

Tesis Doctoral

# Preservación de productos frutales mínimamente procesados mediante la aplicación de luz UV y su combinación con otras tecnologías emergentes

Schenk, Marcela Liliana

2010

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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:

Schenk, Marcela Liliana. (2010). Preservación de productos frutales mínimamente procesados mediante la aplicación de luz UV y su combinación con otras tecnologías emergentes. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Schenk, Marcela Liliana. "Preservación de productos frutales mínimamente procesados mediante la aplicación de luz UV y su combinación con otras tecnologías emergentes". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

**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

**PRESERVACION DE PRODUCTOS  
FRUTALES MINIMAMENTE PROCESADOS MEDIANTE LA  
APLICACIÓN DE LUZ UV Y SU COMBINACION CON OTRAS  
TECNOLOGIAS EMERGENTES**

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

*Autora: Lic. Marcela Liliana Schenk*  
*Directora de Tesis: Dra. Sandra Norma Guerrero*  
*Consejera de Estudios: Dra. Stella Maris Alzamora*

Buenos Aires, 2010

## **Preservación de productos frutales mínimamente procesados mediante la aplicación de luz UV y su combinación con otras tecnologías emergentes**

En los últimos años se ha explorado el uso de tecnologías de preservación innovadoras que involucran procesos no-térmicos con el objeto de reemplazar la severidad de los tratamientos térmicos. El objetivo general de este trabajo fue evaluar la eficiencia de la aplicación única de luz ultravioleta ó combinada con la utilización de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en tratamientos multifactoriales para inhibir y/o inactivar microorganismos patógenos y deteriorativos de derivados frutales. Se estudió la cinética de inactivación de inóculos simples y mixtos de diversos microorganismos en rodajas de pera y manzana con y sin piel, en función de la dosis de luz UV-C. Las curvas de inactivación se modelaron aplicando un modelo primario tipo Weibull. Para algunos casos se analizaron los efectos fisiológicos y estructurales mediante citometría de flujo y microscopía electrónica de transmisión. Además se evaluó la flora nativa, se realizaron estudios sensoriales con consumidores y se midió la evolución del color de las rodajas de pera procesadas según el tratamiento combinado propuesto: inmersión en  $H_2O_2$  (3%; pH 3,0; 5 min) y posterior irradiación con luz UV-C ( $3,7 \text{ kJ/m}^2$ ), y luz UV-C sólo, durante 7 días de almacenamiento en refrigeración ( $4^\circ\text{C}$ ). El tipo de matriz influyó en la inactivación microbiana observada, así como también el tipo de inóculo aplicado, siendo más efectiva la inactivación en pera sin piel. Los estudios de citometría de flujo mostraron que en inóculos tratados en medio líquido se observó pérdida de actividad metabólica y de integridad de membrana celular. Además, las observaciones en TEM evidenciaron cambios en la pared celular y en la granulometría citoplasmática. Los estudios realizados sobre flora nativa, color y sensorial demostraron que las modificaciones introducidas en las rodajas de pera por el tratamiento propuesto fueron leves, obteniendo un producto microbiológicamente seguro y de buena calidad organoléptica.

**Palabras clave:** matriz frutal, luz ultravioleta, peróxido de hidrógeno, tratamientos combinados, inóculos simples y mixtos.

## **Minimally processed fruits using UV light combined with other emerging technologies**

In the past decade the use of innovative preservation technologies involving non-thermal processes has been studied in order to replace the severity of heat treatment. The overall objective of this study was to evaluate the efficiency of ultraviolet light applied alone or in combination with the use of hydrogen peroxide in multifactor treatments to inhibit and/or inactivate pathogenic and spoilage microorganisms in fruit derivatives. The inactivation kinetics of single and mixed inocula of microorganisms in apple and pear slices with and without skin at different doses of UV-C was studied. Inactivation curves were modelled using a primary type Weibull model. The analysis of the structural and physiological cell effects for some process conditions were performed by flow cytometry and transmission electron microscopy. Native flora was also evaluated and sensory studies with consumers were conducted. Colour changes in processed pear slices were measured according to the proposed combined treatments: immersion in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%; pH 3,0; 5 min) followed by UV-C light (3,7 kJ/m<sup>2</sup>), and UV-C light alone, stored for 7 days at refrigeration temperature (4°C). Inactivation of microorganisms was influenced by the type of fruit and microorganism, being more effective in skinned pears. Loss of metabolic activity and membrane integrity were observed in UV-C treated cells by flow cytometry. Microscopic observations also showed changes in cell wall and cytoplasmic granulometry. Analysis of native flora, colour and sensory properties of pear slices processed by the combined UV-C/hydrogen peroxide treatment ratified a product microbiologically safe and with good organoleptic quality.

**Keywords:** fruit, ultraviolet light, hydrogen peroxide, combined treatments, single and mixed inocula.

## **Agradecimientos**

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

A los integrantes del Departamento de Industrias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por proporcionarme el lugar de trabajo para llevar a cabo las investigación para esta tesis.

A la Dra. Sandra Guerrero por su dedicación y constante atención en la dirección de esta tesis y la Dra. Stella Alzamora por su interés y asistencia en todo momento.

A mis compañeros de trabajo Cielo, Silvina, Analía y Sebastián por su amistad y compartir largas horas de trabajo, a Paula que me dio su apoyo en todos estos años, especialmente durante la redacción de esta tesis y a la Dra. Silvia Raffellini por su compañía y cooperación en las peripecias con citometría y microscopía.

A Germán muy especialmente por estar siempre presente brindándome su cariño y comprensión en todo momento y socorrerme con los equipos del laboratorio.

A mi familia, mi madre, hermanos, sobrinos y primas por compartir momentos de alegría.

## INDICE

### **1. INTRODUCCIÓN, 1**

- 1.1- Origen del cultivo de pera, 1
- 1.2- Producción de peras en Argentina, 1
- 1.3- Taxonomía y cultivo, 4
- 1.4- Variedades comerciales de pera (*Pyrus communis*), 6
- 1.5- Composición de la pera, 6
- 1.6- Ecología microbiana, 9
- 1.7- Tecnologías de preservación de peras que se aplican actualmente, 12
- 1.8- Tecnologías emergentes de preservación, 16
  - 1.8.1- Luz ultravioleta, 16
    - 1.8.1.1- La naturaleza de la luz ultravioleta, 16
    - 1.8.1.2- Fuentes de luz UV, 17
    - 1.8.1.3- La radiación ultravioleta en la tecnología de los alimentos, 19
    - 1.8.1.4- Susceptibilidad de los microorganismos a la luz UV, 20
    - 1.8.1.5- Fenómeno de reactivación, 21
    - 1.8.1.6- Cuantificación de la luz ultravioleta, 22
    - 1.8.1.7- Problemas y limitaciones, 23
  - 1.8.2- Peróxido de hidrógeno en preservación de alimentos, 24
    - 1.8.2.1- Mecanismo de acción del peróxido de hidrógeno, 25
    - 1.8.2.2- Factores que afectan la actividad del peróxido de hidrógeno, 25
    - 1.8.2.3- Aplicaciones en la industria alimenticia, 26
- 1.9 - Tecnologías combinadas de preservación, 26
- 1.10 - Herramientas en microbiología de alimentos, 28
  - 1.10.1 - Microbiología predictiva, 28
    - 1.10.1.1- Clasificación de los modelos matemáticos, 30
    - 1.10.1.2- Validación de los modelos matemáticos, 31
    - 1.10.1.3- Limitaciones de los modelos matemáticos, 32
    - 1.10.1.4- Aplicaciones de los modelos microbianos, 33
    - 1.10.1.5- Modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull, 35
  - 1.10.2- Citometría de flujo, 38
- 1.11- Estudio de color en los alimentos, 41

- 1.11.1- Medición del color con espectrofotómetro de reflectancia, 45
- 1.11.2- Funciones de color, 45
- 1.12- Análisis sensorial de alimentos, 46
  - 1.12.1- Jueces, 47
  - 1.12.2- Selección del panel, 48
  - 1.12.3- Selección del sitio de la prueba, 49
  - 1.12.4- Pruebas de laboratorio: sala de prueba, 49
  - 1.12.5- Clasificación de las pruebas de evaluación sensorial, 49
    - 1.12.5.1- Pruebas discriminativas, 51
    - 1.12.5.2- Pruebas afectivas, 51
    - 1.12.5.3- Análisis sensorial de textura, 52

## **2. OBJETIVOS, 54**

- 2.1- Objetivo general, 54
- 2.2- Objetivos específicos, 54

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS, 56**

- 3.1- Materia prima, 56
- 3.2- Reactivos, 56
- 3.3- Medios de cultivo, 58
- 3.4- Microorganismos, 59
- 3.5- Preparación del inóculo, 59
- 3.6- Determinación de pH y ácidos solubles, 60
- 3.7- Enumeración de microorganismos supervivientes, 60
- 3.8- Estudios de inactivación, 60
  - 3.8.1- Tratamientos con luz ultravioleta de onda corta, 60
    - 3.8.1.1- Descripción del equipo, 60
    - 3.8.1.2- Determinación de la dosis UV-C, 61
    - 3.8.1.3- Procedimiento de inactivación por UV-C, 64
  - 3.8.2- Tratamiento con peróxido de hidrógeno, 65
    - 3.8.2.1- Tiempo de secado de las rodajas inoculadas, 65
    - 3.8.2.2- Efecto del tiosulfato de sodio pentahidratado, 65

- 3.8.2.3- Utilización del peróxido de hidrógeno en medio líquido, 67
- 3.8.2.4- Efecto del peróxido de hidrógeno en matriz sólida, 67
- 3.8.3- Tratamientos combinados, 69
  - 3.8.3.1- Tratamientos en serie, 69
  - 3.8.3.2- Tratamientos en simultáneo, 69
- 3.9- Representación gráfica de las curvas de supervivencia, 69
- 3.10- Modelado matemático, 70
- 3.11- Estudios de almacenamiento, 71
- 3.12- Evolución de la flora nativa, 71
- 3.13- Análisis por citometría de flujo, 72
  - 3.13.1- Optimización de la técnica de citometría de flujo, 72
    - 3.13.1.1- Número de células a pasar por el citómetro, 72
    - 3.13.1.2- Volumen de muestra para marcación con fluorocromos, 73
    - 3.13.1.3- Cantidad de fluorocromo a utilizar, 73
  - 3.13.2- Preparación de las muestras irradiadas con UV-C, 73
  - 3.13.3- Preparación de las muestras para tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 74
- 3.14- Microscopía electrónica de transmisión, 76
- 3.15- Uso de soluciones antipardeamiento, 76
- 3.16- Evaluación del color, 77
  - 3.16.1- Elección del método de envasado de las rodajas de pera, 77
  - 3.16.2- Medición del cambio de color, 78
- 3.17- Análisis sensorial, 78
  - 3.17.1- Área de prueba, 79
  - 3.17.2- Jueces, 79
  - 3.17.3- Pruebas de evaluación sensorial, 79
    - 3.17.3.1- Test de diferencia contra control, 81
    - 3.17.3.2- Test de escala hedónica, 81
    - 3.17.3.3- Análisis de textura, 83

#### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN, 90**

- 4.1- Determinación de pH y sólidos solubles, 90
- 4.2- Determinación de la dosis de radiación UV-C, 90
- 4.3- Tratamientos con luz ultravioleta, 97

- 4.3.1- Utilización de diversas matrices, 97
  - 4.3.1.1- Curvas de inactivación, 97
  - 4.3.1.2- Aplicación del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull, 99
- 4.3.2- Inactivación microbiana en pera mediante luz UV-C. Inóculos simples, 109
  - 4.3.2.1- Curvas de inactivación, 109
  - 4.3.2.2- Aplicación del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull, 113
- 4.3.3- Inactivación microbiana en pera mediante luz UV-C. Inóculos mixtos, 117
  - 4.3.3.1- Curvas de inactivación, 117
  - 4.3.3.2- Aplicación del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull, 121
- 4.3.4- Citometría de flujo, 131
  - 4.3.4.1- Optimización de la técnica, 131
  - 4.3.4.2- Análisis de microorganismos tratados con luz UV-C mediante citometría de flujo, 132
- 4.3.5- Observación microscópica de células de *E. coli* ATCC 11229 en suspensión líquida tratadas con luz ultravioleta, 150
- 4.4- Tratamientos con peróxido de hidrógeno, 155
  - 4.4.1- Optimización del tiempo de secado de las rodajas de pera inoculadas, 155
  - 4.4.2- Efecto del tiosulfato de sodio pentahidratado, 156
  - 4.4.3- Utilización del peróxido de hidrógeno en medio líquido, 158
  - 4.4.4- Efecto del peróxido de hidrógeno en matriz sólida, 161
  - 4.4.5- Análisis por citometría de flujo de células de *E. coli* ATCC 11229 en suspensión líquida tratadas con peróxido de hidrógeno, 164
  - 4.4.6- Observación microscópica de células de *E. coli* ATCC 11229 en suspensión líquida tratadas con peróxido de hidrógeno, 169
- 4.5- Tratamientos combinados: luz ultravioleta y peróxido de hidrógeno, 172
- 4.6- Estudios de almacenamiento, 176
- 4.7- Evolución de la flora nativa, 179
- 4.8- Evolución del color, 184

- 4.8.1- Uso de soluciones antipardecimiento, 184
- 4.8.2- Elección del método de envasado de las rodajas de pera, 186
- 4.8.3- Medición del cambio de color, 189
- 4.9- Análisis sensorial, 198
  - 4.9.1- Test de diferencia contra control, 198
  - 4.9.2- Test de escala hedónica, 201
  - 4.9.3- Análisis sensorial de textura, 204

## **5. CONCLUSIONES, 209**

## **6. APÉNDICE ESTADÍSTICO, 214**

- 6.1- Conceptos estadísticos generales, 214
  - 6.1.1- Población estadística, 214
  - 6.1.2- Distribución normal, 214
  - 6.1.3- Parámetros y estimadores, 214
  - 6.1.4- Significancia estadística, 217
- 6.2 - Análisis de varianza (ANOVA), 218
  - 6.2.1- Test F de significación de la regresión, 221
  - 6.2.2- Test F parcial, 222
- 6.3- Coeficiente de determinación ( $R^2$ ), 223
- 6.4- Análisis de residuales, 223
  - 6.4.1- Versus valores predichos,  $\hat{Y}_i$ , 224
- 6.5- Modelo lineal generalizado, 225
- 6.6- Métodos por comparaciones múltiples, 227
  - 6.6.1- Mínima diferencia significativa de Fisher (MDS), 228
  - 6.6.2- Test de Dunnett, 228

## **7. BIBLIOGRAFÍA, 230**

- 7.1- Páginas Web, 246



# Introducción

## 1.1- Origen del cultivo de pera

El origen de los perales se remonta a 2.000 o 3.000 años a.c. Es un árbol nativo de las regiones de Europa oriental y de Asia occidental. Deriva de la selección de razas silvestres de peral *Pyrus communis* (var. *pyraster*) hibridadas con otras especies europeas o asiáticas: *Pyrus nivalis* (var. Jacq.), *Pyrus pyrifolia* (var. Burn.f) *Nakai*, *Pyrus spinosa* (var. Forssk.), etc. Los griegos y los romanos conocieron el cultivo del peral y fueron estos últimos quienes lo introdujeron en la Cuenca del Ebro. Con el descubrimiento de América fueron los españoles en América del Sur junto con los ingleses y franceses en América del Norte los que introdujeron este árbol en el continente americano. Los mayores productores de esta fruta son China, Italia, Estados Unidos, España y Argentina (**Figura 1.1**).

Actualmente es una fruta que se desarrolla muy bien en todas las zonas templadas del planeta.

## 1.2- Producción de peras en Argentina

La producción Argentina de pera creció un 30% durante el período 1996-2005 debido principalmente a las inversiones en tecnología y a las nuevas plantaciones. La Argentina es, dentro del Hemisferio Sur, el principal productor de contraestación con casi la mitad del volumen total. Le siguen en importancia Sudáfrica y Chile, países que generan el 22% y 18% del total producido, respectivamente.

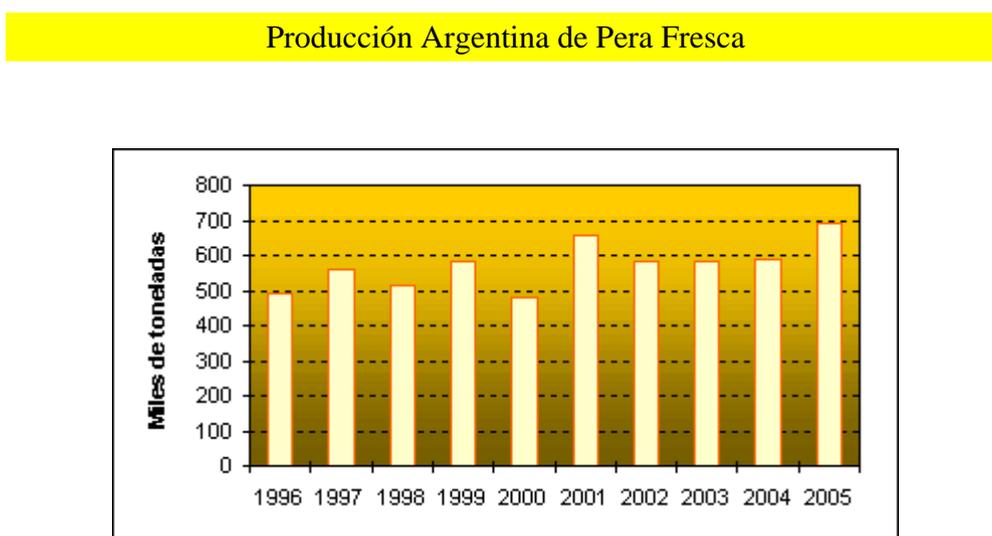
En Argentina, las plantaciones se concentran en el Alto Valle del Río Negro y Neuquén, Valle Medio del Río Negro y el Valle de Uco, en Mendoza. Otras zonas de menor relevancia son 25 de Mayo, en La Pampa y el Valle del Tulum, en San Juan. Sólo el 17% de la producción argentina de pera se destina a la industria, ya que por su calidad es muy demandada en el mundo como pera en fresco (**Figura 1.2.1**). En la industria se elaboran jugos concentrados, sidra, conservas, pulpas deshidratadas y licores.

Las exportaciones mundiales promedian 1,5 millones de toneladas anuales. Argentina ocupa el primer lugar como exportador con el 30% del total, le sigue China con una oferta del 23% del total mundial.

**Figura 1.1** Producción mundial de pera fresca (año 2005).



**Figura 1.2.1** Producción Argentina de pera fresca en el período 1996-2005.



Fuente: Dirección de Industria Alimentaria (SAGPyA) sobre la base de datos de fuentes privadas.

**Figura 1.2.2** Exportaciones Argentinas de pera fresca en el año 2005.

Fuente: Dirección de Industria Alimentaria sobre la base de datos de INDEC.

Las exportaciones de pera en Argentina se incrementaron un 35% para el 2005, siendo los principales países demandantes Rusia e Italia, cada uno con el 20% del volumen total. También son compradores de pera argentina: Brasil, Estados Unidos, Holanda y Bélgica, entre otros (**Figura 1.2.2**).

### 1.3- Taxonomía y cultivo

La pera pertenece a la familia *Rosaceae*, y dentro del género *Pyrus*, la especie más común es *Pyrus communis*. Es un árbol piramidal de tronco alto y grueso, con ramas que se insertan formando un ángulo agudo ( $45^\circ$ ) con el tronco, (**Figura 1.3.1a**) con hojas alternas y simples, suelen ser lanceoladas u ovaladas, flores blancas con largos cabillos que forman corimbos umbeliformes en la terminación de las ramillas (**Figura 1.3.1b**) y fruto en pomo, estrechado en la base; esta puede ser redondeada o atenuada y prolongada en el pedúnculo (**Figura 1.3.1c**).

El método de propagación vegetativa que se utiliza es el de injerto, en la cual una porción de tejido procedente de una planta (la variedad o injerto propiamente dicho) se une sobre otra ya asentada (el patrón, portainjerto o pie), de modo tal que ambos crezcan como un solo organismo. El patrón que habitualmente se usa es el membrillero, por dar árboles más homogéneos.

El injerto permite el crecimiento de variedades de valor comercial en terrenos o circunstancias que les son desfavorables, aprovechando la mayor resistencia del pie usado, o para asegurarse que las características productivas de un ejemplar se mantengan inalteradas, frente a la dispersión genética que introduce la reproducción sexual (Hartmann, 1990).

El cultivo prospera bien en climas templados y algo húmedos, siendo más resistente al frío que al calor, necesita de suelos limosos y silíceo-arcillosos, sanos y permeables. El peral necesita para su buen desarrollo y producción una cantidad de 700 a 800 mm de agua, especialmente sin déficit en los meses de verano, previos a la recolección, suministrados por la lluvia o por riego.

**Figura 1.3.1** a) Peral, b) flor del peral, c) distintas variedades de peras, I) William`s, II) Packam`s Triumph, III) Beurre D´anjou, IV) Beurre Bosc.

a)



b)



c) I



II



III



IV



#### 1.4- Variedades comerciales de pera (*Pyrus communis*)

Las variedades que se comercializan en Argentina provienen del peral común *Pyrus communis* surgidos por mejoramiento varietal (**Figura 1.3.1 c**), cuyas características son las siguientes:

- **I: William's:** es de color amarillo oro, con pocas lenticelas, un tamaño medio y sabor muy dulce. Tiene mucho jugo y un aroma muy agradable. Su pulpa de color blanco – amarillento, es firme y crujiente. Se utiliza como pera de mesa para comer directamente o para la fabricación de conservas y para la obtención de licores.
- **II: Packam's Triumph:** es muy jugosa y grande, de color verde-amarillo. Se emplea como pera de mesa. Su sabor es más bien ácido y de textura fina y crujiente.
- **III: Beurre D'anjou:** es de color verde de mediano tamaño, con forma cónica y muchas lenticelas de color oscuro. Su pulpa firme y mantecosa es blanco – amarillento y presenta un sabor ligeramente ácido con un suave aroma.
- **IV: Beurre Bosc:** son peras grandes y alargadas, con la piel de color amarronada. Su pulpa es blanca, presenta una textura muy fuerte y un aroma muy destacado. Ideal para acompañar platos calientes.

#### 1.5- Composición de la pera

La pera es un fruto que posee más de un 80 % de agua, y una cantidad muy baja de grasa, posee una gran cantidad de vitaminas y minerales (**Tabla 1.5.1**) como el potasio, magnesio y calcio y carece de sodio. Todo ello, junto a un elevado contenido en ácidos caféico, ursólico y ascórbico, así como arginina y arbutina le confieren un gran poder diurético. Su ingestión ayuda a incrementar la micción por lo que resulta muy adecuado en las dietas para perder peso. Esta fruta por tener grandes cantidades de fibra soluble en forma de pectinas, magnesio y zinc (que estimulan la producción de insulina y las epicatequinas con

propiedades hipoglucémicas) constituyen un alimento adecuado para personas diabéticas (Barroca y col., 2006).

Se ha demostrado que las pectinas ayudan a rebajar el nivel de colesterol, al formar un gel en el intestino que atrapa este tipo de grasa y lo expulsa del organismo a través de las heces, además de tener la capacidad para absorber las toxinas del intestino e impedir que estas pasen a la sangre o ataquen la pared intestinal. El ácido caféico y ácido pantoténico también poseen propiedades anticolesterolémicas. La vitamina C es la que más se destaca como principal antioxidante. El potasio junto con el calcio intervienen directamente, en el proceso de formación ósea, así como la regulación de líquidos en el cuerpo y el buen estado del sistema nervioso (Chen y col., 2007). Los taninos le confieren propiedades antibacterianas.

La pera también es rica en ácidos grasos poliinsaturados y en aminoácidos, algunos de ellos esenciales como la leucina, necesaria para el óptimo crecimiento en los infantes o la regeneración de los tejidos.

Tabla 1.5.1 Composición de la pera fresca

<b>Composición en mg por cada 100 g de peras frescas</b>	
<b>Agua</b>	83.810
<b>Energía</b>	59 Kcal
<b>Grasa</b>	400
<b>Proteína</b>	390
<b>Hidratos de carbono</b>	15.110
<b>Fibra</b>	2.400
<b>Potasio</b>	125
<b>Sodio</b>	0
<b>Fósforo</b>	11
<b>Calcio</b>	11
<b>Cobre</b>	0,11
<b>Magnesio</b>	6
<b>Manganeso</b>	0,08
<b>Hierro</b>	0,25
<b>Zinc</b>	0,12
<b>Selenio</b>	1
<b>Vitamina C</b>	4
<b>Vitamina B1 ( Tiamina)</b>	0,02
<b>Vitamina B2 (Riboflavina)</b>	0,04
<b>Niacina</b>	0,10
<b>Folacina</b>	7 mcg
<b>Vitamina B6</b>	0,02
<b>Vitamina A</b>	20 IU
<b>Vitamina E</b>	0,50

## 1.6- Ecología microbiana

La microflora de los frutos frescos está constituida por una población primaria o nativa cuya presencia y cantidad difiere con el área geográfica, condiciones climáticas, tratamientos con agroquímicos, cultivar y aún de las distintas partes del fruto (Brackett, 1999). Una microflora secundaria (hongos, bacterias, parásitos, virus, etc.) proveniente de fuentes externas, puede contaminar los frutos durante las etapas de pre y postcosecha, almacenamiento e industrialización. Las posibles fuentes de contaminación precosecha incluyen: suelo, agua de riego, agua utilizada para la aplicación de insecticidas y fungicidas, abonos a partir de desechos animales, insectos y pájaros. La contaminación postcosecha puede provenir de la manipulación, equipamiento de cosecha, contenedores, transporte, equipamiento de proceso, insectos, etc. Por ejemplo, Janisiewicz y col. (1999) demostraron que la mosca de la fruta resultó ser un buen vector para la contaminación de manzanas con daños superficiales, con una cepa de *E. coli* O157:H7 marcada con fluorescencia.

La cáscara de los frutos sanos es una barrera protectora contra la invasión microbiana hacia los tejidos internos. El procesamiento de estos alimentos frescos como el lavado, pelado, cortado o 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 y Carlin, 1994; Brackett, 1994).

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

Del Rosario y Beuchat (1995) demostraron que *E. coli* O157:H7 podía sobrevivir en cubos de melón a 5°C durante 34 horas. Además fue la responsable del brote por ETA por consumo de ensaladas, ocurrido en Texas en 1994 (Barnett y col., 1995).

Este y otros incidentes llevaron a que la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (US FDA) estableciera normativas a

implementarse a partir de 2002 para asegurar la sanidad de estos productos, según el tamaño de la planta productora. Los requerimientos incluyen la implementación de los principios del Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP) en la producción y la aplicación de tratamientos que aseguren la reducción de al menos 5 ciclos logarítmicos del microorganismo de significación pública identificado como el más resistente al tratamiento particular aplicado (FDA, 2001). La norma no especifica el tipo de tratamiento a aplicar, sino que considera la letalidad acumulada por la utilización de más de un tratamiento, posibilitando la aplicación del concepto de barreras y la obtención de productos mínimamente procesados. La guía desarrollada por la FDA incluye una lista de “microorganismos pertinentes”, dentro de los que se encuentra *L. monocytogenes* (FDA, 2002).

