonca, A.F.(2002). Inactivation by irradiation. En: Control of Foodborne Microorganisms. Eds.V.K., Juneja y J.N., Sofos,; Marcel Dekker, New York, USA.
- Mendoza, S.; Montemayor, L.; Buscan, L.A., Barreiro, J.A. (1982) Microflora in pasteurized fruit juices in Venezuela. Arch. Latinoam. Nutr. 32 (3), 617–629.
- Moyano, C.; León, J.J.; Marchelli, E.; Gonzalez J. y Betancurt, P. (1981). Jugo de natural integral de manzana. Monografías tecnológicas. Serie Frutas y Hortalizas. Laboratorio Tecnológico de Uruguay, Ministerio de Industria y energía, julio 1981, Montevideo , Uruguay.
- Nguyen, C. y Carlin, F. (1994). The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. Critical reviews in Food Science and Nutrition, 34: 372–401.
- Oteiza, J.M.(2007). Efecto de la aplicación de radiación UV en la inactivación de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en alimentos líquidos. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de La Plata.
- 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.
- 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.
- Parish, M. 2000. Relevancy of *Salmonella* and pathogenic *E.coli* to fruit juices. Fruit Processing, 10: 246–250.
- Peleg, M. (1995). A model of microbial survival after exposure to pulsed electric fields. Journal of the Science of Food and Agriculture, 67: 93–99.

- Peleg, M. (1999). On calculating sterility in thermal and non-thermal preservation methods. *Food Research International*, 32: 271– 278.
- Peleg, M., y Cole, M. B. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science*, 38: 353–380.
- Peleg M. y Cole M. B. (2000). Estimating the survival of *Clostridium botulinum* spores during heat treatments. *Journal of Food Protection*, 63: 190–195.
- Piyasena, P.; Liou, S. y Mc Kellar, R.C. (1998). Predictive modeling of inactivation of *Listeria* spp. in bovine milk during high-temperature short-time pasteurization. *International Journal of Food Microbiology*, 39: 167–173.
- Pothakamury, U.R; Monsalve-González, A.; Barbosa-Cánovas, G.V. y Swanson B.J. (1993). Magnetic field inactivation of microorganisms and generation of biological changes . *Food Technology*, 47(12): 85–92.
- Rahman, M.S. (1999). *Handbook of Food Preservation*. Ed. M.S Rahman. Marcel Dekker, New York, USA.
- Rahn, R.O. (1997). Potassium Iodide as a Chemical Actinometer for 254 nm Radiation: Use of Iodate as an Electron Scavenger. *Photochemistry and Photobiology*, 66 (4), 450–455.
- Rahn, R.O.; Xu, P. y Miller, S. (1999). Dosimetry of Room-air germicidal (254 nm) radiation using spherical actinometry. *Photochemistry and Photobiology*, 70, 314–318
- 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.
- Ryu, J. y Beuchat, L.R. (1998). Influence of acid tolerance responses on survival growth and thermal cross-protection of *Escherichia coli* O157:H7 in acidified media and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, 45: 185–193.
- 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.

- Sastry, S.K.; Datta, A.K. y Worobo, R.W. (2000). Ultraviolet light. *Journal of Food Science Supplement: Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies*, 90-92.
- Schenk, M., Guerrero, S. y Alzamora, S. M. (2008). Response of some microorganisms to ultraviolet treatment on fresh-cut pear. *Food and Bioprocess Technology . An Internacional Journal*. 1(4):384-392.
- Shama, G.(1999). Ultraviolet light. En *Encyclopedia of Food Microbiology-3*; Eds., R.K. Robinson; C. Batt y P. Patel. Academic Press, Londres, Gran Bretaña.
- Splittstoesser, D. F.(1987). Fruits and fruit products. En *Food and Beberage Mycology*. Ed. L. Beuchat .AVI Publishing Company, Connecticut, USA.
- Summerfelt S. T. (2003). Ozonation and UV irradiation. An introduction and examples of current applications. *Aquacultural Engineering*, 28:21-36.
- Thorne S. (1991). *Food Irradiation*. Ed. S. Thorne. Elsevier Appl. Science, Londres, Inglaterra.
- Unluturk, S.K.; Arastoopour, H.; Koutchma T.(2004) Modeling of UV dose distribution in a thin-film UV reactor for processing of apple cider. *Journal of Food Engineering*, 65: 125-136
- Whight, J. R., Sumner, S. S., Hackney, C.R., Pierson, M.D: y Zoecklein, B.W.(2000). Efficacy of ultraviolet light for reducing *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized apple cider. *Journal of Food Protection*, 63:563-567.
- Whiting, R.C. (1995). Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35: 467- 494.
- Yousef, A. E., y Marth, E. H. (1988). Inactivation of *Listeria monocytogenes* by ultraviolet energy. *Journal of Food Science*, 53: 571-573.
- Zimmerman, F. y Bergman, C. (1993). Isostatic pressure equipment for food preservation. *Food Technology*, 47(6):162-163.