*Listeria monocytogenes* es un bacilo gram-positivo patógeno, no formador de esporas, ampliamente distribuido en el ambiente y que se encuentra asociado con la suciedad, heces de pájaros y animales y aguas servidas (Beuchat, 2002). Históricamente, los brotes de listeriosis han sido asociados primariamente a carnes listas para consumo, debido a la resistencia de *L. monocytogenes* a las sales y nitritos usadas como preservadores; a productos lácteos por su resistencia a las temperaturas de refrigeración; y al de consumo de productos inadecuadamente calentados ó recontaminación de alimentos pasteurizados (Yuste y Fung, 2002).

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

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 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* ATCC 33090 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).

Otro microorganismo asociado a la contaminación de alimentos que puede causar enfermedad transmitida por alimentos es *Escherichia coli*, una bacteria Gram negativa, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Fue en 1940, que por primera vez aparece como agente etiológico de enfermedad causada en humanos y en 1982 se aísla *E. coli* O157:H7 que se caracteriza como 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.

Por otro lado se encuentran los microorganismos que si bien no son patógenos, son deteriorativos de alimentos y deben ser tenidos en cuenta en la industria alimenticia, como lo son las levaduras, microorganismos constituyentes de la flora natural de la mayoría de las frutas, son ubicuos y alterantes muy comunes para frutas y granos. Predominan en el deterioro de este tipo de alimentos debido a su alta tolerancia ácida y por la capacidad de la mayoría de ellas de crecer aeróbicamente (Oteiza, 2007). Las levaduras son los microorganismos que mejor proliferan en condiciones altamente osmóticas y acídicas, además de poder crecer a temperaturas de refrigeración. Las especies más importantes incluyen: *Candida parapsilosis*, *Candida stellata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii* y *Zygosaccharomyces bailii* (Mendoza y col., 1982).

### 1.7- Tecnologías de preservación de peras que se aplican actualmente

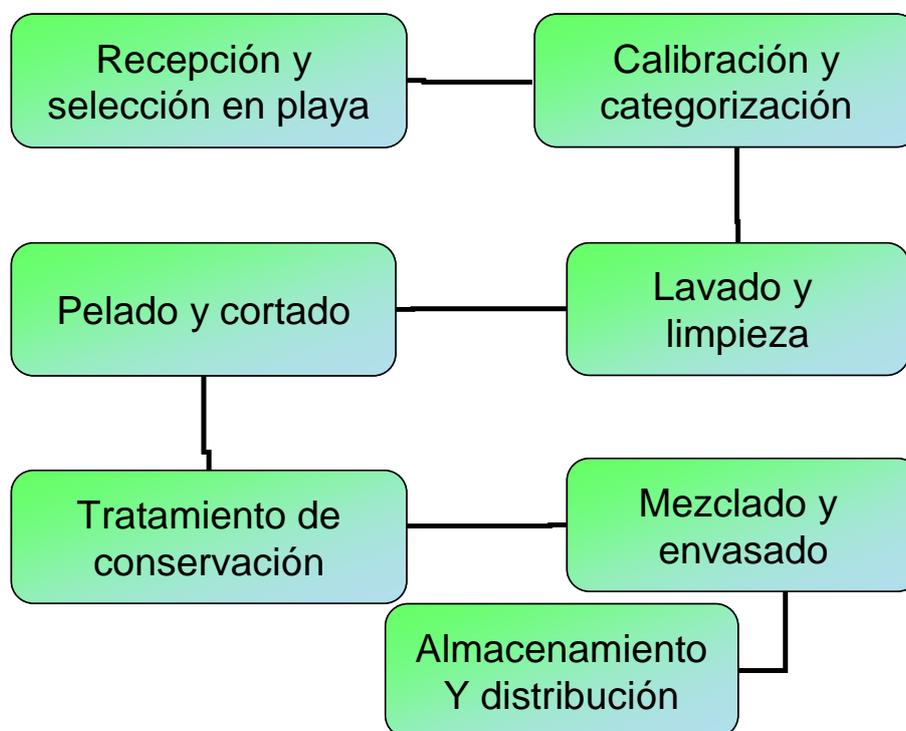
Las frutas y verduras constituyen un componente esencial de la dieta. Pero hoy en día, el cambio en el ritmo de vida, va orientado al consumo de alimentos ya preparados. Dentro de lo que es el consumo de pera procesada, la forma más difundida actualmente es la *pera en conserva*, cuyo procesamiento se esquematiza en la **Figura 1.7.1**. Sin embargo, la mayor preocupación por la salud hace que estén variando las preferencias de los consumidores hacia los productos frescos con una elevada calidad nutritiva y sensorial. Puede mencionarse la comercialización bajo nuevas formas de presentación, como por ejemplo, el expendio de los llamados “productos frescos – cortados”, que se definen como “frutas y hortalizas frescas o combinaciones de las mismas cuya forma original ha sido alterada físicamente, pero permanecen en estado fresco” (FDA, 2001). El inconveniente de estos productos es que son vulnerables a la contaminación y subsiguiente supervivencia y desarrollo de microorganismos que pueden provocar enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's), cuyo riesgo de producción se ve agravado por el consumo de estos productos sin ningún tipo de procesamiento térmico, la ausencia de controles microbiológicos sistemáticos y el

**Figura 1.7.1** Elaboración de peras en conserva

cambio en los sistemas de distribución de los mismos (FDA, 2001; Abadias y col., 2008).

A raíz de esto surgen las frutas y hortalizas mínimamente procesadas, las cuales se han desarrollado a una gran velocidad principalmente en Europa Occidental, Estados Unidos y Japón y que son conocidas con el término de frutas de IV gama (Vidal Aragón de Olives y Bernalte García, 2003). Se define a las frutas de la IV gama como las preparadas mediante una o varias operaciones unitarias apropiadas tales como pelado, cortado, obtención de zumo, etc., asociadas a un tratamiento de conservación que puede incluir un calentamiento mínimo, la adición de un conservador, o alguna otra tecnología emergente de preservación que no destruya la calidad de la fruta, como la luz ultravioleta.

La fruta así procesada puede envasarse en algún tipo de atmósfera modificada o se puede elegir materiales plásticos con una permeabilidad a los gases y al vapor de agua tal que sea la propia fruta, la que al respirar promueva el empobrecimiento de  $O_2$  y el enriquecimiento de  $CO_2$  hasta niveles que aseguren una vida útil apropiada (Soliva-Fortuny y Martín-Belloso, 2003). Luego debe ser mantenida en refrigeración durante el almacenamiento, distribución y comercialización (**Figura 1.7.2**). Entre las frutas de la IV gama disponibles en el mercado se encuentran: piña, mango, pera, sandía, kivi, manzana, melón (Aguayo y col., 2001), etc.

**Figura 1.7.2** Elaboración de fruta de la IV gama.

## **1.8- Tecnologías Emergentes de preservación**

En respuesta al interés en la salud pública respecto a la inocuidad microbiológica de frutas y hortalizas frescas, enteras o cortadas, en la actualidad se está investigando la eficiencia de nuevos métodos no térmicos físicos y químicos con el propósito, como se mencionó anteriormente, de reducir la carga microbiológica de estos alimentos y así prevenir brotes de ETA's. Durante el procesado no térmico la temperatura del alimento se mantiene por debajo de la temperatura que se utiliza normalmente en el procesado térmico y por lo tanto, las vitaminas y nutrientes no experimentan cambios severos, maximizando la retención de las cualidades del alimento. Para este propósito se han desarrollado nuevas tecnologías de preservación denominadas comúnmente **tecnologías emergentes** con el fin de desarrollar productos de alta calidad asegurando al mismo tiempo la inocuidad de su consumo. Estas tecnologías tienen aplicaciones específicas en términos de los tipos de alimentos que pueden ser procesados, algunas de las cuales se están implementando en la industria y otras están siendo investigadas. Entre las tecnologías emergentes se encuentran: altas presiones (Deliza y col., 2005), ultrasonido (Ferrante, 2004), pulsos eléctricos (Toepfl y col., 2007), pulsos de luz, luz ultravioleta (Schenk y col., 2008), uso de sanitizantes (Lin y col., 2002), uso de antimicrobianos naturales (Char y col., 2009), etc.

Por otro lado, una tendencia es aplicar distintas tecnologías tradicionales y emergentes combinadas que produzcan un efecto sinérgico en la inactivación de los microorganismos sin la necesidad de aplicar tratamiento tan severos que dañen el producto.

A continuación se describirán las tecnologías emergentes que se han aplicado en esta tesis.

### **1.8.1- Luz ultravioleta**

#### **1.8.1.1- La naturaleza de la luz ultravioleta**

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 (**Figura 1.8.1**).

La radiación UV ocupa una banda ancha de longitudes de onda de la región no ionizante del espectro electromagnético (**Tabla 1.8.1**), y se divide en varias regiones (Bolton, 2001).

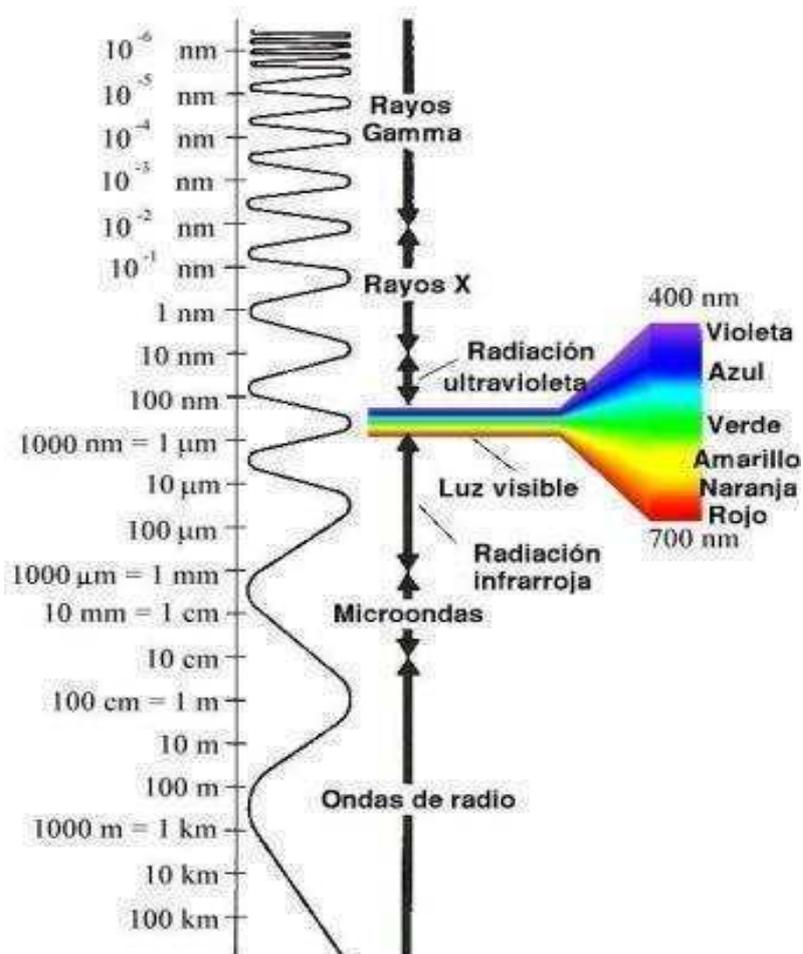
Dentro de la región UV, la longitud de onda larga (UV-A) es la que produce cambios en la piel como envejecimiento, arrugas y pérdida de elasticidad, la longitud de onda media (UV-B) puede provocar cáncer de piel y la longitud de onda corta (UV-C) es la que causa el mayor daño e involucra alteraciones de las moléculas de ADN a través principalmente de la formación de dímeros de pirimidinas (timina y citosina) que se encuentran adyacentes, impidiéndose el apareamiento normal de bases e imposibilitando la reproducción (Shama, 1999) . El daño causado en el ADN es proporcional a la cantidad de radiación UV a la que ha sido expuesto. Este efecto es letal para la mayoría de los microorganismos, incluyendo bacterias, virus, protozoos, hongos filamentosos, levaduras y algas. También puede ocasionar un efecto sobre las proteínas alterando sus funciones básicas dentro de la célula.

#### **1.8.1.2- Fuentes de luz UV**

La radiación ultravioleta es parte de la radiación del sol que llega al planeta. La UV-A es la radiación dentro del UV que más se encuentra en la superficie de la tierra ya que las longitudes de onda más cortas del UV no pueden atravesar la capa de ozono que se ubica en la estratosfera. Esto hace que no se pueda utilizar la fuente solar para aprovechar las propiedades germicidas de UV-C y se tenga que recurrir a fuentes artificiales. Existen distintas lámparas de emisión de luz UV:

- ✓ **luz UV-A:** este tipo de lámparas son de mercurio que emiten tanto UV-A como luz visible, pero estas últimas son filtradas por el material de recubrimiento de la lámpara.

Figura 1.8.1 Espectro electromagnético.



**Tabla 1.8.1** Según su longitud de onda, se distinguen varios subtipos de rayos ultravioleta.

Nombre	Abreviación	Longitud de onda (nm)	Energía por fotón (eV)
<b>Ultravioleta cercano</b>	NUV	400 – 200	3,10 – 6,20
Onda larga	UVA	400 – 320	3,10 – 3,87
Onda media	UVB	320 – 280	3,87 – 4,43
Onda corta	UVC	280 - 200	4,43 – 6,20
<b>Ultravioleta lejano</b>	FUV, VUV	200 – 10	6,20 - 124
<b>Ultravioleta extremo</b>	EUV, XUV	31 – 1	40 – 1240

- ✓ **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, emiten en la región germicida (254 nm) que es la banda resonante de mercurio. Estas lámparas poseen un recubrimiento de cristal de cuarzo, 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, cuya función es extender la vida útil de los electrodos y reducir las 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 electrones de los átomos de mercurio pasando a un nivel de mayor energía. Al volver los electrones a su estado normal (a un nivel de energía menor) emitirán la energía restante en forma de luz ultravioleta, a los 254 nm.

### 1.8.1.3- La radiación ultravioleta en la tecnología de los alimentos

Dentro de la industria de la tecnología de alimentos los tipos de radiación que más aplicación tienen actualmente son la radiación gama, la radiación ultravioleta y las microondas (Mendonça, 2002).

La luz ultravioleta se comenzó a utilizar para la desinfección de superficies. Sin embargo con los años ha crecido el interés de aplicarlo como una tecnología de preservación de alimentos, por ser un proceso que posee destacadas ventajas:

- ❖ 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 bacterias, hongos, levaduras y parásitos

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 alimenticia, farmacéutica y hospitales se usa para esterilización de superficies, utensilios, aire y también material de empaque. En horticultura el UV (Dosis entre 0,25 y 9,2 kJ/m<sup>2</sup>) se utiliza por su efecto hormético, induciendo la respuesta al estrés estimulando la producción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) que induce la formación de fitoalexinas que mejoran la resistencia de frutas y vegetales al ataque de microorganismos (Shama y Peter, 2005). 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 y col., 2000).

#### **1.8.1.4- 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, esta variación dependerá: de la estructura de la pared celular, del espesor y composición de la misma; de proteínas que absorban la luz

UV; o de las diferencias en la estructura de los ácidos nucleicos. A su vez, la sensibilidad a la luz UV está fuertemente relacionada con la habilidad que posea el microorganismo para reparar el daño causado por la radiación ultravioleta (Koutchma, 2009). También diferencias entre especies y dentro de la misma, dependiendo de la cepa, el medio de crecimiento, el estado del cultivo (Chang y col., 1985), 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, se suponen 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; 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.

#### 1.8.1.5- Fenómeno de reactivación

La mayoría de los microorganismos que tienen un sistema metabólico funcional poseen diversos mecanismos de reparación de los ácidos nucleicos dañados (Jagger, 1967) que se realiza mediante luz visible u oscuridad. La reparación que utiliza la luz se conoce bajo la denominación **fotorreparación** ó **fotorreactivación** y requiere exposición a la luz visible, concretamente a longitudes de onda en el rango de 330-480 nm. Ocurre mediante la acción de la enzima fotoliasa, la cual debe activarse en el UV cercano ó 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 Barbosa-Cánovas, 2004).

El otro mecanismo de reparación ocurre en oscuridad total. Se refiere a la capacidad de reparación del ADN 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 Barbosa-Cánovas, 2004).

#### **1.8.1.6- Cuantificación de la luz ultravioleta**

Cuando se quiere evaluar la intensidad de luz emitida por una lámpara UV generalmente se utiliza la irradiancia o tasa de fluencia.

La irradiancia es definida como la potencia de radiación total incidente que llega de todas direcciones a un elemento de superficie. En el Sistema Internacional sus unidades son  $W/m^2$ .

La tasa de fluencia es definida como la potencia de radiación total incidente que llega de todas direcciones a una esfera pequeña, el término es apropiado, por ejemplo, cuando un microorganismo está siendo irradiado con luz UV que proviene de diferentes direcciones (Bolton, 2003). Sus unidades al igual que la irradiancia son  $W/m^2$ .

El término “dosis de UV” es utilizado universalmente en la literatura y se obtiene multiplicando la irradiancia o tasa de fluencia, si se mantienen constantes, por el tiempo de exposición a la radiación (Joules). Sin embargo, la dosis de UV, es un término que en otros contextos es usado para describir la energía total absorbida. En el caso de los microorganismos casi toda la luz ultravioleta incidente pasa a través del organismo y sólo un porcentaje es absorbido. El término fluencia es más apropiado ya que se relaciona con la energía UV incidente en vez de la energía UV absorbida (Bolton, 2003).

Sin embargo en esta tesis, como se usa comúnmente, se utilizará el término dosis de UV para referirse a la luz ultravioleta incidente sobre la muestra, expresada en  $J/m^2$ .

Para determinar la energía emitida por una lámpara de UV hay diferentes métodos de medición, uno se basa en una reacción química con un par de

reactivos, los más utilizados son el par actinométrico yoduro-yodato (Rhan, 1997), que generan un compuesto coloreado, al cual se le mide la absorbancia mediante espectrofotómetro y aplicando una secuencia de cálculos explicado en **Materiales y Métodos, apartado 3.8.1.2**, se llega a obtener la dosis de energía emitida por unidad de área. Otro de los métodos es la utilización de un equipo, el radiómetro, que consta de un sensor en el que pega el haz de luz emitido por la lámpara UV y este transforma la señal en una medida de potencia. Ambos métodos son igualmente efectivos. La ventaja del radiómetro es su fácil manejo y rápida obtención de los datos, mientras que la mayor ventaja del método actinométrico es su bajo costo.

#### **1.8.1.7- 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 y col., 2000). La penetración en un líquido depende de la naturaleza del mismo: 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 las moléculas de ADN, las proteínas y las bases también absorben la luz ultravioleta.

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 la reactivación que pueden presentar los microorganismos tras una exposición subletal a radiación ultravioleta (véase ítem **1.8.1.4**).

### **1.8.2- Peróxido de hidrógeno en preservación de alimentos**

Generalmente el desinfectante más utilizado para la sanitización de frutas y vegetales mínimamente procesados ha sido el cloro. Sin embargo, su efectividad está limitada a ciertos productos, ya que algunos constituyentes de los alimentos pueden reaccionar con el cloro y formar un producto potencialmente tóxico. Por esta razón la seguridad del cloro para ser usado en alimentos y tratamiento de aguas ha sido cuestionado y se comenzó a buscar otros reactivos alternativos para la sanitización inocua de alimentos, como el ozono (Crowe y col., 2007), fosfato trisódico (Zuang y Beuchat, 1996) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Sapers y Sites, 2003).

El peróxido de hidrógeno fue descubierto en 1818 por Louis Jacques Thenard, quien lo llamó "agua oxigenada". Sin embargo, fue Richardson (1858) quien propuso utilizarlo como desinfectante.

El uso del peróxido de hidrógeno para sanitizar algunos alimentos como la leche, no fue en general aceptado por las agencias regulatorias porque era percibido como adulteración del alimento. Pero ha habido con los años una tendencia a re-examinar este punto de vista, ya que por su baja toxicidad creció su popularidad y usos en alimentos, cosmética, y en el campo de la medicina. El vapor del  $H_2O_2$  también se ha comenzado a utilizar como agente esterilizante de equipamiento médico (Klapes y Vesley, 1990) y suministros para sistema de packaging aséptico (Wang y Toledo, 1986).

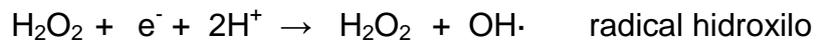
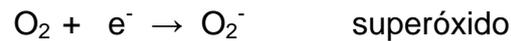
### 1.8.2.1- Mecanismo de acción del peróxido de hidrógeno

Las propiedades antimicrobianas del  $\text{H}_2\text{O}_2$  son conocidas desde hace mucho tiempo, y es efectiva contra un amplio espectro de microorganismos como bacterias, levaduras, hongos, virus y organismos formadores de esporas.

Existen numerosas teorías sobre el mecanismo de acción que posee el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Pero la teoría que más prevalece es que la producción de radicales hidroxilos, un potente oxidante, es principalmente el responsable de la destrucción de las células microbianas. Estos radicales son formados durante la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$ :



Otro camino por el cual el  $\text{H}_2\text{O}_2$  forma radicales hidroxilos es mediante el anión superóxido:



Los radicales hidroxilos son altamente reactivos y pueden causar daños en el ADN, membranas lipídicas, y proteínas de las células microbianas.

### 1.8.2.2- Factores que afectan la actividad del peróxido de hidrógeno

Como la mayoría de los antimicrobianos, la aplicación de diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , afectan en distinto grado a los microorganismos. Concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  entre 0,001% y 0,1% a temperatura ambiente pueden inhibir el crecimiento de bacterias y hongos, es decir que actúa como bacteriostático, mientras que concentraciones mayores al 0,1% actúan como bactericida matando a bacterias y hongos. Así mismo distintos microorganismos muestran una resistencia variada a la misma concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Con respecto al pH, cambios en este, afectan la actividad antimicrobiana del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se obtiene una mayor actividad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un rango de pH ácido, a medida que el pH se va haciendo alcalino, la actividad se mantiene pero en menor grado y se necesita para que sea igual de efectivo, una mayor concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o mayor tiempo de contacto con la solución (Baldry, 1983).

La temperatura también posee un pronunciado efecto en la actividad antimicrobiana del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A altas temperaturas de operación se necesita menor concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o menor tiempo de contacto con la solución para obtener el mismo efecto.

### **1.8.2.3- Aplicaciones en la industria alimenticia**

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha sido clasificado como sustancia GRAS (generalmente reconocida como segura) para ser usado en productos alimenticios como agente blanqueador, oxidante y reductor y como agente antimicrobiano. Se ha evaluado la utilización del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para sanitizar huevos (Padron, 1995) y también testeado aplicándolo en microaerosol en la erradicación de bacterias patógenas en criaderos y gallineros (Neighbor y col., 1994). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un bactericida aprobado en los Estados Unidos desde hace más de dos décadas en el procesamiento de leche que se utilizará en ciertas variedades de queso (Kleyn, 1985). Además en ciertas preparaciones en donde el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es el componente activo está siendo usado como desinfectante de frutas y vegetales (Falik y col., 1994).

### **1.9- Tecnologías combinadas de preservación**

La estabilidad microbiológica y la calidad sensorial de la mayoría de los alimentos, están basados en la combinación de factores de preservación. Esto es cierto, tanto para alimentos tradicionales con factores empíricos inherentes, como para productos nuevos para los cuales se han seleccionado racionalmente los factores de estrés y se han aplicado intencionalmente (Alzamora y col., 2000).

El objetivo de las tecnologías de obstáculos es seleccionar y combinar factores de preservación o barreras de forma tal que la estabilidad y seguridad

microbiológica puedan ser garantizadas, reteniendo las características nutritivas y la aceptación sensorial (Leistner, 1992). Este método usa varias barreras que separadamente pueden no dar una adecuada preservación, pero que cuando se las combina pueden brindar la protección necesaria. Las barreras pueden incluir la disminución de la temperatura, pH o actividad de agua (por adición por ejemplo de NaCl o azúcares); el calentamiento mínimo; o la adición de antimicrobianos (Buchanan y Phillips, 1990; Leistner, 1992; Leistner, 1995). Para que este concepto sea aplicado exitosamente, es necesario cuantificar la influencia de los distintos factores sobre el crecimiento microbiano.

La aplicación de este concepto ha sido muy exitosa en los últimos años, dentro del conjunto de tecnologías de preservación de mínimo procesamiento, y ello ha sido posible debido a los grandes avances ocurridos en el conocimiento del modo de acción de los distintos factores de preservación y de su interacción en los microorganismos (Sajur, 1985; Alzamora y col., 1989; Guerrero y col., 1994; Rojas y col., 1994).

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

Como se comentó anteriormente, este concepto de combinación no sólo se aplica a la estabilidad microbiológica, sino que se hace extensivo a la calidad total. También desde el punto de vista microbiológico, el concepto se ha tornado más abarcativo y se refiere no sólo a la interferencia de la homeostasis por barreras sinérgicas o aditivas sobre un mismo microorganismo, sino a la

aplicación selectiva de factores de conservación que puedan ser efectivos contra un organismo específico o un grupo de microorganismos solamente. Es así, que en los últimos años, un gran número de publicaciones en la literatura internacional se refiere a la utilización de este concepto con distintas finalidades: optimizar tecnologías tradicionales; desarrollar nuevos productos y como medida de seguridad o “back-up” para asegurar la calidad microbiológica de alimentos mínimamente procesados (Alzamora, 1997).

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

## **1.10 - Herramientas en microbiología de alimentos**

Hoy en día existen diversos métodos matemáticos e instrumentales para ayudar a interpretar el comportamiento y los cambios estructurales que sufren los microorganismos frente a un dado factor de stress. En esta tesis se aplicó la microbiología predictiva y la técnica de citometría de flujo.

### **1.10.1- Microbiología predictiva**

Es necesario disponer de referencias cuantitativas sobre los efectos de los factores que atañen al crecimiento, la supervivencia o inactivación de los microorganismos patógenos y/o deteriorativos pertinentes para obtener datos confiables sobre la calidad del alimento, su vida útil y su seguridad. Para describir las interacciones entre varios factores de preservación cuando actúan en

combinación, se emplean los modelos matemáticos (Mc Meekin y col., 1993; Buchanan y Phillips, 1990; Peleg, 1997).

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 sobre 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 de reportes 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 el crecimiento bajo una combinación de condiciones que no fueron específicamente testeadas en el protocolo experimental (Whiting, 1995).

#### **1.10.1.1- Clasificación de los modelos matemáticos**

Se han propuesto varios esquemas para categorizar los modelos, uno de ellos propone dividirlos en modelos de crecimiento y modelos de inactivación/supervivencia. Dentro de cada categoría se subdividen en modelos primarios, secundarios y terciarios (Alzamora y col., 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, 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 muerte 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; etc. (Mc Meekin y col., 1993).

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

Los modelos terciarios son rutinas de software para computadora que convierten a los modelos primarios y secundarios en programas amigables. Estos programas pueden calcular las respuestas microbianas frente a condiciones que

no fueron evaluadas inicialmente, comparar el efecto de diferentes condiciones o contrastar el comportamiento de varios microorganismos, por lo que permiten elegir al microorganismo blanco de ataque en situaciones específicas de formulación-procesamiento de alimentos. Ejemplos de modelos terciarios son el “USDA Pathogen Modeling Program” realizado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, disponible gratuitamente en Internet (<http://www.arserrc.gov>) y el “Food Micromodel” avalado por el Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación del Reino Unido.

Las tendencias en microbiología predictiva hasta la fecha han seguido dos caminos: los modelos cinéticos, en donde se modelan y predicen importantes parámetros cinéticos del crecimiento o inactivación microbiana, tales como la fase lag, la velocidad y el alcance (límite) del crecimiento ó inactivación; y los modelos probabilísticos, en donde los modelos se construyen para predecir la “probabilidad” de que un evento ocurra, pero no proporciona información sobre la velocidad a la que se produce, como por ejemplo: la germinación de las esporas bacterianas o la producción y concentración de toxina bacteriana después de un período de incubación a tiempo fijo (Gibson y Hocking, 1997; López-Malo, 2000).

Dentro de los modelos cinéticos más utilizados se pueden mencionar al modelo de Gompertz, el de la raíz cuadrada, el modelo cardinal de Rosso, el de Baranyi, el modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull, etc.

#### **1.10.1.2- Validación de los modelos matemáticos**

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

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

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

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

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

### **1.10.1.3- Limitaciones de los modelos matemáticos**

- *Limitaciones estadísticas:* Con condiciones marginales de crecimiento, la variación entre los replicados aumenta. Se utilizan transformaciones matemáticas para homogeneizar las variaciones en los modelos. La transformación logarítmica de los parámetros en función del tiempo frecuentemente genera valores que se encuentran más cercanos a una distribución normal que si no se aplicara dicha transformación (Whiting, 1995).
- *Limitaciones biológicas:* Es importante especificar claramente los límites del modelo, es decir, para qué microorganismos puede aplicarse, qué factores, los rangos de cada factor y qué combinaciones de factores dan respuestas válidas. La presencia de factores inhibitorios adicionales en el alimento, que no fueron tenidos en cuenta en la construcción del modelo, lo invalidan debiendo ser muy cuidadoso en la interpretación de sus predicciones. La mayoría de los modelos predictivos no incluyen factores como el efecto del anión del acidulante o del antimicrobiano, o el efecto de otros humectantes diferentes al cloruro de sodio en la reducción del  $a_w$ , o la presencia de la flora competitiva cuando se aplica un modelo producido en medios de laboratorio al alimento real.

#### 1.10.1.4- Aplicaciones de los modelos microbianos

Los modelos microbianos son una herramienta muy valiosa para predecir el crecimiento o supervivencia de los microorganismos y en el planeamiento de la implementación de los programas de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP). Estos modelos han evolucionado rápidamente desde ser utilizados en los laboratorios de investigación básica a ser implementados por la industria y las agencias regulatorias. Los modelos son el medio para obtener rápidamente una estimación del comportamiento del microorganismo y son las guías para evaluar problemas potenciales. Sin embargo, los modelos no reemplazan completamente el testeo microbiológico y el juicio del microbiólogo experimentado (Buchanan, 1995).

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

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

- *Control de calidad:* los modelos pueden ayudar en el desarrollo de programas HACCP, mostrando qué condiciones permiten el crecimiento y supervivencia y de este modo, identificar los puntos críticos de control. Estimaciones cuantitativas del crecimiento microbiano a diferentes niveles de los factores composicionales o ambientales pueden indicar los rangos permitidos de dichos factores. Contribuyen en hacer más objetivas y consistentes las decisiones de re-procesamiento, utilización rápida o reciclado de un alimento o ingrediente sin esperar los resultados experimentales (Buchanan y Whiting, 1996).

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

pueden comparar las nuevas formulaciones con las viejas (Baranyi y Roberts, 1994).

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **1.10.1.5- 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 curvas de supervivencia de diversos microorganismos se observó un desvío de la linealidad mostrando una ligera curvatura/concavidad. Lo que resulta 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 procesamientos 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.

$$-dN/dt = kN \quad (1.1)$$

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 que 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 miembro de dicha población será:

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

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:

$$S(t) = \sum S_i(t) \quad (1.2)$$

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:

$$S(t) = \int_0^1 f[t, t_c(\varphi)] d\varphi \quad (1.3)$$

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

$$d \varphi / d t_c = b n t_c^{n-1} \exp (-b t_c^n) \quad (1.4)$$

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

$$\log S(t) = -b t^n \quad (1.5)$$

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

$$t_{cm} = [(n-1)/nb]^{1/n} \quad (1.6)$$

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

$$\bar{t}_c = \{\Gamma[(n+1)/n]\} / b^{1/n} \quad (1.7)$$

- **Varianza ( $\sigma_{tc}^2$ ):** es la varianza de la media

$$\sigma_{tc}^2 = \{\Gamma[(n+2)/n] - (\Gamma[(n+1)/n])^2\} / b^{2/n} \quad (1.8)$$

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

$$v_1 = \frac{[\Gamma(n+3/n)/b^{3/n}]}{[\Gamma(n+2/n)/b^{2/n}]^{3/2}} \quad (1.9)$$

### 1.10.2- Citometría de flujo

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

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

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

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

El haz que incide en la partícula es desviado en todas direcciones. La dispersión en ángulos cercanos a 0° es detectada por un fotodiodo colocado en la

misma dirección de la fuente luminosa. La magnitud de esta dispersión es directamente proporcional al tamaño celular y es la “dispersión hacia adelante” en inglés “Forward Scatter” (FSC). La luz desviada lateralmente y detectada por un fotomultiplicador colocado en ángulos próximos a 90° está relacionada con la complejidad interna o granularidad celular. Este parámetro es la “dispersión angular”, en inglés “Side Scatter” (SSC) (Hewitt y Nebe Von Caron, 2004), (**Figura 1.10.1**).

Además si la partícula ha sido teñida con algún colorante, se adiciona la información proveniente de la excitación de éste, pudiéndose estudiar otras características celulares por la intensidad de la luz emitida.

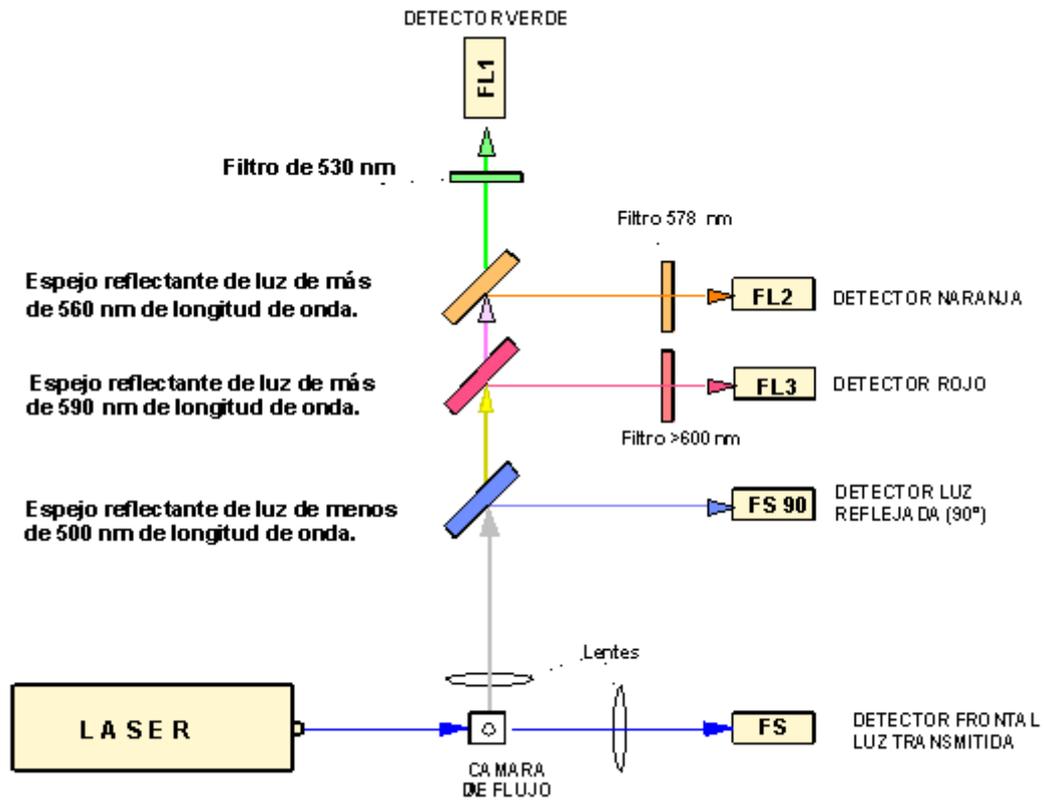
La elección del fluorocromo depende de:

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

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

**Figura 1.10.1** a) Diagrama de los dispositivos de detección de un citómetro de flujo. b) Citómetro de flujo.

a)



b)



## 1.11- Estudio de color en los alimentos

Los caracteres organolépticos de los alimentos pueden analizarse a través de las propiedades sensoriales de textura, apariencia y flavor (conjunción de aroma y sabor). El color es, en los alimentos, un factor determinante de la apariencia. Es un importante atributo sensorial, cuya percepción suele constituir el primer paso en la evaluación de los alimentos por parte del consumidor y es condicionante de su elección. Esto es así, debido a que el consumidor no puede evaluar la calidad microbiológica y nutricional de forma inmediata (Hutchings, 2002).

El color es indicativo de la calidad del producto, ya que pone de manifiesto numerosas reacciones de deterioro, las cuales generan pigmentos marrones, dando un aspecto desagradable al producto y alterando su calidad nutricional. La calidad nutricional se ve afectada, debido a que estas reacciones requieren de la participación de azúcares, compuestos nitrogenados y vitaminas. Estos reaccionan generando nuevos compuestos sin valor nutricional (Hutchings, 2002).

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

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

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

Cuando la luz encuentra interfases, ocurre difusión (scattering, en el habla inglesa). Las partículas dispersas en un medio continuo originan múltiples refracciones y reflexiones que esparcen la luz en todas direcciones. Por eso, cuando el tamaño de partícula es pequeño, se absorbe menos luz durante el pasaje de cada partícula y, al mismo tiempo, la superficie total de interacción luz-material es mayor, dando lugar a mayor sensación de claridad (Westland, 2002).

Los principios fundamentales de la colorimetría están basados en las tres leyes de Grassman; de las cuales, la más importante establece que cualquier

color puede ser igualado por la suma de tres colores primarios en cantidades convenientes. Estos colores primarios deben ser elegidos de forma tal que sean independientes entre sí, es decir, ninguno puede ser obtenido por combinación de los otros dos. En la práctica, los colores primarios a utilizar en forma aditiva son tres: rojo, verde y azul. La suma de todos ellos produce la sensación de luz blanca o acromática (Lozano, 1978).

El color puede ser definido por los siguientes atributos:

- La *claridad* es el atributo que hace corresponder a cada color una equivalencia con respecto a una escala de grises. A la cualidad psicológica claridad le corresponde la magnitud psicofísica *luminosidad*.

- El *tono o matiz* es el atributo que adjudica al color una cualidad que se define como rojo, naranja, amarillo, verde, azul, púrpura o cualquier combinación de ellos. A la cualidad psicológica tono le corresponde la magnitud psicofísica *longitud de onda dominante*.

- La *saturación* es el atributo que, fijado el tono, describe al color por su similitud con un color espectral puro, cuanto más parecido a este, tanto más saturado. A la cualidad psicológica saturación le corresponde la magnitud psicofísica *pureza*.

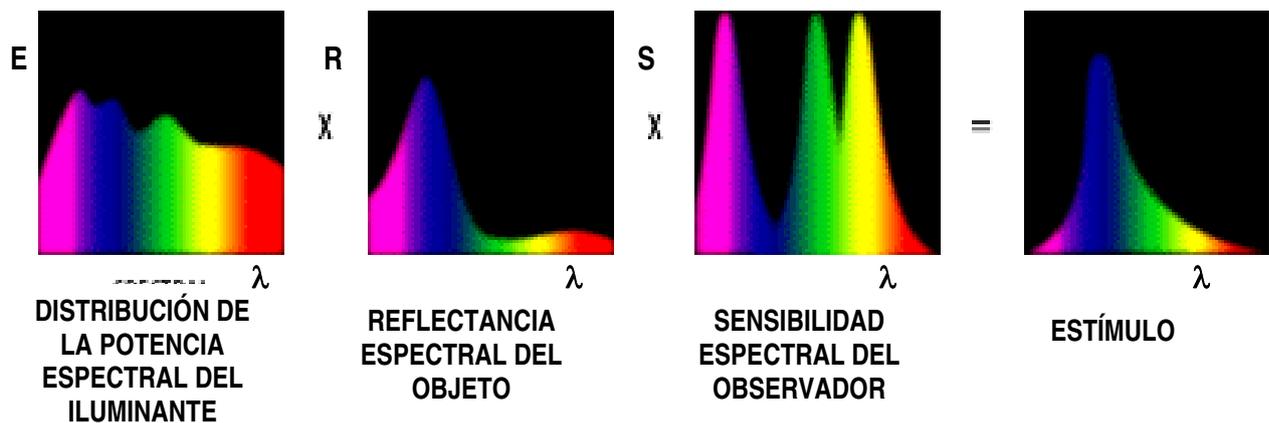
Una descripción cuantitativa de un color puede ser dada en los términos de los tres atributos del color mencionados previamente. El mecanismo psicofísico de visión del color da al observador humano la capacidad de apreciar los tres atributos o características del color. Sin embargo, el observador no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

La medida objetiva del color de un material puede obtenerse del análisis de su espectro visible, por transmisión o reflexión, obtenido con un espectrofotómetro. De los sistemas propuestos para la especificación del color el más difundido universalmente es el de la CIE (Comisión Internationale de l'Eclairage), en el cual el color es indicado por tres variables X, Y, Z, conocidas como los valores triestímulo y que representan a tres colores primarios imaginarios (relacionados con el verde, el rojo y el azul).

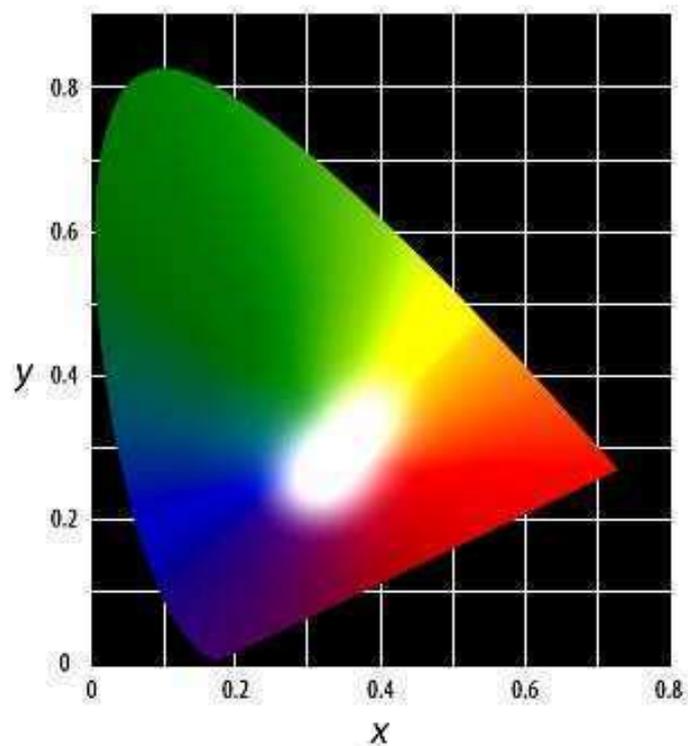
El cálculo necesario para obtener los valores triestímulo CIE para un objeto se esquematiza de la siguiente manera (**Figura 1.11.1 a**): El valor del estímulo

**Figura 1.11.1** a) Suma de radiaciones espectrales que conforman el estímulo o flujo radiante que percibe el observador (Buera, 2005), b) Diagrama Cromático CIE.

a)



b)



visual es la resultante de una combinación del espectro de la luz incidente ( $E$  vs  $\lambda$ ) con el espectro de la muestra ( $R$  vs  $\lambda$ ) y con las funciones de distribución de la sensibilidad del ojo para cada uno de los tres primarios imaginarios ( $S$  vs  $\lambda$ ). El área bajo la curva resultante se integra en el espacio visible para obtener los valores numéricos de la contribución de cada uno de los tres primarios ideales ( $X$ ,  $Y$ ,  $Z$ ) al color dado (Manresa González y Vicente, 2007).

El factor de transmitancia ó reflectancia espectral se obtiene mediante un espectrofotómetro, en el que se determina la luz transmitida ó reflejada para cada  $\lambda$ . La distribución energética para varios iluminantes es conocida, por ejemplo: el iluminante C tiene una distribución energética similar a la luz blanca solar (difusa, cielo cubierto). Otras de las variables a fijar es el ángulo del observador ó campo visual: cuando se miran objetos la información general proviene de ángulos de  $10^\circ$ - $20^\circ$ , pero cuando se observan detalles, el ángulo es de  $2^\circ$ ; en general, en colorimetría de alimentos se emplea éste último (Manresa González y Vicente, 2007). En los espectrofotómetros actuales este cálculo se realiza automáticamente por un sistema de computación acoplado al instrumento. De esta manera el color queda determinado por un punto en un espacio tridimensional de coordenadas  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$ . Sin embargo, la forma habitual de representación es calcular las llamadas coordenadas cromáticas  $x$ ,  $y$  definidas por:

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

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

El color definido por  $(x,y)$  se representa en el diagrama cromático CIE (**Figura 1.11.1.b**) donde sólo tiene lugar la cromaticidad del color en cuestión. Para que la especificación del color sea completa, eventualmente se utiliza la luminosidad  $Y$  como tercera coordenada, en un plano perpendicular que representa la propiedad de reflejar más ó menos luz. El plano de las coordenadas cromáticas está delimitado por una línea recta que une los extremos del espectro visible, conocida como línea de púrpuras (Kelly, 1943).

El espacio CIE 1931 es muy sencillo de manejar y es excelente para representar mezclas aditivas, pero no es homogéneo (distancias geométricas iguales no suelen representar diferencias de color iguales en la percepción por el ojo humano). Para subsanar el problema de su no uniformidad, se han desarrollado una serie de transformaciones del espacio CIE que permiten obtener mejores resultados en la evaluación de la diferencia de color. Así surgen las transformaciones CIELab (1974) y CIELuv (1976). El CIELuv es una transformación lineal del espacio cromático CIE, en cambio, líneas rectas en el espacio CIE corresponden a líneas curvas en el espacio CIELab. Es sencillo calcular las coordenadas cromáticas en estos sistemas a través de los valores triestímulo X, Y y Z, y viceversa.

### 1.11.1- Medición de color con espectrofotómetro de reflectancia

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

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

### 1.11.2- Funciones de color

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

En el espacio CIELab algunas funciones de color son las siguientes (Manresa González y Vicente, 2007):

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

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

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

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

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

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

La medición instrumental de los parámetros del espacio CIELab ha sido ampliamente utilizada para describir la evolución del color de un sin número de alimentos tales como miel (Pereyra González y col., 1999), puré de banana mínimamente procesado (Guerrero y col., 1994), kiwi osmóticamente deshidratado (Talens y col., 2002), cubos de pera (Clark y col., 2002), entre otros.

### 1.12- Análisis sensorial de alimentos

El análisis sensorial ha sido definido como una disciplina basada en el examen (evocación, medición, análisis e interpretación) de las propiedades organolépticas de un producto, realizado con los órganos de los sentidos.

Si bien los instrumentos son efectivos, en muchos casos, no pueden medir ni reemplazar la percepción sensorial. Por ejemplo, hay ingredientes y procesos que tienen un efecto sinérgico que no pueden medirse con un instrumento. En el momento que una porción de alimento se contempla, se huele y se introduce en la boca se desencadenan una serie de efectos que están relacionados entre sí y que dependen de la intensidad y calidad del estímulo que los provoca, de las características de los receptores sensoriales y de la atención y conocimientos básicos del individuo. El éxito depende de la proximidad lograda entre el estímulo y la respuesta dada por el individuo a la sensación percibida. Cuando una producción está bien definida, tanto en términos instrumentales como sensoriales,

la calidad de un producto es más completa, tendiendo a los modernos conceptos de la calidad total (Lawless y Heymann, 1999).

Cuando se utiliza a las personas como instrumento de medida, es necesario controlar todas las condiciones de las pruebas a realizar para evitar los errores causados por factores fisiológicos, psicológicos y culturales por parte del sujeto; factores ambientales que puedan alterar el juicio por parte del sujeto y factores inherentes al alimento (por ejemplo: intensidad del estímulo inferior a la sensibilidad del individuo). Cuando se habla de error no se habla precisamente de un juicio equivocado sino que se incluye a todos los factores antes mencionados. Para que el análisis sensorial sea considerado como una técnica de análisis se exigen otros requisitos (Costell, 2002):

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

#### **1.12.1- Jueces**

Son los sujetos que llevan a cabo la rutina de evaluación sensorial, es decir, el instrumento de medida. Son seleccionados y entrenados o no, dependiendo del tipo de pruebas y producto a evaluar. El Comité de Evaluación Sensorial perteneciente a la Sociedad Americana para el Análisis de Materiales (ASTM, 1968) los ha clasificado en tres subgrupos:

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

- *Panel semientrenado*: constituido por personas familiarizadas con los atributos del producto que van a evaluar. Este panel es capaz de discriminar diferencias, medir intensidad de atributos en escalas y evaluar globalmente al producto. Tienen un lenguaje menos formal que el panel entrenado. La variabilidad individual puede balancearse considerando un mayor número de panelistas (25 a 40 miembros).
- *Panel de consumidores*: no tienen ningún tipo de entrenamiento, se eligen al azar teniendo en cuenta que sean consumidores del producto que van a evaluar. Son ideales para evaluar la aceptabilidad de un producto pudiendo también evaluar la intensidad de atributos en escalas simples siguiendo determinadas consignas en la elaboración del formulario.

### **1.12.2- Selección del panel**

No existen reglas fijas en cuanto a las pruebas y criterios de selección. Fundamentalmente dependerá del tipo de trabajo que se espera del panelista. En general, se reclutan tres veces más candidatos de los que se van a precisar. Esto se debe a la necesidad de tener personas suplentes y además porque los participantes que son seleccionados para una prueba no necesariamente serán buenos para otra.

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

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

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

### **1.12.3- Selección del sitio de la prueba**

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

- Pruebas de laboratorio
- Pruebas de locación central (puesto de prueba)
- Pruebas domiciliarias

### **1.12.4- Pruebas de laboratorio: sala de prueba**

Condiciones ambientales no adecuadas pueden ser causa de distorsión de las respuestas, es por eso que la sala ideal es aquella que no llama la atención en ningún sentido a los jueces. La iluminación insuficiente, los ruidos de cualquier tipo, la existencia de olores ambientales, así como una temperatura demasiado alta o baja, son causa indirecta de una mala calificación de las sensaciones. A esta deberán añadirse otras como la incomodidad de las cabinas, que pudiera provocar irritación o claustrofobia, así como también la falta de eficacia de la persona que sirve las muestras. Los requisitos que debe reunir una sala de análisis sensorial están normalizados hasta en los mínimos aspectos (Norma UNE 87-004, 1979). Así mismo, se debe evitar que los sujetos interactúen introduciendo errores de apreciación por distracción. Existen, sin embargo pruebas especiales descriptivas donde un grupo reducido de personas entrenadas evalúan y discuten en conjunto, en una mesa redonda los atributos de las muestras.

### **1.12.5- Clasificación de las pruebas de evaluación sensorial**

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

- *Pruebas discriminativas:* se desea determinar si dos muestras son perceptiblemente diferentes. Dos muestras pueden tener formulación químicamente diferente y el ser humano puede no ser capaz de percibir esa diferencia, por ejemplo cuando se sustituye un ingrediente. Dentro de este grupo se encuentran las siguientes pruebas: Test del triángulo; Duo ó trío; Test de comparación pareada; diferencia contra control; test “A”-“no A”; etc.
- *Pruebas descriptivas:* describen detallada y objetivamente al producto en términos de sus atributos y/o defectos sensoriales. Permite obtener una descripción completa del producto, ayuda a identificar ingredientes y variables de proceso, y/o determinar que atributos sensoriales son importantes para su aceptación. La intensidad con que se manifiesta cada atributo se expresa por un valor asignado a una escala de medida.

Para realizar un test descriptivo se pueden utilizar métodos ya normalizados (análisis descriptivo cuantitativo (QDA), perfil de flavor, perfil de textura, perfil libre, método SPECTRUM<sup>®</sup>, etc.) o bien puede ser diseñado teniendo en cuenta la información que se quiere obtener (Cartier y col., 2006). Son ideales para estudios de vida útil, control de calidad, desarrollo de productos, etc. Emplea fundamentalmente panelistas entrenados y semientrenados.

- *Pruebas Afectivas:* el objetivo primario en este tipo de pruebas es evaluar la aceptabilidad global o preferencia de un producto. Las pruebas afectivas más comunes utilizan escalas hedónicas. El término “hedónico” hace referencia al agrado o desagrado que una muestra provoca al probarla o bien observarla. La opinión del participante se vuelca en una escala de categorías (usualmente de nueve puntos), las cuales determinan los distintos grados de placer en orden progresivo desde, por ejemplo *-me gusta muchísimo-* a *-me desagrada absolutamente-*. Las pruebas afectivas siguen, en general a estudios discriminativos y /o descriptivos y son previas a un estudio de mercado. Emplean consumidores del producto que se ha de evaluar.

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

### 1.12.5.1- Pruebas discriminativas

- **Prueba de diferencia contra control**

Los objetivos de esta prueba consisten en determinar si existe diferencia entre una o más muestras y el control, y estimar el tamaño de dicha diferencia. Se presenta a los participantes una muestra control de referencia, identificada como tal, y una o varias muestras (una de las cuales puede ser un control camuflado), a ser comparadas con la referencia. El juez debe indicar el tamaño de dicha diferencia generalmente, en una escala de categorías desde “ninguna diferencia” a “diferencia muy grande”. A cada categoría se le asignará un número y los resultados totales para cada muestra serán analizados por el método de análisis de varianza (ANOVA).

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

Esta prueba es útil en situaciones en las cuales puede haber una diferencia detectable, pero el tamaño de esa diferencia es el que afecta la toma de una decisión, como por ejemplo, en estudios de vida útil o control de calidad de un producto (Meilgaard y col., 1999).

### 1.12.5.2- Pruebas afectivas

- **Test de aceptabilidad**

El test de aceptabilidad más común es *la escala hedónica*. La misma es una escala de 9 puntos y se basa en la respuesta del consumidor de gusto o disgusto de un determinado producto. En este test se presenta a los consumidores una muestra, en la que deberán evaluar la impresión global y volcar su juicio en una planilla, como se mencionó anteriormente, de 9 puntos desde “me gusta extremadamente” hasta “me disgusta extremadamente”. Estos ensayos son útiles para diagnosticar problemas imperceptibles en laboratorio antes de investigaciones de mercado más costosas y debido a que los tests se realizan con

consumidores “blanco”, hacia quienes está dirigido el producto, la información que surge es sustentable y valorable en defensa de sus competidores (Lawless y Heymann, 1999).

### 1.12.5.3- Análisis sensorial de textura

La textura es la manifestación sensorial y funcional de las propiedades estructurales, mecánicas y de superficie de los alimentos detectados a través de la visión, oído, tacto y kinestésicos. Es un atributo multiparamétrico descrito por una gran cantidad de términos, la cual se clasifican en ciertas categorías o escalas, dependiendo de la característica que se quiere resaltar. Algunas características primarias son la dureza, la cohesividad, la jugosidad, etc. Y secundarias son la fracturabilidad, la masticabilidad, gomosidad, etc (Szczesniak, 2002).

El análisis de textura fue definido como el análisis sensorial del *complejo textura* en un alimento en términos de sus características mecánicas, geométricas, grasas y de humedad, el grado de las mismas y el orden en que aparecen desde la primer mordida hasta la masticación completa. La percepción sensorial de la textura es un proceso dinámico con respecto a fuerza, tiempo, temperatura e influencia de saliva. Estos principios ganaron con el tiempo aceptación generalizada.

Existen diversas metodologías descriptivas para medir la textura. Una de las más difundidas es el *Perfil de Textura* (Brandt y col., 1963; Civille y Szczesniak, 1973). Se les presenta a los jueces una escala determinada para marcar algún atributo, junto con anclas que son alimentos característicos de la escala, en ella, deben marcar la magnitud con la cual percibieron el atributo de textura. Las escalas utilizadas hoy en día están ampliamente aceptadas en cuanto a su tipo. En general se utilizan escalas de 10 cm ó de 15 cm de longitud con anclas ubicadas a 1,5 cm de los extremos de izquierda a derecha e intensidad creciente del descriptor. Se puede acompañar de marcas que representan a los alimentos de referencia para facilitar así la tarea de los jueces. El juez deberá realizar una marca en el punto que mejor refleje su opinión acerca de la intensidad de la modalidad sensorial evaluada. La distancia de la marca es medida y se traduce en un número que luego se computa. Esta metodología se realiza con un panel

entrenado dado la dificultad que representa tratar de asociar cada estímulo de la muestra con la modalidad sensorial afectada, calificarla y finalmente cuantificarla en una escala. Hace falta un gran discernimiento, adquirido mediante entrenamiento, para poder expresar de un modo inteligente una intensidad de un atributo sensorial. Durante el entrenamiento, los jueces son expuestos a los alimentos que representan distintos puntos de la escala de una dada modalidad o atributo sensorial (dureza; jugosidad; cohesividad; etc.). Reconocen que punto representa de la escala cada uno de ellos e incorporan dicho conocimiento. Una vez concluido el entrenamiento, que podrá ser mas ó menos largo de acuerdo a si la metodología seleccionada es más o menos flexible, los jueces serán capaces de medir la intensidad de una dada modalidad sensorial en una muestra con ayuda o no de alimentos de referencia de la escala. La metodología de perfil de textura, si bien resulta de extrema utilidad presenta el inconveniente de la adaptación de los alimentos de referencia a una escala de aplicación local. Esta adaptación requiere de numerosas pruebas y de la interacción entre el panel y el coordinador para encontrar las dificultades en la escala planteada (Meilgaard y col., 1999; Lawless y Heymann, 1999).



# Objetivos

## 2.1- Objetivo General

La preservación de alimentos tiende cada vez más hacia la formulación y empleo racional de los factores de estrés en combinación, interfiriendo con los mecanismos homeostáticos activos de las células vegetativas y pasivos de las esporas de una forma cooperativa o sinérgica. Si el proceso de conservación involucra la interferencia multiobjetivo de la homeostasis microbiana, los requerimientos o niveles de los distintos factores de estrés serán menores que los necesarios cuando se usan en forma aislada y por lo tanto se logrará un menor daño en la calidad total del alimento. Estas técnicas de procesamiento mínimo basadas en la combinación de factores emergentes y/o factores convencionales de estrés microbiano, 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.

El objetivo general de este trabajo reside en evaluar cuantitativamente la eficiencia de la aplicación de luz ultravioleta sola y/o combinada con la utilización de otros factores de stress microbianos no convencionales, como el peróxido de hidrógeno en tratamientos multifactoriales para inhibir y/o inactivar microorganismos patógenos y deteriorativos de derivados frutales con miras a:

- (a) reducir la intensidad de los tratamientos convencionales de conservación y/o
- (b) desarrollar tecnologías de procesamiento mínimo, con reducido impacto en la calidad sensorial y económicamente beneficiosas.

## 2.2- Objetivos específicos

- Instalación y puesta a punto de metodologías y calibración del equipo de luz ultravioleta de onda corta y de la técnica de decontaminación con peróxido de hidrógeno. Selección de la matriz frutícola a utilizar.
  
- Evaluar la efectividad de los factores emergentes seleccionados (Luz UV-C, decontaminación con peróxido de hidrógeno) utilizados en forma individual para inactivar/inhibir células vegetativas de microorganismos

representativos de enfermedades relacionadas con el consumo de frutas y/o deteriorativos, con el objeto de obtener productos frutícolas microbiológicamente estables.

- Modelar y validar la cinética de inactivación/crecimiento de microorganismos claves tratados con luz ultravioleta en alimentos frutícolas utilizando como herramienta fundamental a la microbiología predictiva.
- Caracterizar la interacción (aditiva, sinérgica o antagónica) de los factores emergentes utilizados. Estudiar dicha caracterización para las diferentes modalidades de aplicación de las tecnologías emergentes (en simultáneo, en serie).
- Diseñar algunos procesos combinados de conservación para obtener derivados frutales similares a los frescos en base a la integración de los resultados previos, seleccionando entre las combinaciones aquellas que desde el punto de vista microbiológico impliquen menor deterioro en la calidad y que sean factibles de implementar a nivel industrial.
- Analizar los daños estructurales causados a los microorganismos por la aplicación de las mencionadas tecnologías mediante la aplicación de la técnica de citometría de flujo y la observación en microscopio electrónico de transmisión.
- Evaluar las modificaciones en la flora nativa y los aspectos sensoriales, y de color producidos por los tratamientos propuestos para productos frutales preservados por la/s tecnología/s propuesta/s.



# **Materiales y Métodos**

### 3.1- Materia prima

Para el presente estudio se utilizaron peras (*Pyrus communis*) variedad *William's*, las cuales poseían un pH de 4,0 – 4,2 y sólidos solubles entre 12,7 – 13,8 ° Brix, y manzanas (*Malus pumila*) variedad *Granny Smith* de pH~3,6 y entre 11,6 – 12 ° Brix, adquiridas en el mercado local. Antes del procesamiento de las mismas se decontaminaron externamente colocándolas en hipoclorito de sodio al 1% por 1 minuto, se enjuagaron con agua destilada, se secaron con papel absorbente y se dejaron para terminar de secar en una cabina de seguridad biológica tipo II (Nuair Inc., USA) (**Figura 3.1**) por 20 min con luz UV.

Las rodajas se obtuvieron utilizando un sacabocado cilíndrico de acero inoxidable, especialmente diseñado para este estudio, dentro de la cabina de seguridad biológica las mismas se cortaron de  $3\pm 1$  mm de espesor y 30 mm de diámetro. La rodaja frutal con piel se obtuvo pasando la superficie de la fruta por el cortante y posteriormente con el sacabocado se obtuvo la rodaja del diámetro deseado. La rodaja frutal sin piel se obtuvo a partir de las rodajas interiores del fruto.

Para los estudios de flora nativa las rodajas se obtuvieron de la misma manera excepto que ni los utensilios ni la fruta fueron sanitizados.

### 3.2- Reactivos

- Extracto de levadura (Laboratorios Britania, Argentina)
- Ioduro de propidio, IP (sigma, USA)
- Fluoresceína diacetato, FDA (Calbiochem, USA)
- Iodato de potasio (Laboratorios Cicarelli, Argentina)
- Ioduro de potasio (Laboratorios Cicarelli, Argentina)
- Borato de sodio (Laboratorios Cicarelli, Argentina)
- Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Laboratorios Anedra, Argentina)

**Figura 3.1** Cabina de seguridad biológica, con los utensilios utilizados para el procesamiento de la fruta.



- Sodio fosfato dibásico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Laboratorios Anedra, Argentina).
- Sodio tiosulfato pentahidrato ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) (Laboratorios Anedra, Argentina)
- Ácido cítrico pentahidrato (Laboratorios Anedra, Argentina)
- Potasio fosfato monobásico anhidro ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Laboratorios Anedra, Argentina)
- Hidróxido de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Buffer fosfato salino Dulbecco (BFS) (Laboratorios Microvet, Argentina)
- Lactato de calcio (Saporiti S.A., Argentina)
- Cloruro de calcio ( $\text{Cl}_2\text{Ca}$ ) (Saporiti S.A., Argentina)
- Ácido ascórbico (Química Oeste S.A., Argentina)

### 3.3- Medios de cultivo

- Agar Tripteína Soja (ATS-E) (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), composición (g/L): tripteína 15; peptona de soja 5; cloruro de sodio 5; agar 15; extracto de levadura 6; pH del medio preparado:  $7,3 \pm 0,2$ .
- Caldo Tripteína Soja (CTS-E) (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), composición (g/L): tripteína 17; peptona de soja 3; cloruro de sodio 5; fosfato dipotásico 2,5; glucosa 2,5; extracto de levadura 6; pH del medio preparado:  $7,3 \pm 0,2$ .
- Agua Peptona bufferada (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), composición (g/L): peptona 10; cloruro de sodio 5; fosfato disódico 3,5; fosfato monopotásico 1,5; pH del medio preparado:  $7,2 \pm 0,2$ .
- 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 Extracto de Levadura-Glucosa-Cloramfenicol (YGC) (Merck, Darmstadt, Alemania), composición (g/L): extracto de levadura 5; D-(+) glucosa 20; cloramfenicol 0,1; agar-agar 14,9; pH del medio preparado:  $6,6 \pm 0,2$ .
- Agar Suero de Naranja (OSA) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), composición (g/L): triptona 10; extracto de levadura 3; jugo de naranja (equivalente sólido) 3,5; glucosa 4; fosfato dipotásico 2,5; agar 14; pH del medio preparado:  $5,5 \pm 0,2$ .
- Caldo Sabouraud dextrosa (CSD) (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia), composición (g/L): triptona 5; peptona de carne 5; glucosa 20; pH del medio preparado:  $5,7 \pm 0,2$ .

- Agar Sabouraud dextrosa (Sab) (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia), composición (g/L): peptona de carne 10; glucosa 35; agar bacteriológico 15; pH del medio preparado:  $5,7 \pm 0,2$ .

### 3.4- Microorganismos

En los estudios de inactivación se utilizaron inóculos simples de *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114D, *Escherichia coli* ATCC 11229; *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256. También se utilizaron inóculos mixtos compuestos por:

- 1- *Listeria monocytogenes* ATCC 19114D, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644
- 2- *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria innocua* CIP 8011, *Listeria welshimeri* BE 313/01
- 3- *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256, *Zygosaccharomyces rouxii* ATCC 52519, *Debaryomyces hansenii* NRRL 7268

Para los estudios de citometría de flujo, se utilizaron *Saccharomyces cerevisiae* KE162, *Listeria innocua* ATCC 33090 y *Escherichia coli* ATCC 11229. Todas las cepas fueron provistas por Medica-Tec SRL, Argentina. Las mismas se sembraron en estrías de ATS-E para bacterias y agar Sabouraud para levaduras y se incubaron a 37°C y 27 °C, respectivamente por 24 hs, almacenando luego las estrías a 4 °C para su posterior utilización.

### 3.5- Preparación del inóculo

Los inóculos se prepararon transfiriendo dos ansadas del cultivo en estría a un erlenmeyer conteniendo 20 mL de CTS-E ó CSD. Los mismos se incubaron a 37°C y 27°C respectivamente durante 24 horas y luego se realizaron los ensayos correspondientes.

Para la obtención de inóculos mixtos, los inóculos simple se hicieron crecer en CTS-E (para las bacterias) y en CSD (para las levaduras) por 24 hs a 37°C y

27°C respectivamente, e iguales alícuotas de cada inóculo simple fueron transferidos a un tubo con agua de peptona, volumen final 10 mL.

### **3.6- Determinación de pH y sólidos solubles**

El pH de las frutas 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).

### **3.7- Enumeración de microorganismos supervivientes**

El recuento de los microorganismos viables luego de los distintos tratamientos se determinó por la técnica de dilución seriada con siembra en superficie (por duplicado) y/o en profundidad (por cuadruplicado). El recuento de colonias se realizó con un contador automático (COMECTA S.A., Barcelona, España).

### **3.8- Estudios de inactivación**

#### **3.8.1- Tratamientos con luz ultravioleta de onda corta**

##### **3.8.1.1- Descripción del equipo**

El dispositivo utilizado consistió en una cabina provista con 2 lámparas UV-C (lámpara germicida TUV-15W G13 T8 55V, Philips, Holanda) colocadas en posición horizontal dentro de una caja de madera herméticamente cerrada, como muestra la **Figura 3.8.1**, con un estante de madera ubicado a 10 cm de distancia de las lámparas y un sistema de ventilación apropiado con el propósito de evitar el aumento de temperatura de las muestras durante el tiempo de irradiación.

### 3.8.1.2- Determinación de la dosis UV-C

#### A- Medición de la dosis por actinometría

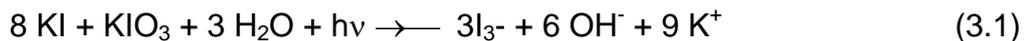
Es posible utilizar la actinometría para estimar la cantidad de energía disponible en una exposición del alimento a radiación UV-C. La actinometría es la cuantificación de la energía de la luz UV a través de la generación de reacciones fotoquímicas a partir de diversos actinómetros químicos.

Para determinar la intensidad de la radiación emitida, se utilizó el par actinométrico yoduro de potasio - iodato de potasio (Rhan, 1997).

Para eso se preparó una solución de yoduro de potasio (0,6 M) y iodato de potasio (0,1 M) en buffer borato (0,01 M), pH 9,25. De la solución se tomaron alícuotas de 20 mL que se colocaron en una placa de petri de 9 cm de diámetro con el borde recubierto, para evitar la incidencia de la luz UV por los costados. Las placas se colocaron de a una durante 1 a 5 min dentro de la cabina.

La solución formada se coloca en un espectrofotómetro UV/visible (Hewlett Packard 8453, Hanover, Alemania) a 352 nm. Dicha cuantificación se llevó a cabo mediante las siguientes expresiones:

Actinómetro Ioduro-Iodato:



Lambert-Beer:

$$\text{Abs}_{352} = \epsilon \cdot b \cdot C \quad (3.2)$$

$$\text{Moles I}_3 = \frac{\text{Abs}_{352} \times V(l)}{\epsilon \cdot b}$$

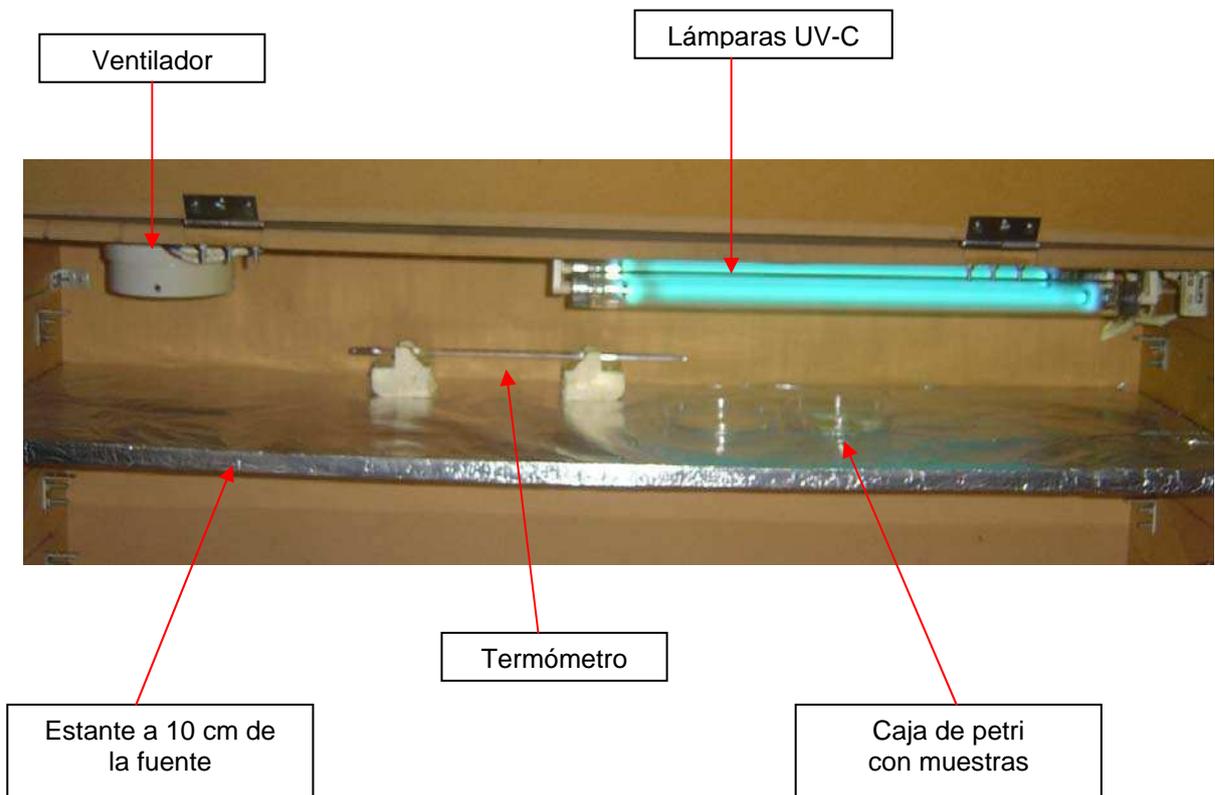
con  $\epsilon$ : 26.400 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>  
b: 1 cm

**Figura 3.8.1** a) Cabina de UV utilizada para la aplicación de los tratamientos, b) detalle de los componentes de la cabina UV.

a)



b)



$$N^{\circ}\text{Einstein (fotones absorbidos)} = \frac{\text{Mol } I_3}{QY} \quad (3.3)$$

siendo

$$QY = \text{umbral quantum} = 0,75 [1 + 0,02(T - 20,7) (1 + 0,23(C - 0,577))] \quad (3.4)$$

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

Entonces,

$$E \text{ (J)} = 4.72 \times 10^5 \text{ (J/einstein)} \cdot N^{\circ}\text{einstein} \quad (3.5)$$

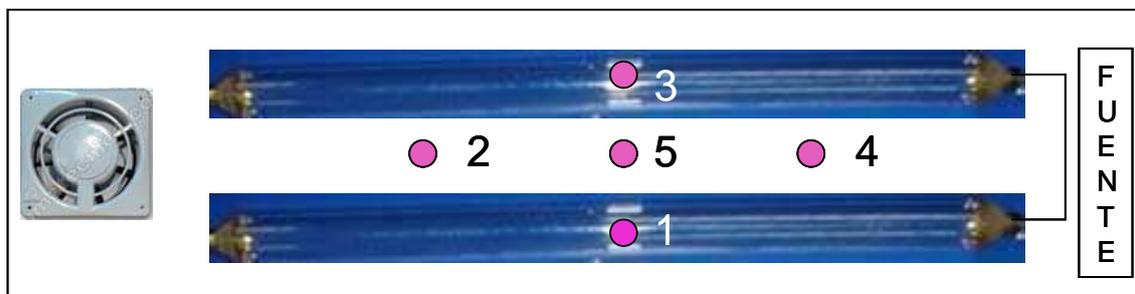
A partir de la absorbancia obtenida a 352 nm a los distintos tiempos de tratamiento, se utilizó el principio de Lambert-Beer (3.2) para calcular los moles de triioduro formados ( $I_3^-$ ). Obtenido este dato, se calcularon los números de fotones absorbidos o número Einstein (3.3) y el valor del umbral quantum (3.4) 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 (3.2) y el correspondiente coeficiente de absorptividad ( $\epsilon = 1,061 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). A partir de la ecuación 3.5 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 ( $\text{J}/\text{m}^2$ ).

A partir de los datos obtenidos se establece como tiempo final, el último tiempo para el cuál 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).

Como la radiación que recibe la muestra es ligeramente diferente dependiendo en que posición bajo la lámpara se colocan las rodajas, se llevó a cabo un estudio de las dosis que llega a la muestra en distintos puntos, señalados en la **Figura 3.8.2**.

**Figura 3.8.2** Vista superior de la cabina utilizada para irradiación UV. Puntos de muestreo del estante ubicado a 10 cm. de las lámparas de UV-C (1, 2, 3, 4 y 5).



### B- Medición de la dosis por radiometría

La intensidad de la radiación UV se comparó con datos adquiridos con un radiómetro (Broadband Power/energy meter 13 PEM 001, Melles Griot, USA), utilizando un sensor de  $0,78 \text{ cm}^2$  de área y  $0,5 \text{ cm}$  de radio. La posición bajo las lámparas de UV-C en la cual se tomaron los datos se esquematiza en la **Figura 3.8.2**.

#### 3.8.1.3- Procedimiento de inactivación por UV-C

A partir del inóculo obtenido según lo explicado en el **apartado 3.5** se sembró  $0,1 \text{ mL}$  en el centro de cada rodaja de fruta con o sin piel y con un

rastrillo se dispersó sobre toda la superficie, siempre trabajando en la cabina de seguridad biológica. Luego se llevó la muestra a la cabina que contiene las lámparas de UV y se colocó en la posición deseada por un tiempo determinado entre 1 y 20 minutos. Las experiencias se realizan por triplicado.

Una vez transcurrido el tiempo de irradiación las muestras se colocaron en una bolsa estéril (Whirl-Pack, Nasco, Wisconsin, USA) con 20 mL de agua de peptona estéril y se homogeneizó el sistema por 3 minutos en un destructor de muestra stomacher (AES Laboratoire, Comborug, Francia). La suspensión resultante fue analizada para el recuento de los microorganismos sobrevivientes utilizando la técnica de diluciones seriadas y plaqueo en superficie, por duplicado, en ATS-E ó Sab (**Figura 3.8.3**). Las placas de Petri se incubaron a 27°C ó 37°C según el microorganismo, durante 48 a 72 hs; los resultados se expresaron como UFC/g de fruta.

### **3.8.2- Tratamiento con peróxido de hidrógeno**

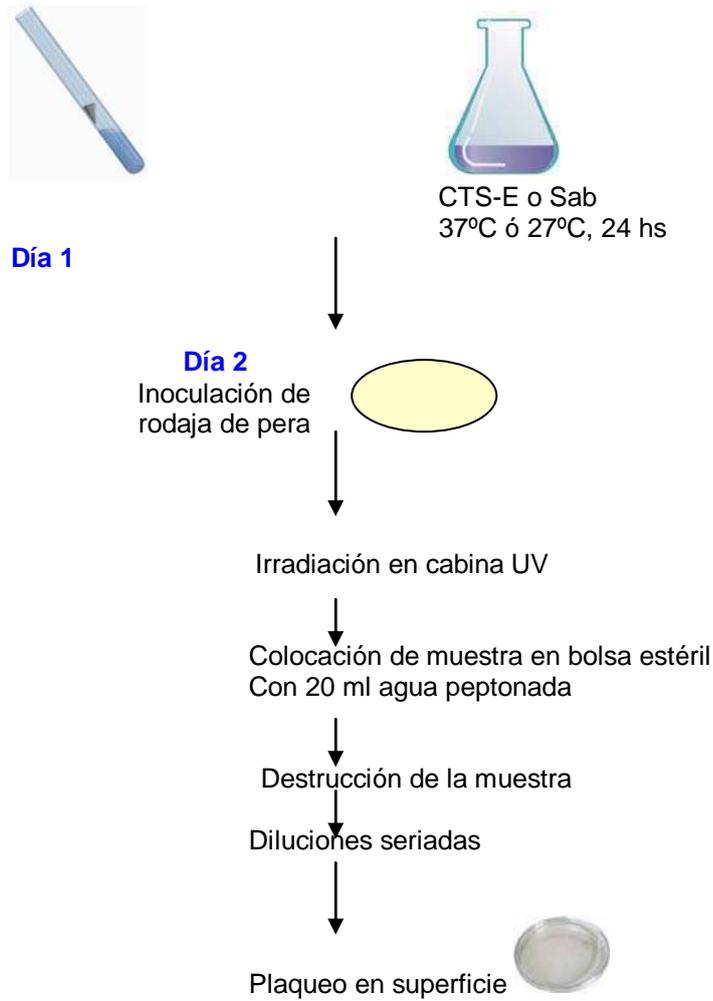
#### **3.8.2.1- Tiempo de secado de las rodajas inoculadas**

Se realizó un ensayo previo con *L. innocua* ATCC 33090 con el fin de establecer el tiempo que se debía dejar al microorganismo en contacto con el sustrato para que se adhiriera y no se disperse luego cuando se la sumergiera en la solución. Para ello se inocularon las rodajas de pera sin piel con la bacteria y se las dejó en la cabina por un período de tiempo de 30 minutos a 3 horas. Para cada tiempo de secado se tomaron 2 muestras que se las sumergió en agua de peptona por 5 minutos y 2 muestras control que no se les hizo nada. Las muestras se procesaron y se realizó el recuento como explica el **apartado 3.8.1.3**.

#### **3.8.2.2- Efecto del tiosulfato de sodio pentahidratado**

Se frenó la reactividad del peróxido de hidrógeno sobre los microorganismos al tiempo deseado agregando tiosulfato de sodio. Como paso previo hubo que asegurarse de que él mismo *per* se no inactive al microorganismo.

**Figura 3.8.3** Esquema del procesamiento de las muestras irradiadas.



Para esto se colocó 1 mL de inóculo de *L. innocua* ATCC 33090 en tubos de ensayo con distintas concentraciones de tiosulfato de sodio (2%, 3% y 4%) por 40 minutos, se realizó un control en agua de peptona y se procedió al recuento según el **apartado 3.8.1.3**.

### 3.8.2.3- Utilización del peróxido de hidrógeno en medio líquido

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se utilizó en un buffer que se preparó a partir de una solución de ácido cítrico monohidratado 0,1M y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2M y se mezclaron en distintas proporciones dependiendo del pH final que se quiso obtener (pH 3,0 o 4,2). Y se agregó un volumen de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para llegar a una concentración del 1%, 2% o 3%.

Se realizaron los primeros ensayos en una solución buffer para evaluar la inactivación que produce el peróxido sobre los microorganismos sin que la matriz les pueda ejercer un efecto protector.

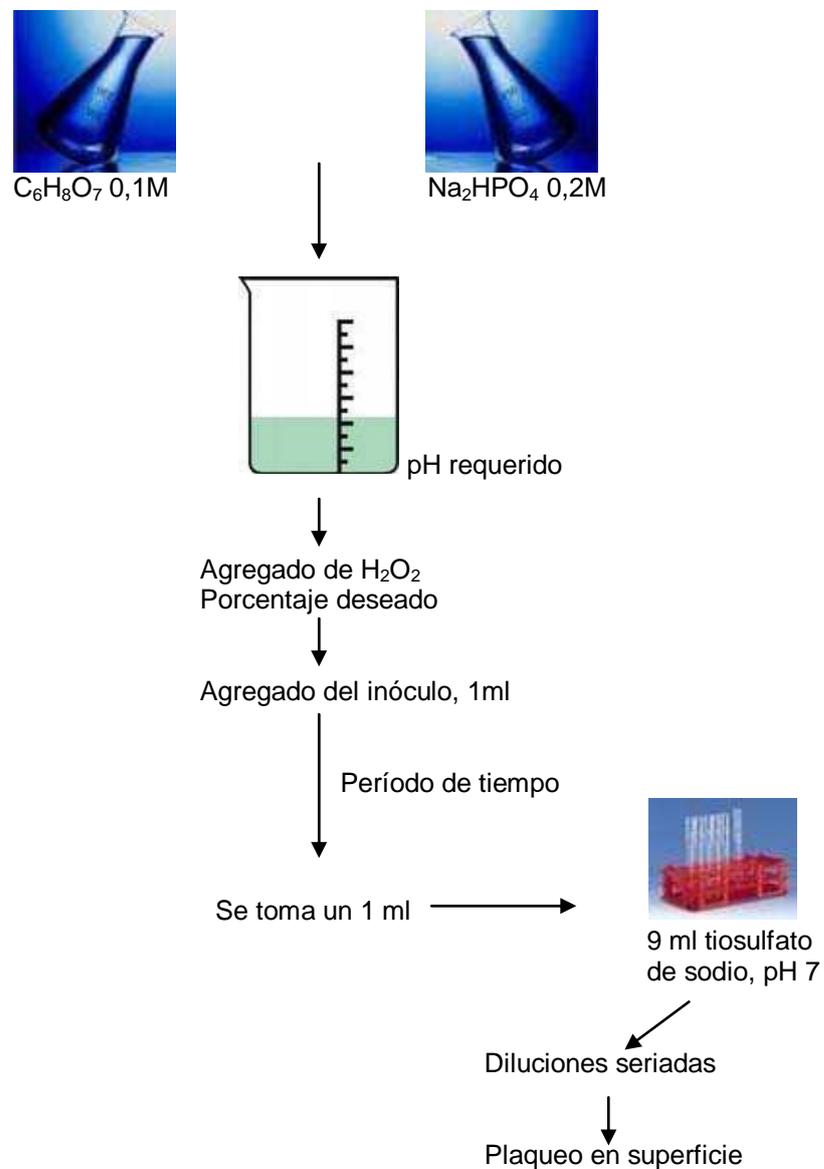
Para este análisis se utilizaron en primera instancia *E. coli* ATCC 11229 y *L. innocua* ATCC 33090. Se preparó el buffer como se mencionó anteriormente, al 1% y 2% con pH 4,2 y al 3% con pH 3,0, se colocó 1 mL del inóculo completando un volumen final de 100 mL. A intervalos de tiempo se sacó 1 mL y se colocó en un tubo de ensayo conteniendo 9 mL de la solución neutralizadora del peróxido, que se preparó añadiendo 4% (p/v) de tiosulfato de sodio en un buffer KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,25M, habiendo ajustado el pH a 7,0±0,2 con hidróxido de sodio. Y se procedió al recuento en placa (**Figura 3.8.4**). En una segunda instancia se probó con *Z. bailii* NRRL 7256 en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%, pH 3,0, por ser este más resistente a la acción del peróxido.

### 3.8.2.4- Efecto del peróxido de hidrógeno en matriz sólida

La matriz que se utilizó fueron peras sin piel y los microorganismos *E. coli* ATCC 11229, *L. innocua* ATCC 33090 y *Z. bailii* NRRL 7256. Las rodajas, 3 por placa de petri, una vez inoculadas (**apartado 3.8.1.3**) se dejaron secar en la cabina por 30 minutos, al cabo del cual se agregó la solución conteniendo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2%, pH 3,0 y 4,2 o 3% pH 3,0), hasta que las rodajas quedaran totalmente

sumergidas. Cuando transcurrió el tiempo estipulado las rodajas se colocaron en la solución de neutralización del peróxido por 5 minutos, luego se escurrieron y se colocaron en bolsas estériles y se procedió al recuento de microorganismos sobrevivientes. El control se realizó de la misma manera pero en vez de la solución de  $H_2O_2$  se las colocó en agua de peptona.

**Figura 3.8.4** Esquema del procedimiento seguido para peróxido de hidrógeno.



### 3.8.3- Tratamientos combinados

Una vez que se establecieron los tiempos de tratamiento UV-C y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> óptimos para disminuir la carga de microorganismos sin afectar la calidad de la fruta, se llevaron a cabo ensayos de tecnologías combinadas en simultáneo y en serie utilizando como microorganismos de prueba: *E. coli* ATCC 11229, *L. innocua* ATCC 33090 y *Z. bailii* NRRL 7256.

#### 3.8.3.1- Tratamientos en serie

El procedimiento que se realizó es el detallado anteriormente para UV y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se realizó en placas de petri conteniendo 3 rodajas de pera sin piel con la aplicación de UV y luego peróxido y viceversa. El tiempo elegido para la aplicación de UV fue de 7,5 minutos (3,7 kJ/m<sup>2</sup>) y para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue de 2 y 5 minutos.

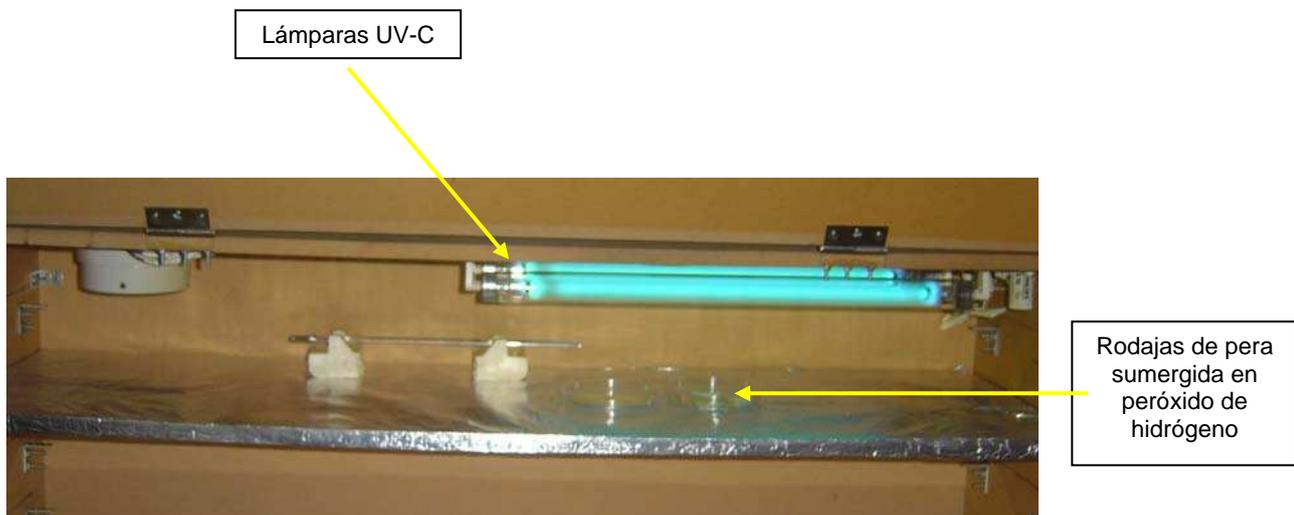
#### 3.8.3.2- Tratamientos en simultáneo

Se llevó a cabo en placas de petri conteniendo 3 rodajas de pera sin piel inoculadas como se explica en el **apartado 3.8.1.3**, a las que se les añadió la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apenas que tapara las rodajas con el propósito de no afectar la penetración de la luz UV-C e inmediatamente se las llevó a la cabina de irradiación durante 2 y 5 minutos (**Figura 3.8.5**). Cumplido el tiempo de tratamiento se procesaron las muestras como se explica en el **apartado 3.8.1.3**. El control se realizó de la misma forma pero sumergiendo las rodajas en agua de peptona en vez de peróxido de hidrógeno.

### 3.9- 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<sub>0</sub> (Log (N/N<sub>0</sub>)) en función del tiempo de tratamiento (t).

**Figura 3.8.5** Procedimiento del tratamiento en simultáneo de peróxido de hidrógeno y UV-C.



### 3.10- Modelado matemático

Se realizó el modelado matemático de las curvas de inactivación obtenidas por la aplicación de luz UV de los diferentes microorganismos utilizando el modelo primario de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull. 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 para Windows 3.0<sup>®</sup> (Statistical Graphics Corp., USA).

### 3.11- Estudios de almacenamiento

En base a los resultados obtenidos en la aplicación de los tratamientos combinados, se seleccionó la condición con mayor efectividad en la inactivación y se siguió la evolución de la carga microbiana de las rodajas de pera sin piel. Las mismas fueron inoculadas con los microorganismos *E. coli* ATCC 11229, *L. innocua* ATCC 33090 y *Z. bailii* sometidas a una solución con 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a pH 3,0 por 5 minutos, seguido de radiación UV-C por 7,5 minutos. Para ello, una vez finalizado el ensayo, se colocaron las rodajas de pera en bolsas estériles individuales y se almacenaron en refrigeración (4°C) durante 6 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 control y muestras tratadas. Los resultados se expresaron como Log (N) en función del tiempo.

### 3.12- Evolución de la flora nativa

Se estudió la evolución de la flora nativa de rodajas de pera sin piel sometidas a los tratamientos propuestos durante el almacenamiento refrigerado. Para ello se obtuvieron las rodajas según la metodología detallada en el **apartado 3.1** con la variante de que el procedimiento no se realizó en ambiente estéril y que las peras y los utensilios utilizados no fueron sanitizados previamente con agua clorada. Las rodajas se almacenaron en bolsas estériles (Whirl Pack, Nasco, EEUU) a 4°C. A intervalos de tiempo regulares (24-72 hs) se tomaron dos rodajas 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.
- ✓ Bacterias acidúricas mesófilas: plaqueo en Agar OSA e incubación a 37°C por 72 hs.

Se graficaron las correspondientes curvas de supervivencia.

### **3.13- Análisis por citometría de flujo**

Se aplicó la técnica de citometría de flujo con el fin de observar diferentes aspectos del estado fisiológico de las células tratadas con luz UV-C, como actividad metabólica e integridad de la membrana plasmática. El citómetro (Partec PAS III, Alemania), que se usó posee 6 canales, con lámpara de argón (488 nm, 15 mW) y lámpara UV. Los datos fueron procesados con el programa WinMDI 2.8, donde se obtuvieron los gráficos de densidad, y de tamaño versus granularidad, los datos se adquirieron en forma logarítmica dado el pequeño tamaño que poseen los microorganismos estudiados.

Para estos estudios se emplearon dos fluorocromos, el yoduro de propidio (IP), que es impermeable a la membrana y sólo puede penetrar si se pierde la integridad de la misma, uniéndose al ADN y emitiendo fluorescencia roja. Y la fluoresceína diacetato (FDA), que es un precursor lipofílico que difunde a través de la membrana y en el citoplasma es hidrolizado por medio de esterasas no específicas dando por resultado la fluoresceína (F), un producto que posee fluorescencia verde.

#### **3.13.1- Optimización de la técnica de citometría de flujo**

Para obtener resultados confiables y reproducibles, primero hubo que poner a punto la técnica en cuanto a número de células que tiene que contener la muestra a pasar por el citómetro, volumen de muestra adecuado para la marcación con los fluorocromos y cantidad que se debe adicionar de cada uno para tener una lectura clara en el equipo.

##### **3.13.1.1- Número de células a pasar por el citómetro**

Debido a que la lectura en el citómetro debe ser clara, la muestra a pasar debe contener un rango de células óptimo. Por eso se probaron varias muestras con distinto número de células a pasar por el citómetro.

### 3.13.1.2- Volumen de muestra para marcación con fluorocromos

Para que la difusión y penetración de la FDA dentro del citoplasma sea eficiente, principalmente para las bacterias que poseen una pared celular compleja, se ajustó el volumen de muestra con la cantidad de células elegida, en donde se realizaría la marcación. Se probaron muestras de 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$  y 1000  $\mu\text{L}$ , en las cuales a su vez se colocaron distintas cantidades de los fluorocromos. Se efectuó el ensayo y se eligió el volumen más adecuado.

### 3.13.1.3- Cantidad de fluorocromo a utilizar

❖ Fluoresceína diacetato (FDA): solución de 5 mg/mL preparada en acetona. Para la marcación se colocó la muestra en tubos eppendorf y se le agregaron distintas cantidades de FDA, 1  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$  y 50  $\mu\text{L}$ . Se dejó en incubadora (SANYO Electric Co Ltd, Japón) a 37°C por 30 minutos. Luego se centrifugaron las células (centrífuga Eppendorf modelo 5804R, Alemania) a 8000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado con PBS, se volvió a centrifugar se descartó nuevamente el sobrenadante y se llevó a volumen final con PBS.

❖ Ioduro de propidio (IP): solución de 1 mg/mL preparada con agua destilada. A los tubos marcados con FDA se le adicionaron distintas cantidades de IP, 1  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$ , 3  $\mu\text{L}$  y 4  $\mu\text{L}$ , y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente por 10 minutos. Se evaluaron que cantidades son las óptimas para trabajar en los ensayos posteriores pasando las muestras por el citómetro.

### 3.13.2- Preparación de las muestras irradiadas con UV-C

Para los estudios de citometría de flujo, el análisis de los daños causados por la radiación UV a los distintos microorganismos se realizó en medio líquido. Se utilizaron *S. cerevisiae* KE 162, *L. innocua* ATCC 33090 y *E. coli* ATCC 11229. Los inóculos se prepararon según el **apartado 3.5**. A partir de ahí se tomó 1 mL

del inóculo ( $5 \times 10^7$ - $5 \times 10^8$  UFC/mL) que se dispersó en una placa de petri con 9 mL de agua de peptona y se llevó a la cabina de irradiación por un tiempo de 1 a 10 minutos. Al cabo del cual se toma una alícuota para realizar el recuento en placa, ATS-E o Sab agar según corresponda y 1 mL con la concentración adecuada de células para la marcación con los fluorocromos (**Figura 3.13.1**).

Para las bacterias hay un paso previo que es una centrifugación para llevarlas a 50  $\mu$ L. La marcación se realizó como se explicó en el apartado anterior y se leen las muestras en el citómetro de flujo.

Los controles se efectuaron con bacterias vivas y FDA (control positivo); y bacterias muertas por calor (85°C, 15 min) en un baño termostático (Vicking, modelo Masson, Argentina) y IP (control negativo).

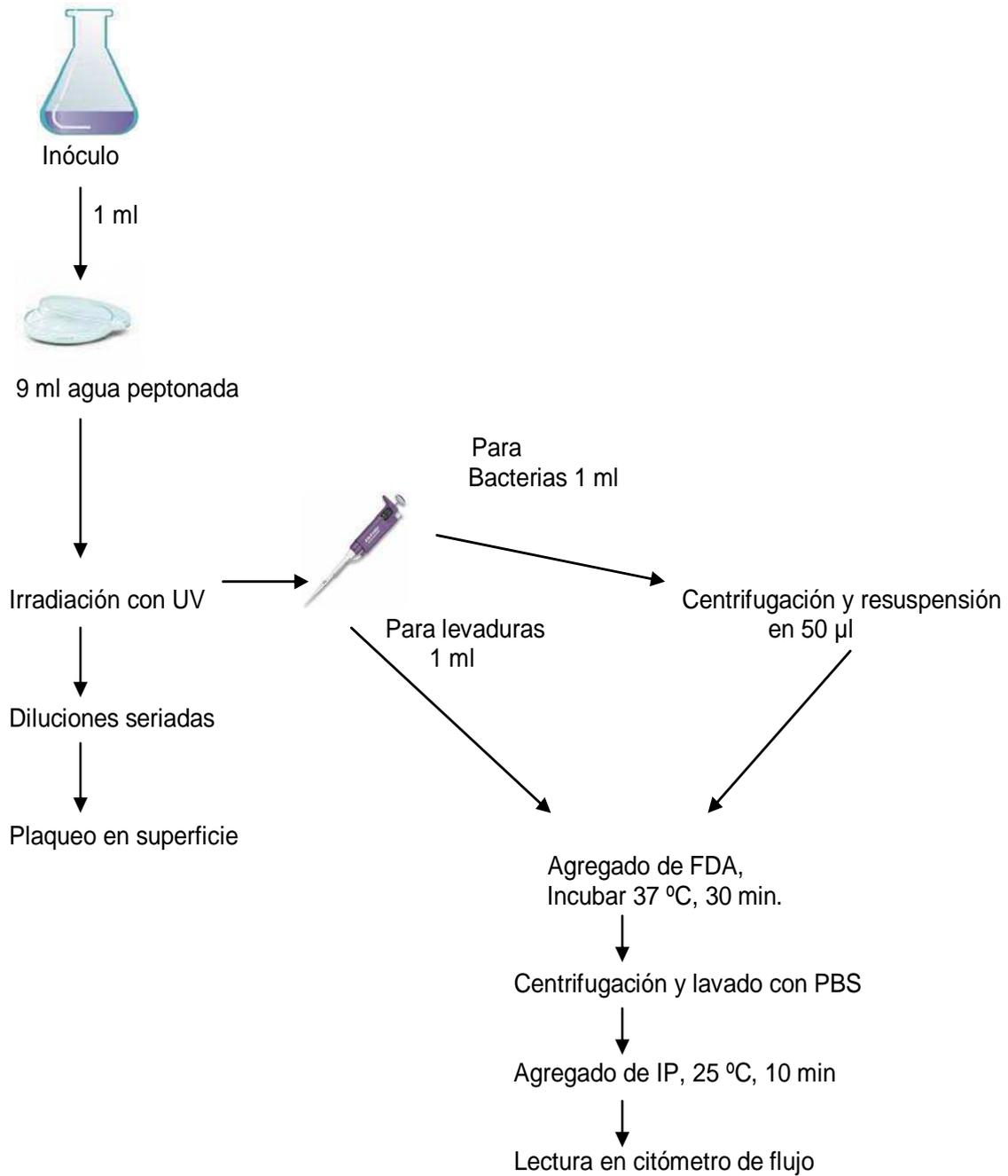
### 3.13.3- Preparación de las muestras para tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La prueba se realizó con *E. coli* ATCC 11229, que fue donde se observó mayor efecto con el tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por lo que se utilizó la máxima concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el pH más alto para realizar el ensayo mediante la técnica de citometría y esta fue de: concentración 3% y pH 3,0 a 25°C.

Para alcanzar el número de células necesarias a la hora de leer en el citómetro de flujo, a partir del microorganismo crecido en estría se colocaron dos ansadas en 50 mL de ATS-E, y se incubó por 24 h a 37°C. Luego del cual los 50 mL se centrifugaron 5 min a 8000 rpm y se resuspendió el pellet en 2,5 mL de agua de peptona,  $\sim 1-5 \times 10^9$  cél/mL.

1 mL del inóculo concentrado se vertió en 99 mL de la solución con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%, preparada como se explicó en el **apartado 3.8.2.3**, se extrajo 1 mL a intervalos de tiempo y se colocaron en 9 mL de tiosulfato de sodio (4% p/v) para la neutralización del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de allí se tomó 1 mL para realizar las diluciones necesarias para los recuentos en placa y 1 mL se utilizó para la marcación con los fluorocromos como fue explicado en el **apartado 3.13.1.3**.

**Figura 3.13.1** Esquema del procedimiento seguido para el análisis por citometría de flujo.



### 3.14- Microscopía electrónica de transmisión

Se observaron en microscopio electrónico de transmisión (Jeol 1200 EX II, Japón) los daños causados en células de *E. coli* ATCC 11229 sometidas a luz UV-C en medio líquido durante 8 minutos ( $3,9 \text{ kJ/m}^2$ ) y a peróxido de hidrógeno durante 5 minutos. Luego de los tratamientos las muestras fueron lavadas con buffer milloning (3 lavados), se colocaron en tetróxido de osmio al 2% en agua, durante 2 h y se procedió a lavar nuevamente con agua destilada (3 lavados), se empaquetaron en agar, se deshidrataron en alcohol con graduación ascendente (50% - 70% - 96% - 100%) en acetona, se realizó una preinclusión en resina spurr en acetona durante toda una noche, luego se realizó la inclusión definitiva de las muestras en resina spurr. Una vez obtenidos los tacos se cortaron con ultramicrotomo (Sorvall MT2, EEUU), se recogieron los cortes en grillas de cobre, se contrastaron con Reynold's y se observaron al microscopio.

### 3.15- Uso de soluciones antipardeamiento

Con el objetivo de evitar el pardeamiento superficial de las muestras en las pruebas posteriores de medición de color se probaron varias soluciones antipardeamiento como pretratamiento. Para ello las rodajas de pera se cortaron de 1 cm de espesor y se sumergieron en las soluciones a probar:

- Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 1%, 1 y 3 minutos
- Lactato de calcio 1% + ácido ascórbico 2 %, 1 y 3 minutos
- $\text{CaCl}_2$  0,1% + Ácido ascórbico 1%, 1 y 3 minutos

Las muestras pretratadas con las distintas soluciones antipardeamiento fueron almacenadas en bolsas estériles (Whirl Pack, Nasco) y puestas en heladera a  $4^\circ\text{C}$ , durante 4 días. Las diferencias en el color fue examinado visualmente.

### 3.16- Evaluación del color

Con el objeto de determinar el efecto de los tratamientos de preservación sobre las rodajas de pera y los cambios deteriorativos que pudieran ocurrir durante el almacenamiento, se estudió la evolución del color de las rodajas de pera sin piel de 1 cm de espesor y 3 cm de diámetro a los siguientes sistemas:

- Sistema C: control (sin tratamiento alguno)
- Sistema D: Irradiación UV-C durante 7,5 minutos ( $3,7 \text{ kJ/m}^2$ )
- Sistema E: Inmersión en peróxido de hidrógeno 3%, pH 3,0 por 5 minutos seguido de irradiación UV-C 7,5 minutos ( $3,7 \text{ kJ/m}^2$ )

Las mediciones colorimétricas se practicaron en un fotocolorímetro triestímulo Minolta CM-508-d (Minolta Corp., Japón) con esfera integradora, usando una apertura de 1,4 cm de diámetro. A las rodajas se les colocó cubriendo el total del espesor una cartulina negra para evitar cualquier efecto luminoso de borde. Se obtuvieron los valores triestímulo: X, Y y Z de forma automática (espacio CIE) y las correspondientes transformaciones matemáticas:  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  (espacio CIE lab). Se utilizaron 10 replicados por tratamiento tomando 3 mediciones en distintas posiciones de la superficie de la muestra. Los cálculos se realizaron para el iluminante estándar C (luz diurna) y ángulo de observador  $2^\circ$ . A partir de los valores triestímulo X, Y y Z se calcularon las diferentes funciones de color descritas en **Introducción, apartado 1.11.2** y se seleccionaron aquellas que representaron más sensiblemente la respuesta al cambio en el procesamiento de las muestras.

#### 3.16.1- Elección del método de envasado de las rodajas de pera

En primera instancia, se llevó a cabo un ensayo sobre muestras de pera sin tratamiento alguno, las que se almacenaron en diversos envases y niveles de vacío para realizar el seguimiento del deterioro y cambio de color durante el almacenamiento.

Los envases utilizados fueron:

- Envase de plástico de polietileno tereftalato (PET) de alta densidad

- Frascos de vidrio con esmeril parafinados (pesafiltros)
- Bolsas de polietileno Whirl Pack (Nasco, USA) de 120 mL de capacidad sin aplicación de vacío antes del sellado
- Bolsas marca Whirl Pack con vacío total, 66 cm Hg de 120 mL de capacidad y posterior sellado
- Bolsas marca Whirl Pack con vacío 42 cm Hg de 120 mL de capacidad y posterior sellado
- Bolsas marca Whirl Pack con vacío 24 cm Hg de 120 mL de capacidad y posterior sellado

Para el sellado de las bolsas con o sin aplicación de vacío se utilizó una selladora de laboratorio (Schcolnik, Argentina).

Una vez envasadas, las muestras fueron almacenadas en refrigeración (4°C) durante 8 días y se les midió el color periódicamente.

### **3.16.2- Medición del cambio de color**

Se analizaron los cambios de color de los sistemas antes definidos C; D y E. Luego de los tratamientos, las muestras fueron almacenadas en el envase elegido en refrigeración a 4°C durante 8 días y se les midió el color periódicamente con el colorímetro.

### **3.17- Análisis sensorial**

Se realizaron estudios con el objeto de evaluar varios aspectos sensoriales de rodajas de pera mínimamente procesadas mediante irradiación UV-C ó combinación de peróxido de hidrógeno/ UV-C, los cuales involucraron:

- Prueba discriminativa (Test de diferencia contra control) y
- Prueba afectiva de aceptabilidad global (Test de escala hedónica), los cuales se llevaron a cabo con consumidores con un mínimo de instrucción en la prueba que debían realizar.
- Análisis de algunos atributos de textura de las rodajas de pera, tests que se llevaron a cabo con un panel sensorial entrenado en textura.

### 3.17.1- Área de prueba

Se seleccionó una habitación con luz natural, temperatura agradable y libre de posibles distracciones, que fue dividida en dos sectores: zona de análisis y zona de preparación de las muestras. Para que los juicios fuesen independientes, el sector de análisis fue dividido en seis cubículos blancos (**Figura 3.17.1**). Cada uno de ellos fue provisto con un vaso con agua, una servilleta y una cucharita para tomar las muestras (**Figura 3.17.2**).

### 3.17.2- Jueces

Las diferentes pruebas se realizaron con consumidores de frutas, reclutándose distinto número de jueces según los requerimientos de cada una. Fueron invitados a participar de las sesiones estudiantes universitarios, cuyas edades oscilaban entre los 20 y 35 años. Al finalizar la prueba se les proporcionó una pequeña recompensa, consistente en una golosina, en agradecimiento por su colaboración. El análisis con las distintas escalas de textura fueron llevadas a cabo con un panel de jueces entrenados en textura.

### 3.17.3- Pruebas de evaluación sensorial

Las distintas pruebas sensoriales se llevaron a cabo con los sistemas C; D y E.

- Sistema C: control (sin tratamiento alguno)
- Sistema D: Irradiación UV-C durante 7,5 minutos ( $3,7 \text{ kJ/m}^2$ )
- Sistema E: Inmersión en peróxido de hidrógeno 3%, pH 3,0 por 5 minutos seguido de irradiación UV-C 7,5 minutos ( $3,7 \text{ kJ/m}^2$ )

**Figura 3.17.1** Sala de evaluación sensorial.



**Figura 3.17.2** Disposición de las muestras y material proporcionado a cada cubículo.



### 3.17.3.1- Test de diferencia contra control

Esta prueba discriminativa se implementó para verificar si los consumidores encontraban alguna diferencia entre las muestras sin tratamiento (control) y las muestras tratadas por los distintos procesos y la magnitud de la misma.

En cada sesión los jueces recibieron 2 muestras presentadas de manera idéntica en todas sus propiedades y codificadas con clave de tres cifras y el control camuflado presentado también como muestra incógnita, acompañados de un vaso correspondiente a un control identificado como tal (C), las muestras se sirvieron a una temperatura de consumo entre 6 y 8 °C. El orden de presentación fue al azar pero balanceado. La distribución de los distintos sets de muestras entre los sujetos también fue al azar.

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

Se aplicó un análisis de varianza de dos factores (muestra-sujeto). Se estudiaron las diferencias entre los sujetos con el objetivo de verificar que los mismos evaluaron como grupo. En aquellos casos en los cuales existieron diferencias significativas en los juicios emitidos por los sujetos, se calculó la mínima diferencia significativa de Fisher (MDS) que habría que superar para eliminar los juicios que se apartaban del resto.

### 3.17.3.2- Test de escala hedónica

Se realizó un test hedónico con consumidores con el objeto de evaluar la impresión global de rodajas de pera. Para ello se siguió el protocolo descrito por Lawless y Heymann (1999).

Considerando los resultados obtenidos en el test de diferencia contra control, se seleccionó el tratamiento de las rodajas de peras irradiadas con luz UV-C durante 7,5 minutos (3,7 kJ/m<sup>2</sup>) y el tratamiento en serie consistente en inmersión de las rodajas durante 5 minutos en solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% con pH 3,0

## Formulario N°1

### Evaluación de pera

N° de bandeja .....

Fecha:...../...../.....

#### INSTRUCCIONES

Se le ha entregado una muestra control (C) y otras **3** muestras de pera para que las compare respecto del mismo en cuanto a su diferencia global. Las muestras están ordenadas al azar.

1- Probar primero el control

2- Luego probar una muestra codificada

3- Evaluar la magnitud de la diferencia global de la muestra respecto del control.

4- Marcar en la escala con una "x" la casilla que mejor exprese la diferencia de sensación percibida.

5- Repetir los pasos 1 a 4 con cada muestra. De ser necesario enjuagar la boca con agua antes de la evaluación de un nuevo par control-muestra.

Tenga en cuenta que algunas muestras pueden ser iguales al control.

*La diferencia global de cada muestra respecto del control es*

Clave de la muestra:

.....

.....

.....

Ninguna	1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ligera	2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Moderada	3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Grande	4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Muy grande	5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

En caso de encontrar diferencia:

¿Puede describir la misma?

.....  
 .....  
 .....

y luego irradiación con luz UV-C durante 7,5 minutos.

En esta prueba se empleó una escala hedónica de 9 puntos balanceada, con extremos desde “me disgusta extremadamente” a “me gusta extremadamente”, al final de la planilla se colocó el apartado “observaciones” para que los consumidores puedan emitir su opinión (**Formulario 2**).

Para la realización de este test cada juez dispuso de una muestra con cada tratamiento, codificada con 3 números al azar. La presentación de las muestras fue al azar pero balanceado.

Con la información brindada por los consumidores se analizó la distribución de frecuencias de los puntajes otorgados para cada tratamiento en la prueba de impresión global. También se examinaron los resultados mediante un análisis de varianza de dos factores (muestra-sujeto). Se estudiaron las diferencias entre los sujetos con el objetivo de verificar su funcionamiento como grupo y las diferencias entre las muestras analizadas.

### 3.17.3.3- Análisis de textura

Se analizaron algunos atributos de textura sensorial de los siguientes sistemas:

- Sistema C: control (sin tratamiento alguno)
- Sistema D: Irradiación UV-C durante 7,5 minutos ( $3,7 \text{ kJ/m}^2$ )
- Sistema E: Inmersión en peróxido de hidrógeno 3%, pH 3,0 por 5 minutos seguido de irradiación UV-C 7,5 minutos ( $3,7 \text{ kJ/m}^2$ )

Las muestras se evaluaron con un panel ya entrenado en las escalas utilizadas integrado por 7 jueces.

De acuerdo a la Norma IRAM 20005-1, los jueces para quedar seleccionados pasaron por las siguientes pruebas: encuesta personal, reconocimiento de gustos básicos (Jellinek, 1985), pruebas secuencial del triangulo (Meilgaard y col., 1999) y reconocimiento fisiológico en textura (Civille y Szczesniak, 1973).

## Formulario N°2

### Evaluación de pera

Fecha:...../...../.....

1. Considerando todos los aspectos, ¿qué afirmación describe mejor su impresión global del producto?

Clave de la muestra:	.....	.....
Me gusta extremadamente	-9-	-9-
Me gusta mucho	-8-	-8-
Me gusta moderadamente	-7-	-7-
Me gusta algo	-6-	-6-
Ni me gusta ni me disgusta	-5-	-5-
Me disgusta algo	-4-	-4-
Me disgusta moderadamente	-3-	-3-
Me disgusta mucho	-2-	-2-
Me disgusta extremadamente	-1-	-1-

Observaciones:

.....  
.....  
.....

Posteriormente, para el entrenamiento de los jueces seleccionados se utilizó la técnica del método del perfil de textura (IRAM 20013). Al cabo de varios meses dicho panel adquirió alto entrenamiento en las escalas de los atributos texturales reconociendo y midiendo objetivamente cada punto de referencia de las mismas.

Con el propósito de expresar la intensidad percibida en los atributos texturales evaluados, se emplearon escalas con referencias definidas por alimentos locales como anclas (Hough y Contarini, 1994; IRAM 20013) (**Formularios 3, 4 y 5**). Para este estudio y dado el alto entrenamiento del panel utilizado sólo se utilizaron algunas de las referencias conocidas de cada escala analizada. Los atributos texturales evaluados fueron elegidos previamente como los de mayor relevancia en este tipo de muestra. Dichos parámetros fueron:

- **Dureza (Formulario 3):**

- *Definición sensorial:* Fuerza requerida para comprimir una sustancia entre los molares.
- *Técnica:* coloque la muestra entre los molares, muerda en forma uniforme y evalúe la fuerza requerida para comprimirla.
- *Anclas de referencia utilizadas:* huevo duro en cubitos de 1 cm de lado; aceituna sin carozo, 1 unidad y maní por unidad.

- **Fracturabilidad (Formulario 4):**

- *Definición sensorial:* Fuerza con la cual una muestra se desmenuza, rompe o fractura.
- *Técnica:* coloque la muestra entre los molares, muerda en forma pareja hasta que la muestra se desmenuce, fracture o destruya; y evalúe la fuerza con la cual el alimento se separa de los dientes.
- *Anclas de referencia:* tapas de alfajor (piezas de 1 cm<sup>2</sup>); galletitas de agua en piezas de 1 cm<sup>2</sup> (marca “Criollitas”); galletitas dulces en piezas de 1 cm<sup>2</sup> (marca “Melita”).

- **Jugosidad (Formulario 5):**

- *Definición sensorial:* Cantidad de jugo liberado durante las 3 primeras mordidas.

- *Técnica*: Coloque la muestra entre los molares, mástiquela tres veces y evalúe la cantidad de jugo liberado.
- *Anclas de referencia*: piezas de fruta de 1 cm<sup>3</sup> sin piel. Las frutas utilizadas fueron tomate; manzana “Granny Smith” y naranja.

Al panel entrenado se le presentaron las escalas correspondientes a cada atributo sensorial con las 3 anclas de referencia, y las muestras correspondientes a los sistemas. Las muestras de pera a evaluar por el panel entrenado fueron preparadas 1 hora antes a la evaluación y fueron presentadas en vasos de plástico rojo. Cada vaso contenía dos placas cilíndricas de pera divididas en cuatro. Los vasos se identificaron con números de 3 dígitos elegidos al azar. Como neutralizante entre las evaluaciones se utilizó agua mineral y galletitas de agua sin sal. Los evaluadores colocaban una marca en cada escala correspondiente a cada sistema evaluado. Dicha marca se convertía a un número que fue procesado mediante análisis de varianza de dos factores con el propósito de monitorear a los jueces y encontrar diferencias entre las muestras analizadas. De hallarse diferencias entre jueces o muestras se aplicó el método de comparaciones múltiples de Fisher con un nivel de significación del 5% ( $\alpha = 0,05$ ). Una vez realizado este análisis se procedió a obtener el perfil sensorial de cada sistema con los atributos evaluados empleando gráficos de tipo araña (van Oirschot y col., 2003).

## Formulario N°3

### Escala de Dureza

Definición física: Fuerza necesaria para obtener una dada deformación

Definición sensorial: Fuerza requerida para comprimir una sustancia entre los molares (sólidos) o entre la lengua y el paladar (semisólidos)

Técnica:

para sólidos: coloque la muestra entre los molares, muera en forma uniforme y evalúe la fuerza requerida para comprimirla

para semisólidos: coloque la muestra entre la lengua y el paladar y mida la fuerza requerida para comprimirla.

Evaluación: Evalúe las anclas presentadas y luego las muestras codificadas de izquierda a derecha. Evalúe la muestra, indique con un solo trazo sobre la escala el valor que considera que mejor describe a la muestra. Repita estos pasos las veces que considere necesario.

Referencias: 1) Queso crema, 2,5) Clara de huevo, 5) Salchicha, 6) Aceituna, 9,5) Maní, 11) Chocolate, 17) Caramelo duro



## Formulario N°4

### Escala de Fracturabilidad

Definición física: Fuerza con la cual un material se fractura. Un producto con alto grado de dureza y bajo grado de cohesividad.

Definición sensorial: grado en el cual una muestra se desmenuza, rompe o fractura.

Técnica: Coloque la muestra entre los molares y muerda en forma pareja hasta que la muestra se desmenuce, fracture o destruya; evaluando la fuerza con la cual el alimento se separa de los dientes.

Evaluación: Evalúe las anclas presentadas y luego las muestras codificadas de izquierda a derecha, indique con un solo trazo sobre la escala el valor que considera que mejor describe a la muestra. Repita estos pasos las veces que considere necesario.

Referencias: 1) Budín, 2,5) Tapita de alfajor, 5) Criollitas, 8) Melitas, 10) Tostada, 12) DRF, 14.5) Caramelo duro



## Formulario N°5

### Escala de jugosidad

Definición física y sensorial: Cantidad de fluido liberado durante las primeras tres mordidas.

Técnica: Coloque la muestra entre los molares, mástiquela tres veces y evalúe la cantidad de jugo liberado.

Evaluación: Evalúe las anclas presentadas y luego las muestras codificadas de izquierda a derecha. Indique con un solo trazo sobre la escala el valor que considera que mejor describe a la muestra. Repita estos pasos las veces que considere necesario.

Referencias: 0) Banana, 1) Zanahoria, 2) Hongos, 4) Tomate, 5) Pepino, 6) Manzana, 7) Frutilla, 8) Melón (rocío de miel), 9) Naranja, 10) Sandía.





# **Resultados y Discusión**

#### 4.1- Determinación de pH y sólidos solubles

Para los ensayos de inactivación, se utilizaron peras variedad *William's* y variedad *Packam Triumph* para los ensayos de flora nativa; y manzanas variedad *Granny Smith* que tuvieran aproximadamente el mismo grado de madurez con el propósito de no tener grandes variaciones en las medidas del pH y contenido de sólidos solubles (**Tabla 4.1.**).

**Tabla 4.1** Valores de pH y sólidos solubles de las frutas utilizadas

Fruta	pH	Sólidos solubles (°Brix)
Pera	4,0 - 4,2	12,7- 13,8
Manzana	3,4 - 3,6	11,6 – 12,0

#### 4.2- 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-iodato (Rhan, 1997) siguiendo el procedimiento descrito en **Materiales y Métodos, apartado 3.8.1.2 A**. Las mediciones se realizaron en 5 puntos diferentes del estante ubicado debajo de las lámparas de luz UV-C (**Figura 3.8.2 del apartado 3.8.1.2 de Materiales y Métodos**), con el propósito de analizar las variaciones en la energía emitida por las lámparas, dependiendo de la posición en que se colocaban las muestras.

Para verificar los resultados obtenidos mediante actinometría, se determinó en paralelo la dosis de luz UV-C para todas las posiciones, empleando un radiómetro tal como se describe en el **apartado 3.8.1.2 B**. A partir de la medición con el radiómetro se obtuvo la potencia de las lámparas en [J/s]. Dicho valor se dividió por el área del sensor del radiómetro ( $A = 0,00007854 \text{ m}^2$ ). El valor así obtenido se multiplicó por el tiempo de tratamiento aplicado, determinando así, el correspondiente valor de la dosis para cada posición (**Figura 4.2.1**).

El par actinométrico ioduro-iodato resultó efectivo y reproducible para la determinación de las dosis de luz UV-C aplicadas durante el tratamiento. Las dosis de irradiación UV-C determinadas por los métodos de actinometría y de radiometría variaron según los diferentes tiempos de exposición y según la posición donde se colocaba la muestra en el estante bajo las lámparas.

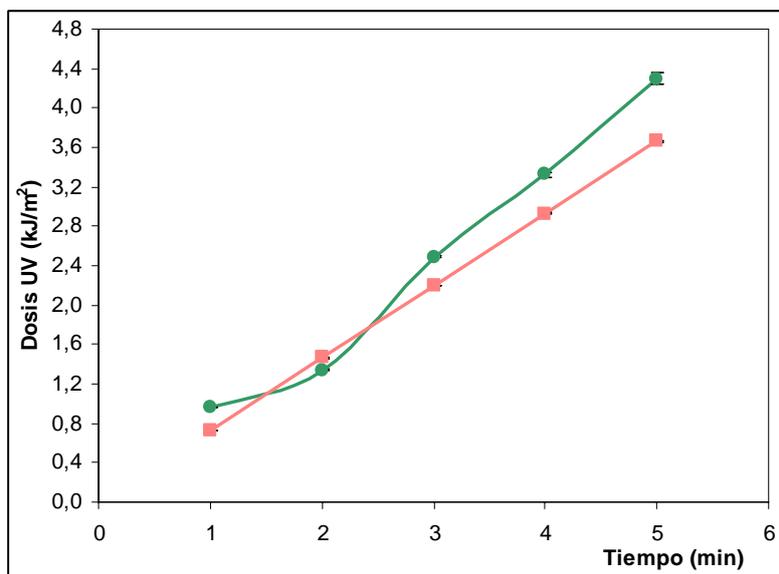
Aplicando el par actinométrico ioduro-iodato a tiempos largos de exposición a la irradiación, la relación energía- tiempo dejó de ser lineal y no fue posible utilizar posteriores valores de absorbancia debido a que el sistema estaba saturado y sin posibilidad de generar más moles de triioduro ( $I_3^-$ ). Es por esta razón que para todas las posiciones analizadas se tomaron tiempos entre 1 y 5 minutos. En la **Figura 4.2.1** se muestran las curvas obtenidas para las distintas posiciones de irradiación con luz UV-C en el rango 1-5 minutos (zona lineal) a partir de la cual se calculó la energía correspondiente a los distintos tiempos de tratamiento.

En todas las posiciones analizadas (**Figura 3.8.2, de Materiales y Métodos**) se obtuvo un valor mayor en la dosis de luz UV-C cuando se la calculó por actinometría, obteniéndose las mayores dosis en las posiciones 2 y 4 (en el centro de las dos lámparas, tendiendo hacia los extremos). Esto puede deberse a que los rayos que inciden en la solución actinométrica provienen de todas las direcciones mientras que con el radiómetro solo inciden los rayos en dirección normal, dado que el sensor posee una superficie muy pequeña. Debido a esto los valores obtenidos en las posiciones 1 y 3 (posiciones ubicadas directamente debajo de la lámpara) son similares con ambos métodos.

En la posición 5, si bien los valores de las dosis de luz UV-C obtenidas fueron menores que en las otras posiciones, es donde se determinaron los valores más próximos con ambos métodos. Es por eso que se optó por colocar las muestras en esta posición para los diversos ensayos con luz UV-C realizados posteriormente. La absorbancia obtenida de la posición 5 junto con los correspondientes valores de concentración de triioduro ( $I_3^-$ ) y de energía calculados según las ecuaciones **3.2 a 3.5 (Materiales y Métodos, apartado 3.8.1.2)** se presentan en la **Tabla 4.2**.

**Figura 4.2.1** Curvas de dosis/tiempo de exposición obtenidas por (●) actinometría y (■) radiometría para las diferentes posiciones bajo las lámparas de luz UV-C. Posiciones a) 1; b) 2; c) 3; d) 4 y e) 5, (±) desviación estándar.

a)



b)

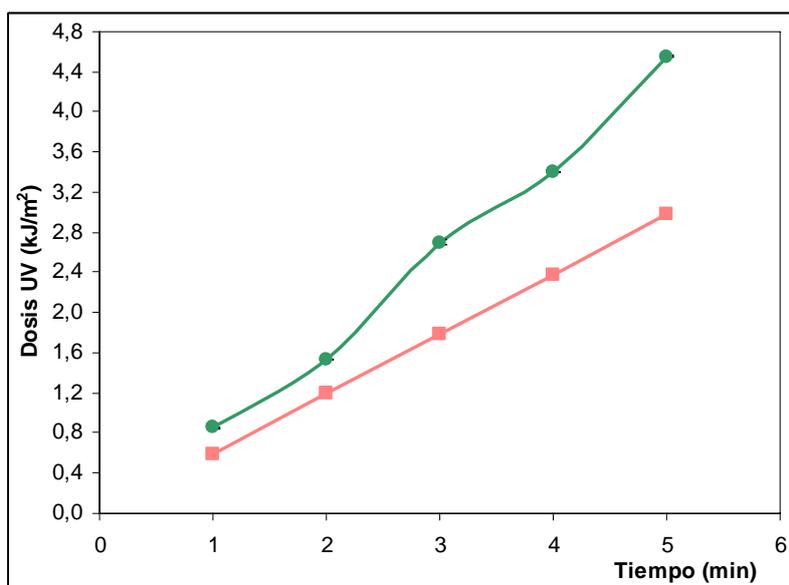
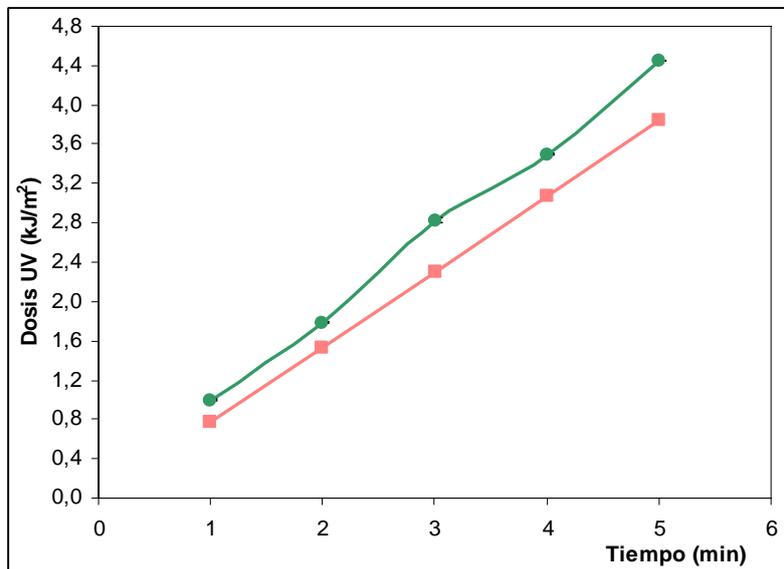


Figura 4.2.1 (continuación)

c)



d)

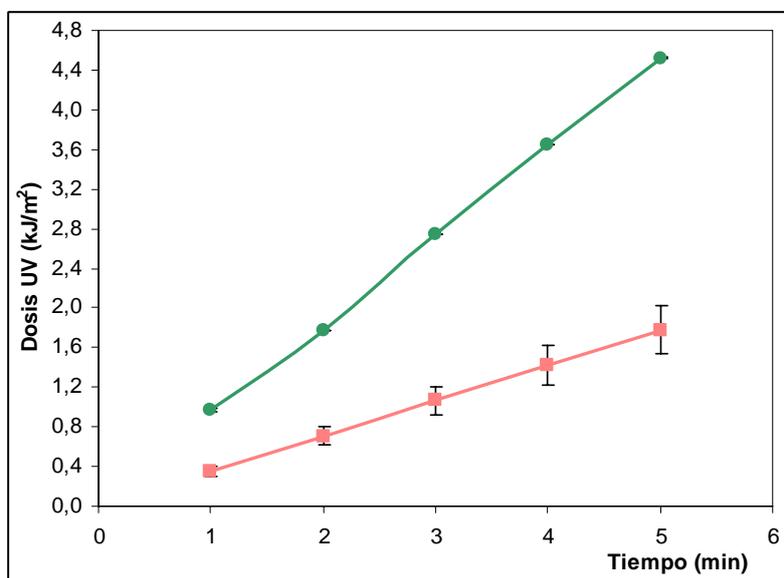
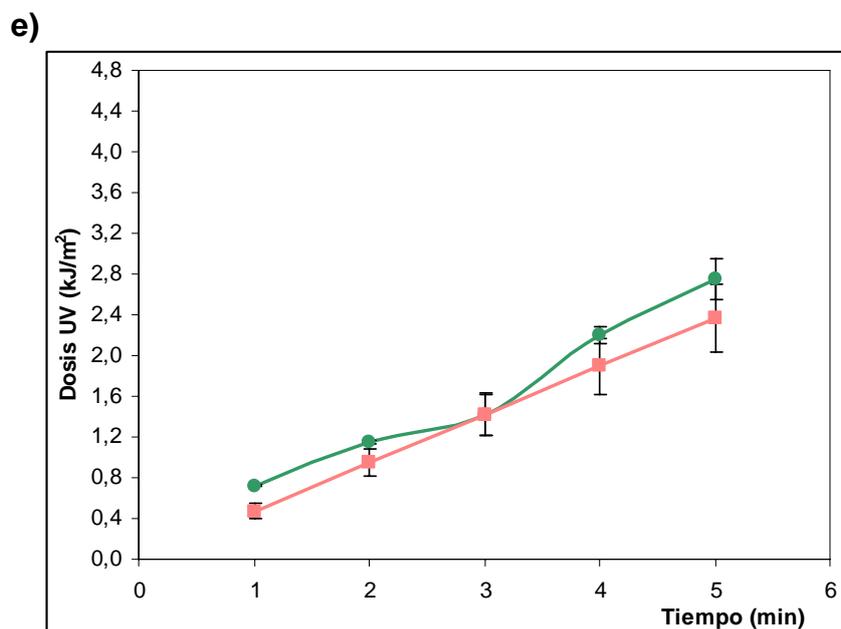


Figura 4.2.1 (continuación)



**Tabla 4.2** Absorbancia y energía calculada según ecuaciones 3.2 a 3.5 para el par actinométrico Ioduro/Iodato sometido a irradiación con luz UV-C durante distintos tiempos entre 1 y 5 minutos.

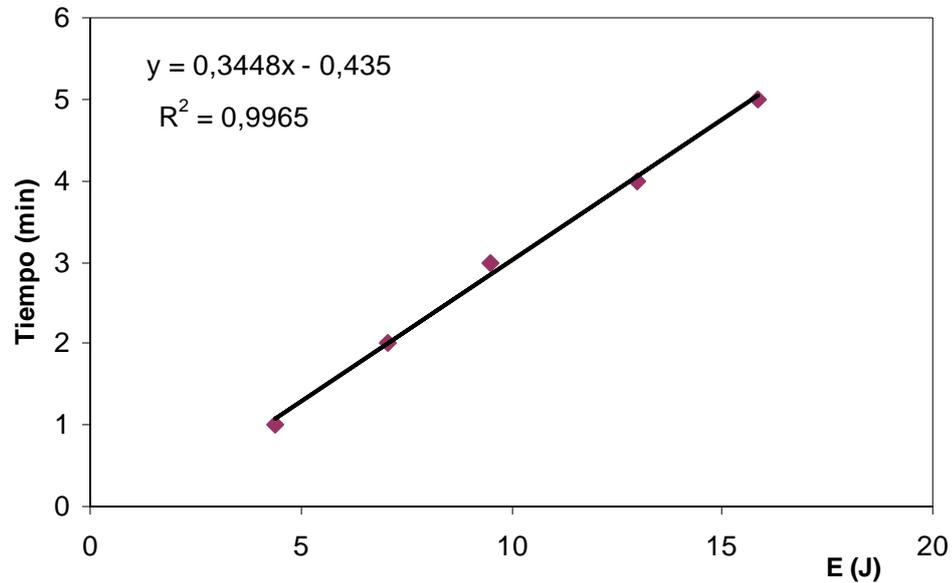
Tiempo (min)	Abs (352 nm)	Dilución	Energía calculada ecuación 3.5 (J)	Conc $I_3^-$ ecuación 3.2 (M)	Dosis UV ( $kJ/m^2$ )
1	1,120	1/10	4,3832	0,0000085	0,721
2	0,903	1/20	7,0679	0,0000137	1,162
3	1,213	1/20	9,4943	0,0000184	1,561
4	0,830	1/40	12,9931	0,0000252	2,136
5	0,811	1/50	15,8696	0,0000307	2,609

En la **Figura 4.2.2** se muestra la curva obtenida para los distintos tiempos de irradiación con luz UV-C y la ecuación que caracteriza la relación energía-tiempo para la zona lineal (1-5 minutos) a partir de la cual se calculó la energía correspondiente a los distintos tiempos de tratamiento. La energía obtenida en J se divide por el área expuesta a la radiación ( $0,0061 \text{ m}^2$ ) y se obtiene la dosis de UV-C ( $\text{kJ/m}^2$ ).

En la **Tabla 4.3** 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 obtenidos en la posición 5 del estante ubicado debajo de la lámpara. El valor de dosis obtenido mediante la medición con el radiómetro fue muy cercano al valor que se obtuvo con el sistema actinométrico yoduro-iodato.

Por lo tanto se asumió para el resto de este estudio los valores de dosis en promedio obtenidos por actinometría y radiómetro.

**Figura 4.2.2** Ecuación lineal que relaciona Energía/tiempo de exposición a partir de los datos experimentales de absorbancia y mediante la aplicación de las ecuaciones 3.2. a 3.5.



**Tabla 4.3** Valores de dosis correspondientes a los distintos tiempos de exposición a la luz UV-C en la posición 5.

Tiempo (min)	Dosis (KJ/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	Dosis (KJ/m <sup>2</sup> ) <sup>b</sup>	Promedio
1	0,721	0,474	0,598
2	1,162	0,947	1,055
3	1,561	1,421	1,491
4	2,136	1,895	2,016
5	2,609	2,368	2,489
7	3,685	3,316	3,500
7,5	3,939	3,552	3,746
10	5,213	4,736	4,974
12	6,232	5,684	5,958
12,5	6,486	5,921	6,204
15	7,760	7,105	7,432
18	9,288	8,526	8,907
20	10,307	9,473	9,890

<sup>a</sup> Estimada por actinometría (Ec. 3.2-3.5, Mat y Mét. 3.8.1.2)

<sup>b</sup> Estimada por radiómetro

### 4.3- Tratamientos con luz ultravioleta

#### 4.3.1- Utilización de diversas matrices

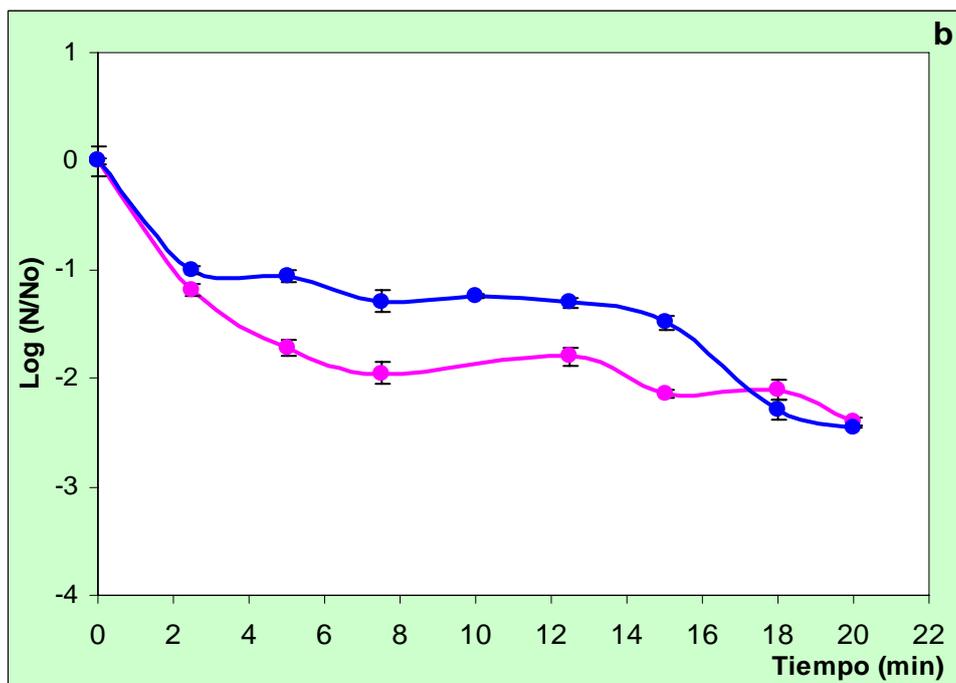
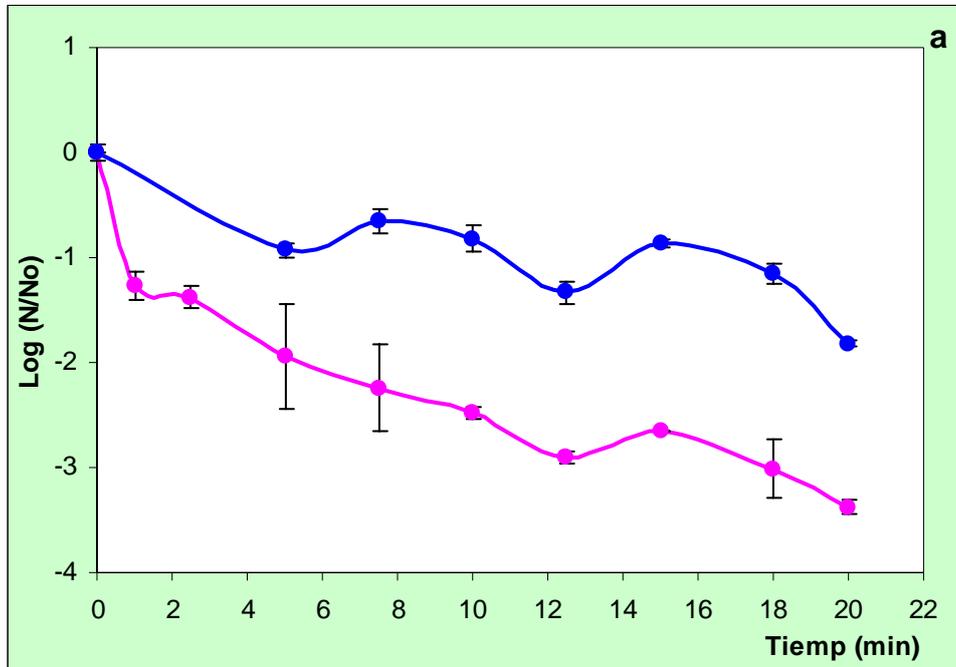
##### 4.3.1.1- Curvas de inactivación

La **Figura 4.3.1** presenta los resultados obtenidos a partir del estudio de la respuesta de *L. innocua* ATCC 33090 en rodajas de pera y manzana con y sin piel tratadas con radiación UV-C hasta 20 minutos ( $9,9 \text{ kJ/m}^2$ ), tal como se describe en **Materiales y Métodos, apartado 3.8.1.3**. Las curvas de inactivación obtenidas para todos los sistemas fueron algo bifásicas, con una inactivación más marcada entre los 0 y 4 minutos ( $0-2 \text{ kJ/m}^2$ ) de tratamiento y luego un rango de dosis de irradiación con escaso incremento de la inactivación observada. (**Figura 4.3.1**). Además, presentaron en todos los casos oscilaciones, probablemente debido al procedimiento de muestreo y análisis, el cuál consideraba el procesamiento de muestras diferentes a cada tiempo de exposición a la radiación UV-C, metodología que conlleva mayor error experimental que el correspondiente a un muestreo de un mismo lote inoculado del que se extraen alícuotas a distintos tiempos de tratamiento.

En rodajas de fruta sin piel la inactivación de *L. innocua* fue más efectiva en pera, alcanzándose 3,4 reducciones logarítmicas, mientras que en manzana sólo se obtuvieron 1,8 reducciones logarítmicas luego de 20 min ( $9,9 \text{ kJ/m}^2$ ) de tratamiento (**Figura 4.3.1.a**). Este hecho probablemente pueda atribuirse a una mayor porosidad efectiva de la manzana ( $\approx 24$ ) (Salvatori y col., 1998) respecto de la pera ( $\approx 4$ ) (Salvatori, 1997) tal como ha sido reportado, esto podría causar que el inóculo microbiano penetre en la rodaja con mayor facilidad y de este modo quede protegido, dada la acción fundamentalmente superficial que ejerce la luz UV-C (Gardner y Shama, 1999).

En rodajas de fruta con piel, la efectividad del tratamiento de irradiación con luz UV-C fue similar en ambas matrices. Se alcanzaron, en promedio, 2,4 reducciones logarítmicas luego de 20 minutos ( $9,9 \text{ kJ/m}^2$ ) de tratamiento con luz UV-C en ambas frutas (**Figura 4.3.1b**).

**Figura 4.3.1** Curvas de inactivación de *L. innocua* ATCC 33090 en (●) pera y (●) manzana sin piel a) y con piel b), sometidas a radiación UV-C, durante 20 minutos (9,9 kJ/m<sup>2</sup>).



Este resultado concuerda con lo esperado dado que la piel en ambas frutas ofrece, en distinto grado, una barrera para la penetración del inóculo. Pudo observarse que, independientemente de la presencia de piel, los tratamientos fueron más efectivos en el caso de pera (**Figura 4.3.1**). Gómez y col. (2010) obtuvieron una reducción similar (1,9 ciclos log) trabajando con *L. innocua* ATCC 33090 inoculada en manzana sin piel e irradiada con luz UV-C en un equipo de similares características luego de 20 min de tratamiento (11,2 kJ/m<sup>2</sup>).

En este estudio se demuestra que la efectividad de la radiación ultravioleta como método decontaminante de frutas depende de las características de la superficie de la matriz irradiada. Este hecho es relevante y debe ser tenido en cuenta en el diseño de procesos de decontaminación superficial.

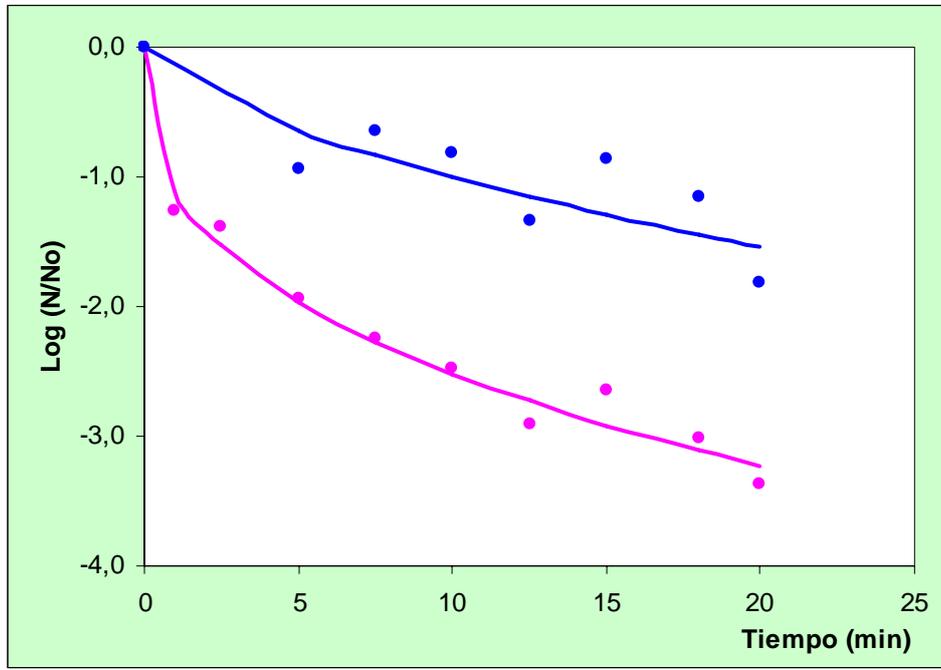
#### **4.3.1.2- Aplicación del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull**

Con el objeto de explicar con mayor claridad las diferencias observadas en las curvas de inactivación microbiana obtenidas para las distintas matrices, se aplicó el modelo de distribución de frecuencias tipo Weibull detallado en **Materiales y Métodos, apartado 3.10.1.5**. La importancia de la aplicación de este modelo radica en el estudio de las distribuciones de frecuencias de resistencias que se producen debido a que la totalidad de la población microbiana no tiene exactamente el mismo nivel de resistencia al tratamiento aplicado, y por lo tanto, no se destruye al mismo tiempo durante el procesamiento. La **Figura 4.3.2** muestra las curvas de inactivación predichas por el modelo, junto a los datos experimentales. La **tabla 4.3.1** muestra los parámetros *b* y *n* característicos surgidos a partir de la aplicación de dicho modelo.

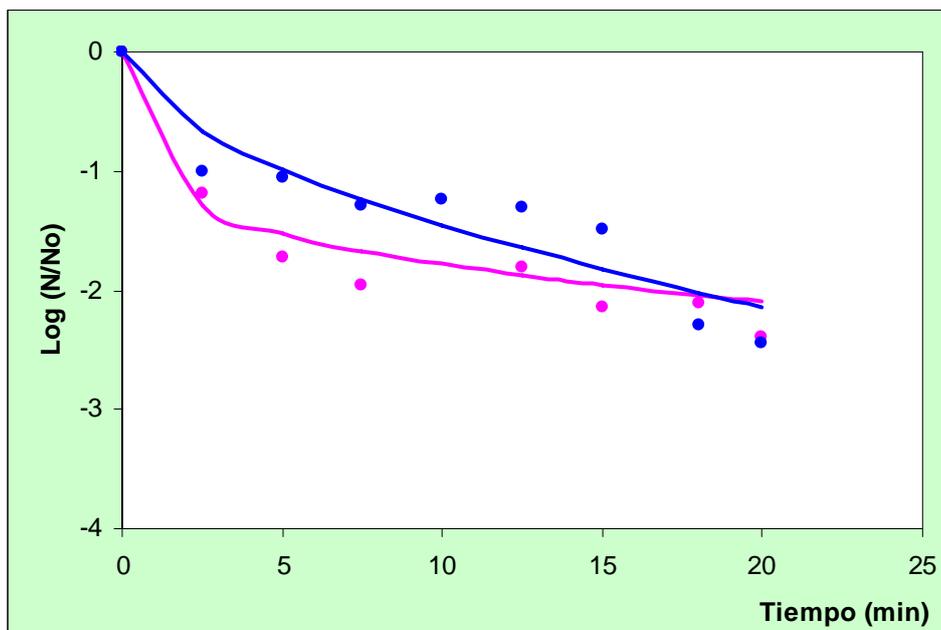
El modelo Weibulliano ajustó adecuadamente a los datos experimentales, tal como lo demuestran los valores de R<sup>2</sup> ajustado obtenidos, indicando que el modelo explicó entre el 70,3 y el 97,8 % de la variación observada en la respuesta (Log N/N<sub>0</sub>) con las condiciones evaluadas. En manzana sin piel el menor ajuste podría deberse a la elevada porosidad de la misma, hecho que ya ha sido comentado. Asimismo, los valores del estadístico Fisher (F) para el modelo resultaron altamente significativos ( $\alpha < 0,001$ ).

**Figura 4.3.2** Aplicación del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull a las curvas de inactivación de *L. innocua* en (●) pera y (●) manzana sometidas a luz UV-C. a) sin piel; b) con piel. (—) valores predichos; (●) datos experimentales.

a)



b)



**Tabla 4.3.1** Parámetros correspondientes al modelo de distribución de frecuencias de resistencias weibulliano para el comportamiento de *L. innocua* en distintas matrices sometidas a irradiación con luz UV-C.

<b>Matriz</b>	<b><i>b</i></b>	<b><i>n</i></b>	<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	<b>F*</b>
Pera sin piel	1,10	0,36	97,8	1187
Pera con piel	1,05	0,26	95,8	530
Manzana sin piel	0,24	0,59	70,3	51
Manzana con piel	0,40	0,56	84,4	122

\* Nivel de significación,  $\alpha < 0,001$

Los valores de  $n$  obtenidos menores a la unidad ( $0,23 \leq n \leq 0,59$ ) son descriptivos de curvas de inactivación con una concavidad hacia arriba y cola marcada, haciéndose esta concavidad ( $n$  más chicos) más notoria en peras, donde el tratamiento resultó más efectivo, reduciendo el tiempo de tratamiento para la inactivación de *L. innocua* tanto en pera con piel como sin piel comparado con manzana.

La **Figura 4.3.3** 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 4.3.3.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 4.3.3.b**) se observa, en general para todas las condiciones, una distribución de los residuales uniforme y horizontal en torno de los valores predichos, hecho que indica homocedasticidad, tal como se explica detalladamente en **Apéndice Estadístico, apartado 6.4**. En ningún caso se observó forma de cono o herradura.

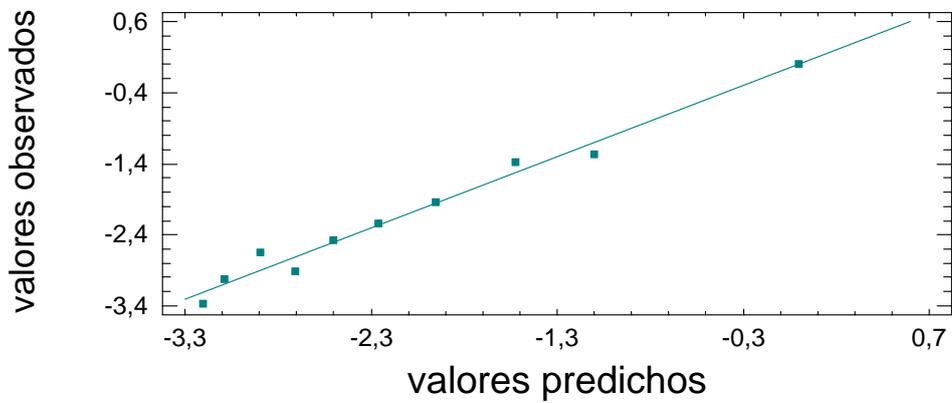
Los valores de los parámetros  $b$  y  $n$  fueron utilizados para obtener las distribuciones de frecuencias de resistencias de *L. innocua* (**Figura 4.3.4**), calculando los estadísticos asociados a cada distribución (**Tabla 4.3.2**). Se obtuvieron distribuciones de frecuencias de resistencias con un mismo patrón: sin moda, sesgadas a la derecha y con presencia de cola. El análisis de las mismas indicó la mayor eficiencia del proceso de inactivación de *L. innocua* inoculada en pera respecto de manzana, puesto en evidencia por la obtención de una distribución de frecuencias más estrecha y sesgada, siendo aún más eficiente el proceso en el fruto sin piel con una distribución con menor valor de media (**Figura 4.3.4 y Tabla 4.3.2**). Si bien se observa en la distribución una cola en todos los casos, esta se hace más marcada en el caso de manzana.

**Figura 4.3.3** Validación interna del modelo propuesto que relaciona el número de reducciones logarítmicas de *L. inocua* en rodajas de fruta sometidas a irradiación con luz UV-C durante 20 min (dosis 9,9 kJ/m<sup>2</sup>).

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

#### Pera sin piel

a)



b)

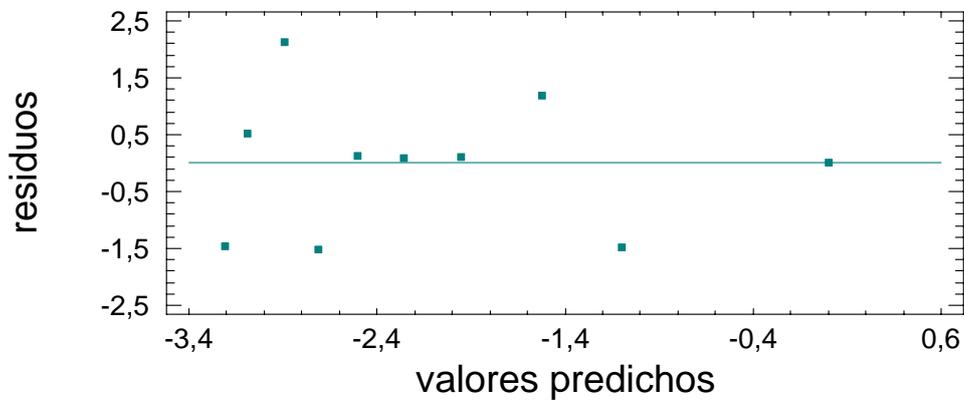
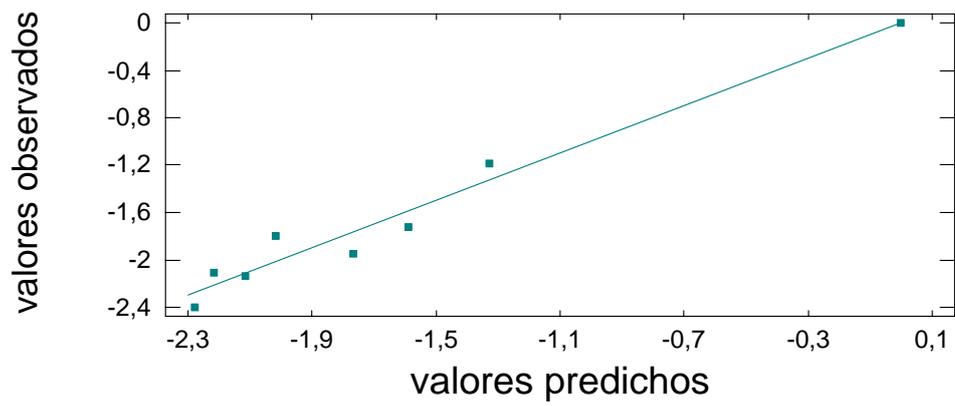


Figura 4.3.3 (continuación)

## Pera con piel

a)



b)

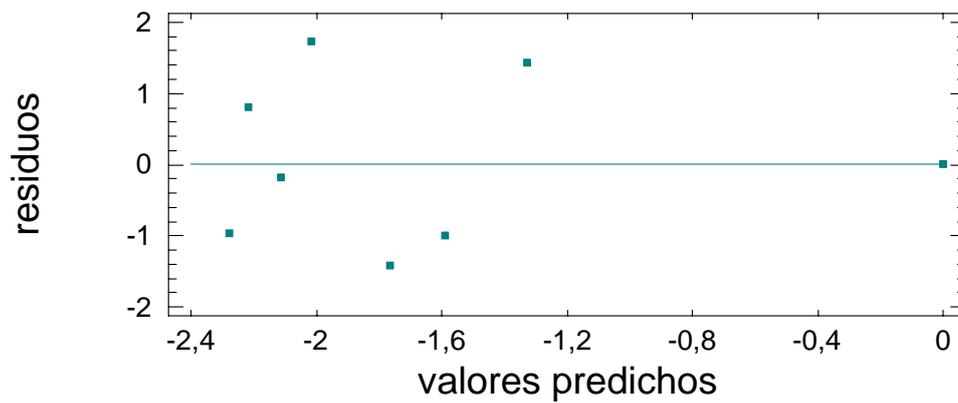
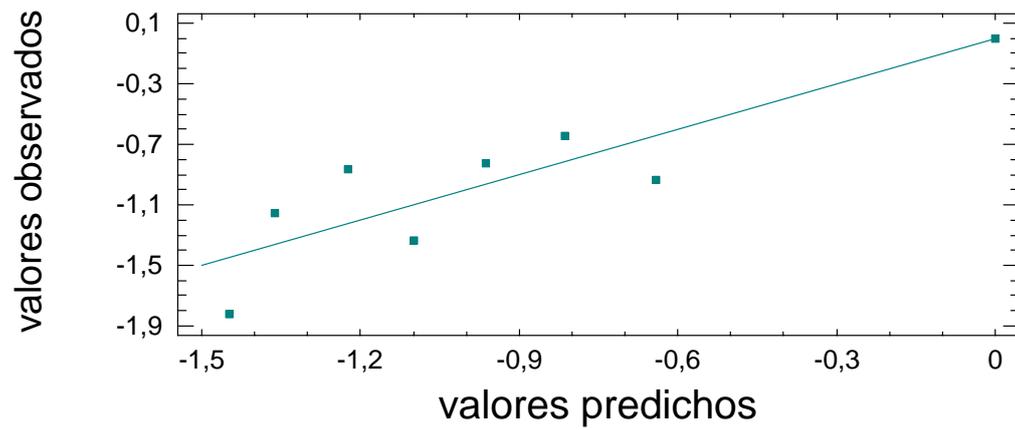


Figura 4.3.3 (continuación)

## Manzana sin piel

a)



b)

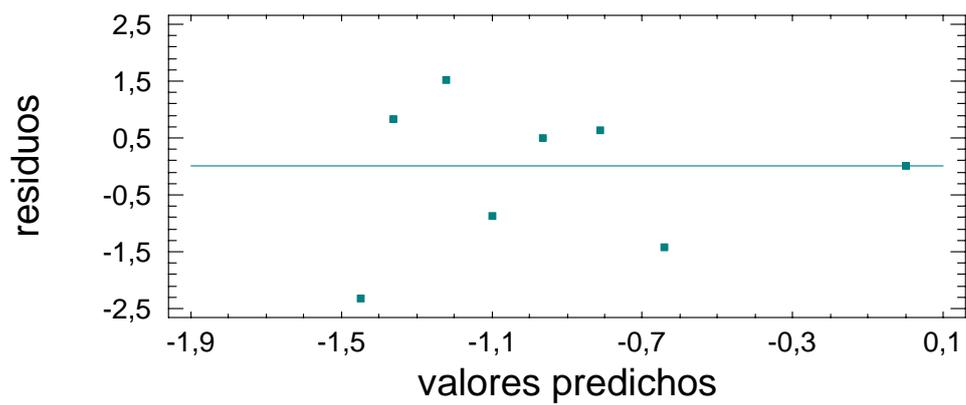
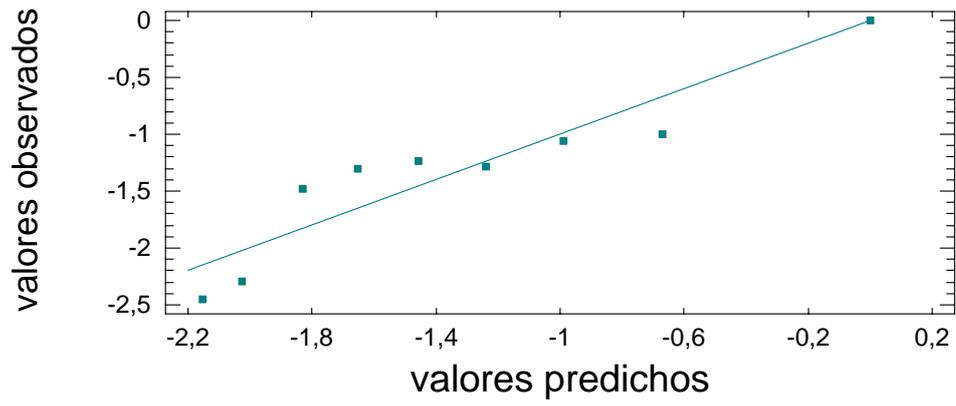


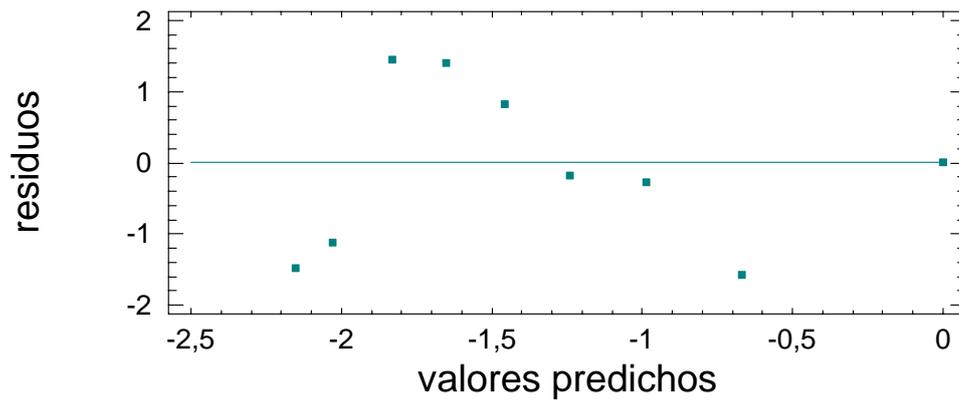
Figura 4.3.3 (continuación)

## Manzana con piel

a)

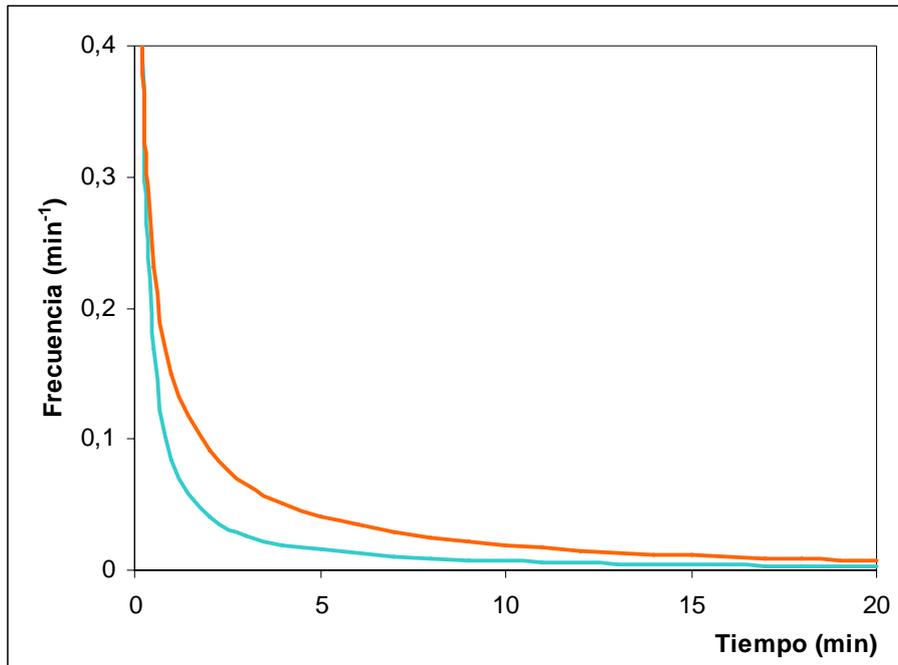


b)

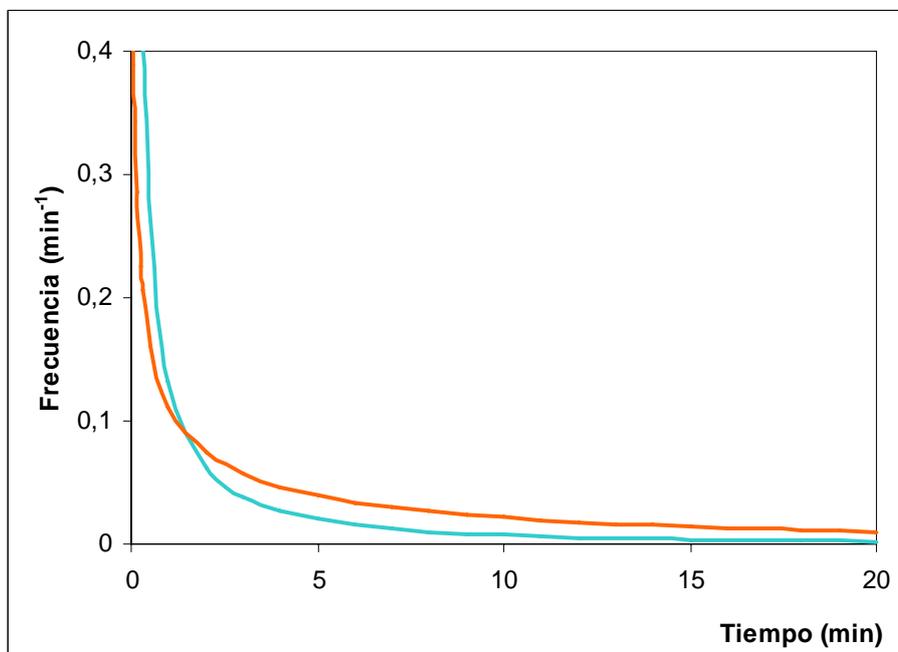


**Figura 4.3.4** Distribuciones de frecuencias de resistencias calculadas según el modelo de Weibull para la inactivación de *L. innocua* en frutas tratadas con radiación UV-C hasta 20 min (dosis 9,9 kJ/m<sup>2</sup>). a) con piel, b) sin piel. (—) pera, (—) manzana.

a)



b)



**Tabla 4.3.2** Análisis estadístico de las curvas de distribución de frecuencias de resistencias para la inactivación de *L. innocua* en distintas frutas sometidas a irradiación con luz UV-C.

Sistema	Moda (min)	Media (min)	Varianza (min <sup>2</sup> )	Coefficiente de sesgo (-)
Pera sin piel	-	3,5	++	14,6
Pera con piel	-	15,8	++++	49,5
Manzana sin piel	-	17,3	++	4,4
Manzana con piel	-	8,5	++	4,8

++ valor del estadístico mayor a 100  
 ++++ valor del estadístico mayor a 10000

Este hecho podría explicar que en estos sistemas buena parte de la población se muere a tiempos cortos y conforme avanza el tiempo de tratamiento la proporción de la población remanente que muere es menor (Peleg y Cole, 1998). Además la carencia de moda refleja también que la mayor parte de la población es destruida en muy corto tiempo.

Por lo observado en estos resultados y por ser más escasos los estudios de investigación realizados en pera, se decidió continuar con el estudio de la inactivación por irradiación con luz UV-C eligiendo pera con y sin piel como matriz de estudio.

#### **4.3.2- Inactivación microbiana en pera mediante luz UV-C. Inóculos simples**

Una vez seleccionada la matriz con la que se continuaría trabajando, se procedió a estudiar la respuesta de inactivación de diferentes poblaciones microbianas expuestas a radiación con luz UV-C.

##### **4.3.2.1- Curvas de inactivación**

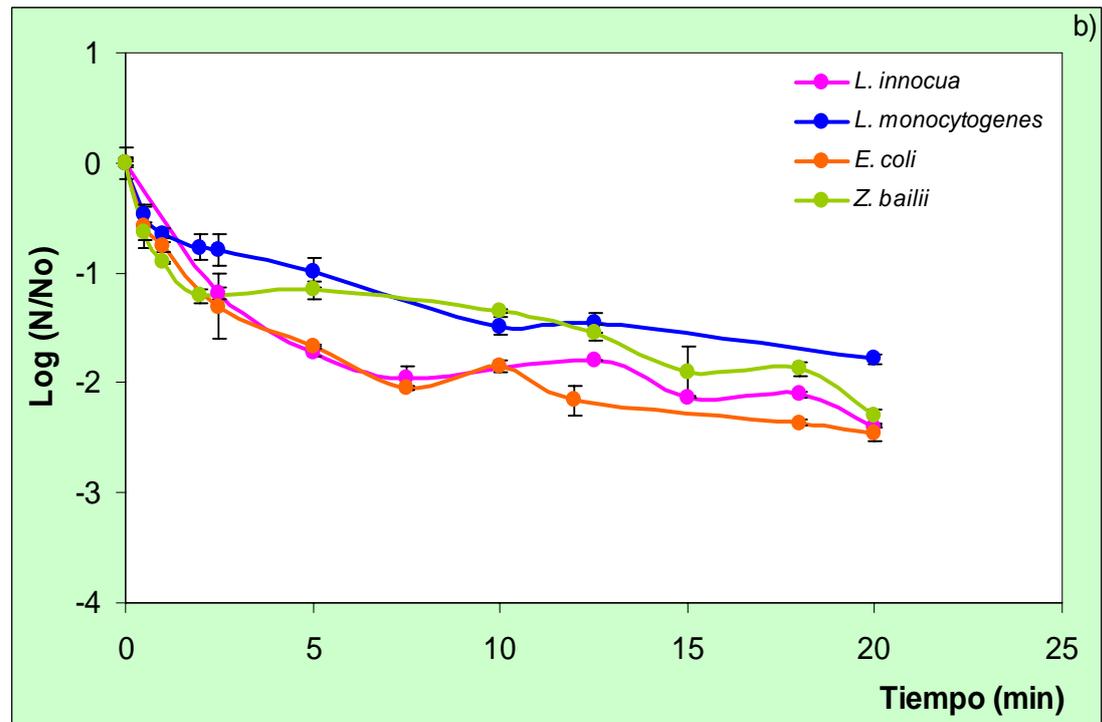
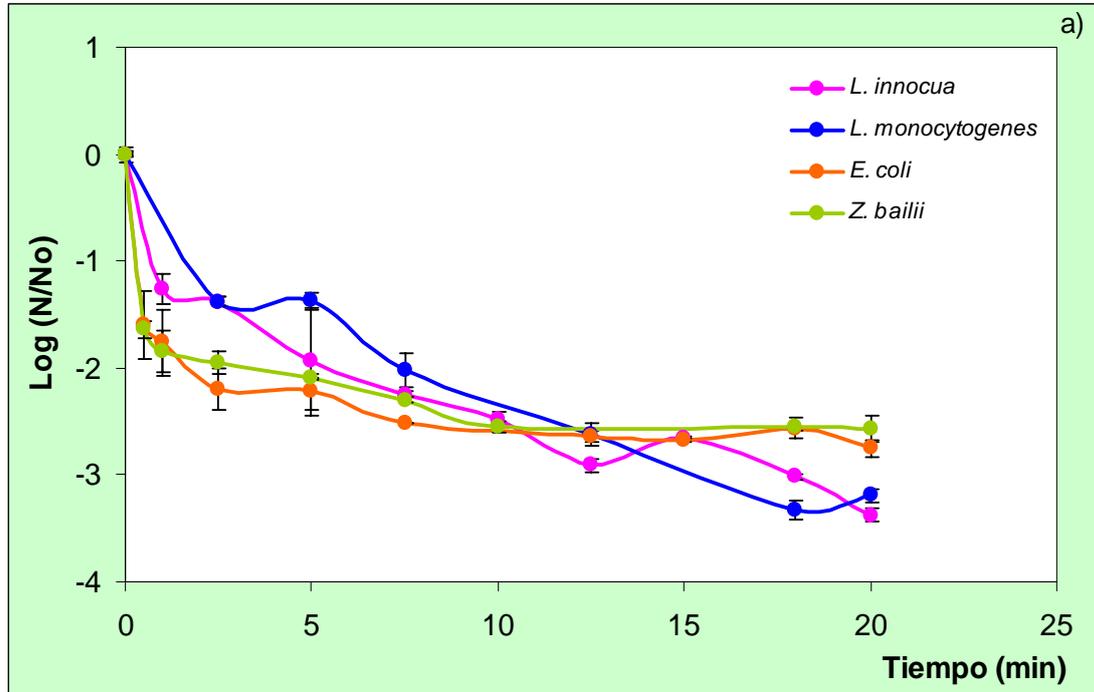
La **Figura 4.3.5** presenta los resultados obtenidos a partir del estudio de la respuesta de inóculos simples de *L. innocua* ATCC 33090, *L. monocytogenes* ATCC 19114 D, *E. coli* ATCC 11229 y *Z. bailii* NRRL 7256 en rodajas de pera con y sin piel tratadas con radiación UV-C hasta 20 minutos ( $9,9 \text{ kJ/m}^2$ ), tal como se describe en **Materiales y Métodos, apartado 3.8.1.3**.

En todos los casos las curvas de inactivación mostraron una caída más abrupta en los primeros minutos de tratamiento con luz UV-C, sin la presencia de un hombro y luego una desaceleración con menor pendiente, observándose también que la presencia de piel en las rodajas modifica los perfiles de las curvas. La aplicación del tratamiento de irradiación con luz UV-C fue más efectiva en pera sin piel alcanzándose entre 2,6 y 3,4 reducciones logarítmicas, mientras que en pera con piel se obtuvieron entre 1,8 y 2,5 reducciones logarítmicas.

*L. innocua* y *L. monocytogenes* fueron los microorganismos más sensibles en rodajas de pera sin piel sometidas a radiación UV-C por más de 10 minutos (5 kJ/m<sup>2</sup>), mostrando un perfil similar en la curva de supervivencia (**Figura 4.3.5.a**). En contraste, a tiempos menores a 10 minutos, los microorganismos más sensibles fueron *E. coli* y *Z. bailii*.

Cuando los microorganismos fueron inoculados en pera con piel (**Figura 4.3.5.b**), el patrón de inactivación cambió. En su conjunto, los microorganismos mostraron una menor pero constante disminución en su población a medida que la dosis de UV-C se incrementó. *E. coli* y *L. innocua* fueron las especies más sensibles, mientras que escasas diferencias fueron observadas para *L. monocytogenes* y *Z. bailii*.

**Figura 4.3.5** Curvas de inactivación de microorganismos inoculados en pera (a) sin piel y (b) con piel, sometidos a radiación con luz UV-C hasta 20 minutos ( $9,9 \text{ kJ/m}^2$ ).



Es notoria la diferencia en las curvas de inactivación obtenidas para las distintas especies de *Listeria* dependiendo de la presencia de piel. En rodajas de pera con piel *L. innocua* no mostró adecuarse como subrogante de *L. monocytogenes*, mientras que en pera sin piel sí. Esto podría deberse a que al cambiar la superficie en la cual se inoculan las bacterias, la composición de la matriz puede afectar la interacción con la bacteria, ocasionando que la inactivación no sea la misma. Char, (2006) demostró que en jugo de naranja procesado térmicamente, *L. innocua* ATCC 33090 podía utilizarse como subrogante de *L. monocytogenes*. ATCC 19114. Mientras que otros autores (Friedly y col., 2008) aplicaron tratamiento térmico en hamburguesas y utilizaron cuatro cepas de *Listeria* no patógenas, de las cuales en ese alimento sólo dos de ellas fueron subrogantes de *L. monocytogenes* F4243.

En este estudio, el uso de luz UV-C para reducir diferentes poblaciones microbianas condujo a la formación de curvas con concavidad hacia arriba y un pronunciado efecto de cola, caso que también fue reportado por otros autores que aplicaron luz UV-C para inactivar bacterias y levaduras en jugos de manzana (FDA, 2000a; Mytilinaki, 2008; Char y col., 2008). Yaun y col., (2004) estudiaron la inhibición por radiación con luz UV-C sobre algunos patógenos inoculados en tomate, lechuga y manzana, alcanzando una reducción logarítmica máxima de 3,3 ciclos log para *E. coli* O157:H7 inoculada en manzana (dosis 0,24 kJ/m<sup>2</sup>). Al igual que en este trabajo, estos autores observaron en todos los experimentos curvas de supervivencia con una cola bien definida.

Los resultados aquí obtenidos no muestran la presencia de un hombro para la inactivación con luz ultravioleta, como es mencionado por otros autores (Yousef y Marth, 1988). La exposición inicial de los microorganismos a la luz UV-C, se cree que le produce injuria celular (FDA, 2000b). A medida que se incrementa la dosis de UV-C recibida, ocurren mutaciones en el ADN formando dímeros de pirimidinas en bases adyacentes impidiendo la replicación celular. La muerte celular ocurre luego de pasar un umbral de daño excesivo al ADN (EPA, 1999).

La cola que se observa en las curvas de inactivación por luz UV-C ha sido explicada de diferentes maneras. Una de las explicaciones es la del fenómeno de múltiple golpe, descrita por Yousef y Marth (1988), donde se atribuye 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. De acuerdo con

esta teoría las células menos resistentes se inactivan al principio del tratamiento, dejando a los individuos más resistentes. Esto demuestra la heterogeneidad en la resistencia de la población microbiana a la acción por UV (Block, 2000). Otra explicación del efecto cola, es que sería causada por sólidos que podrían bloquear la irradiación con UV (FDA, 2000), estos podrían ser partículas de la pera y otros contaminantes ambientales como polvo y suciedad.

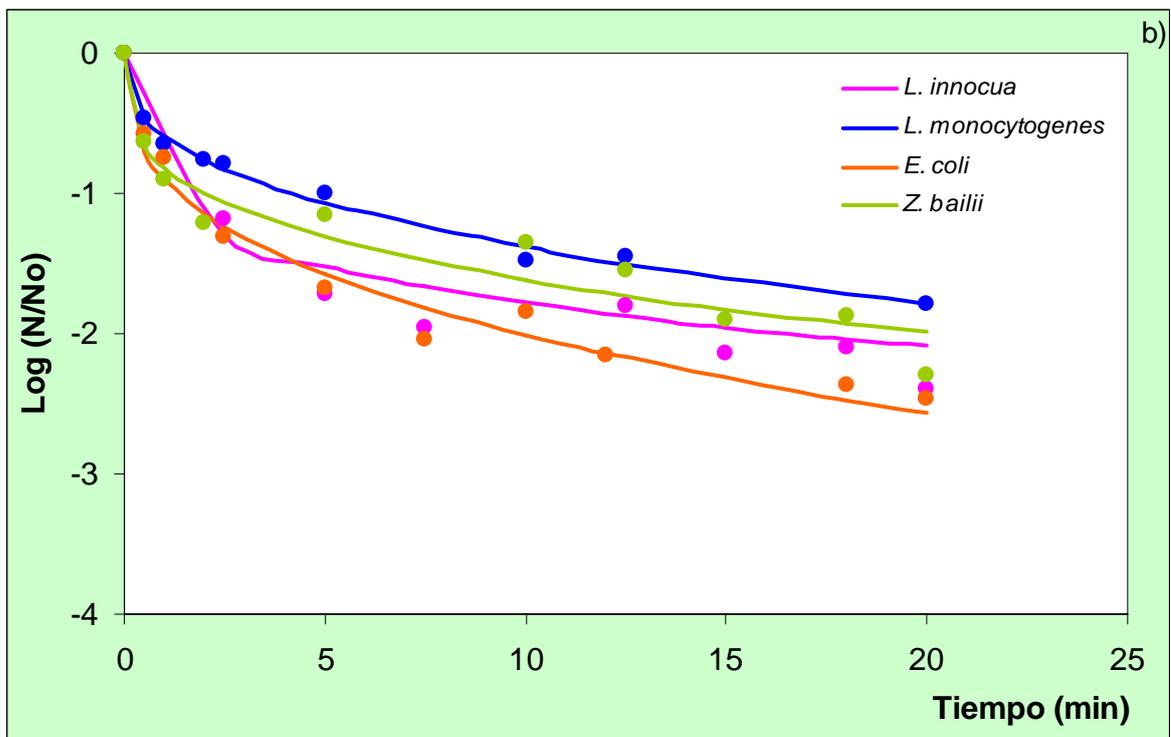
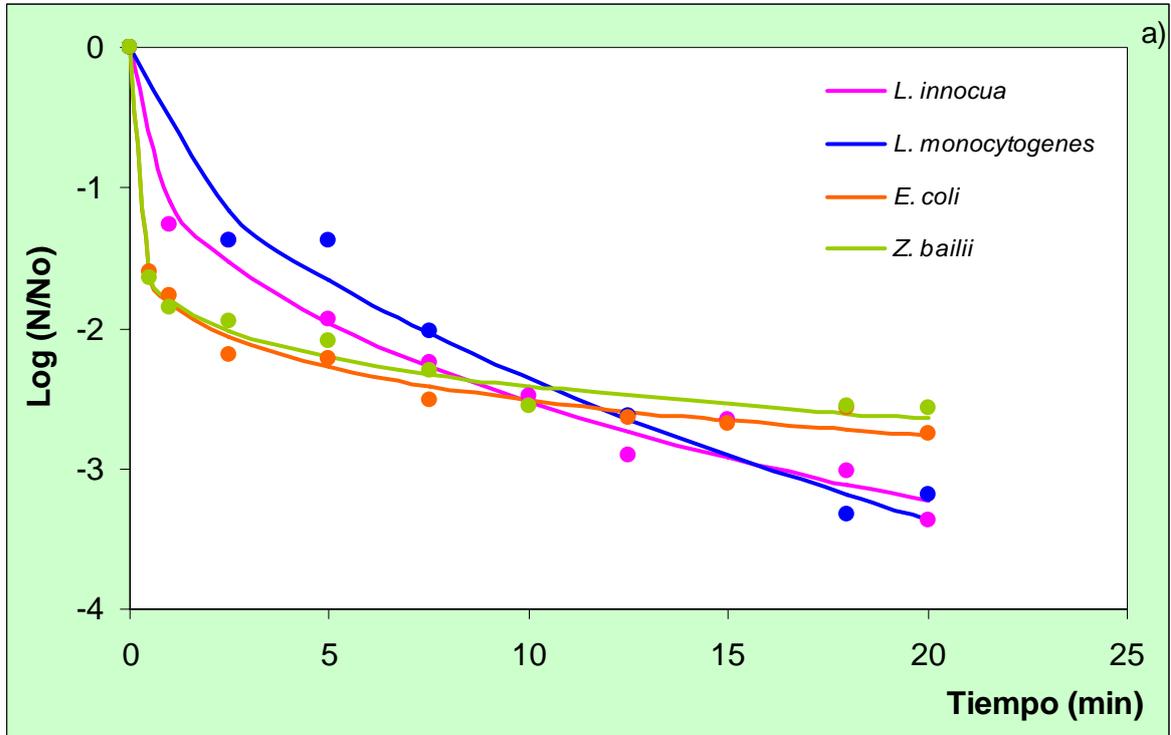
#### **4.3.2.2- Aplicación del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull**

La **Figura 4.3.6** muestra las curvas predichas por el modelo de Weibull, junto a los datos experimentales de las curvas de inactivación en rodajas de pera con y sin piel. Las curvas experimentales se correlacionan adecuadamente con los datos predichos, el alto coeficiente de determinación ( $R_{aj}^2$ ) implica que entre el 92,2 y 99% de la variación obtenida puede ser explicada por el modelo elegido (**Tabla 4.3.3 y 4.3.4**). Estos resultados pueden ser aceptados como una buena correlación considerando la heterogeneidad del sistema experimental ensayado y la técnica de inoculación empleada. Los valores de  $n$  menores a la unidad que muestran las tablas están en concordancia con la notoria concavidad hacia arriba que poseen las curvas.

La distribución de Weibull es un modelo no lineal flexible que ha sido demostrado describir bien la inactivación de microorganismos por diversos factores, como ser calor (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., 2004) y ultrasonido de alta intensidad (Guerrero y col., 2005; Ferrante y col., 2007).

Este modelo considera que hay heterogeneidad entre las células de la población, y que una célula estará viva o muerta por causa del agente letal ya sea calor, desinfectantes, presión o radiación. Es poco probable que todas las células posean el mismo comportamiento. El tiempo de inactivación varía en cierta medida para cada microorganismo dentro de la población, incluso si la población es pura (van Boekel, 2002).

**Figura 4.3.6** Aplicación del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull a las curvas de inactivación de microorganismos inoculados en rodajas de pera sometidas a luz UV-C (dosis 9,9 kJ/m<sup>2</sup>). a) sin piel y b) con piel. (-) valores predichos; (●) datos experimentales.



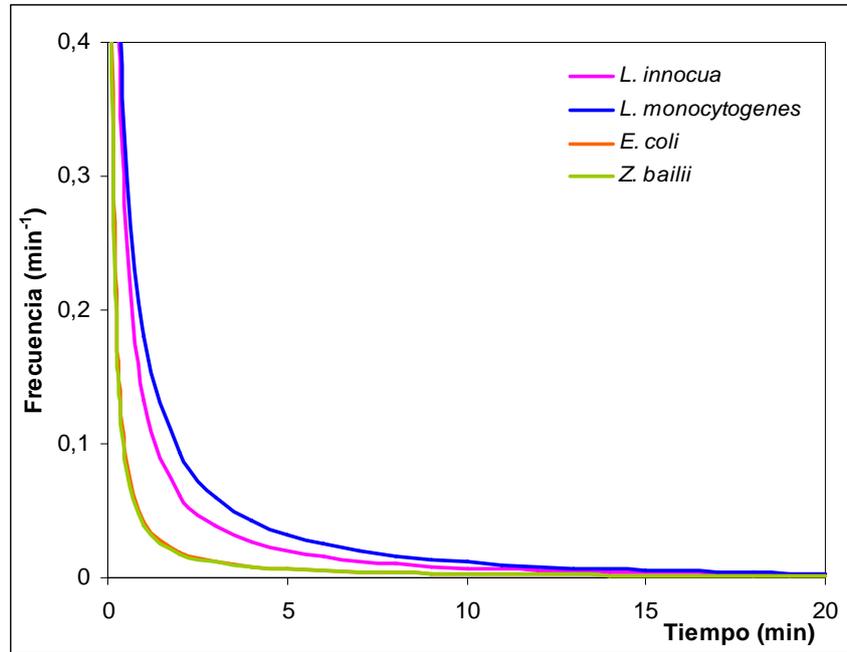
En consecuencia, se puede asumir que las curvas de supervivencia son la subyacente distribución de los efectos acumulativos de cada tiempo de inactivación (Peleg y Cole, 1998).

Los valores de los parámetros  $b$  y  $n$  fueron utilizados para obtener las distribuciones de frecuencias de resistencias de los distintos microorganismos sobre pera con y sin piel (**Figura 4.3.7**), y se calcularon los estadísticos asociados a cada distribución (**Tabla 4.3.3 y 4.3.4**). Se puede observar que todas las distribuciones de frecuencia exhiben una forma similar con sesgo hacia la derecha, con una considerable dispersión de datos, con cola, sin moda y con altos valores de varianza. De esta manera se evidencia que la mayor parte de la población fue destruida a tiempos cortos de exposición a la radiación con luz UV-C, mientras que una fracción de los microorganismos sobrevivió después de haberse aplicado el tratamiento (Peleg y Cole, 1998).

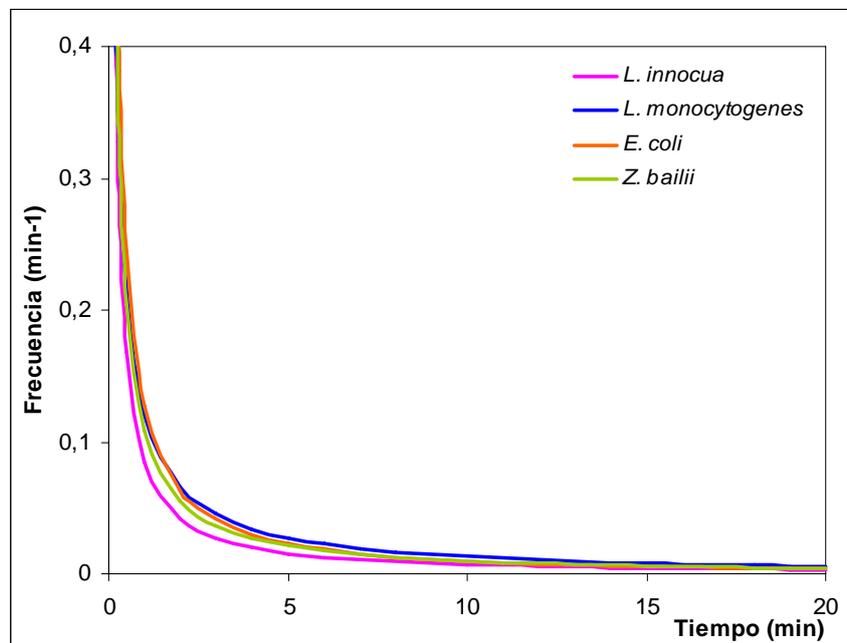
Los altos valores de varianza y sesgo podrían estar relacionados con el hecho de que los microorganismos estén ligados a la superficie de la pera durante el tratamiento con luz UV-C y que dada la irregularidad de la misma, las células no reciben un tratamiento equitativo.

**Figura 4.3.7** Distribuciones de frecuencias de resistencias calculadas según el modelo de Weibull para la inactivación de microorganismos en rodajas de pera tratadas con radiación UV-C hasta 20 min, a) sin piel, b) con piel.

a)



b)



### 4.3.3- Inactivación microbiana en pera mediante luz UV-C. Inóculos mixtos

#### 4.3.3.1- Curvas de inactivación

En esta etapa, se llevaron a cabo estudios de inactivación de microorganismos en cultivos mixtos con el fin de observar si el tratamiento aplicado produce los mismos efectos que al cultivo simple, o si hay variaciones en la respuesta de inactivación debido a la interacción célula-célula mediante autoinductores (moléculas liberadas al medio), ó “quorum sensing” en el habla inglesa, (Miller y Bassler, 2001; Waters y Bassler, 2005) que pudiera manifestarse entre las distintas especies que se inocularon en pera con y sin piel.

Para este análisis se utilizaron inóculos simples de *L. innocua* ATCC 33090, *L. monocytogenes* ATCC 19114 D y *Z. bailii* NRRL 7256, cuyo comportamiento se describió en la sección anterior, pero se los volvió a colocar en los gráficos para una mejor comparación; y los siguientes inóculos mixtos:

**Cóctel 1-** *L. monocytogenes* ATCC 19114D, *L. monocytogenes* ATCC 7644

**Cóctel 2-** *L. innocua* ATCC 33090, *L. innocua* CIP 8011, *L. welshimeri* BE 313/01

**Cóctel 3-** *Z. bailii* NRRL 7256, *Z. rouxii* ATCC 52519, *D. hansenii* NRRL 7268

La inoculación sobre las rodajas de pera y la aplicación del tratamiento se realizó como se detalla en **Materiales y Métodos, apartado 3.8.1.3**. En la **Figura 4.3.8**, se muestran los resultados de las curvas de inactivación de los inóculos simples con su respectivo inóculo mixto en pera con y sin piel.

Las curvas de supervivencia de los inóculos mixtos obtenidas por el tratamiento con irradiación UV-C dieron de forma similar ( $n < 1$ ) que los inóculos simples, pero los patrones de resistencia fueron muy dependientes del microorganismo y de la presencia o no de piel en la fruta, a lo largo del tratamiento. En rodajas de pera sin piel, los inóculos mixtos de *L. monocytogenes* y *L. innocua* mostraron un comportamiento similar, siendo marcadamente más resistente que los cultivos individuales a altas dosis de UV-C. En cambio, en rodajas de pera con piel, el patrón de resistencia fue diferente para *L. monocytogenes* que mostró ser más resistente que el inóculo mixto.

**Figura 4.3.8** Curvas de inactivación correspondiente a microorganismos de (●) inóculos simples e (●) inóculos mixtos, inoculados sobre rodajas de pera (a, c, e) con piel y (b, d, f) sin piel, sometidos a radiación con luz UV-C hasta 20 minutos.

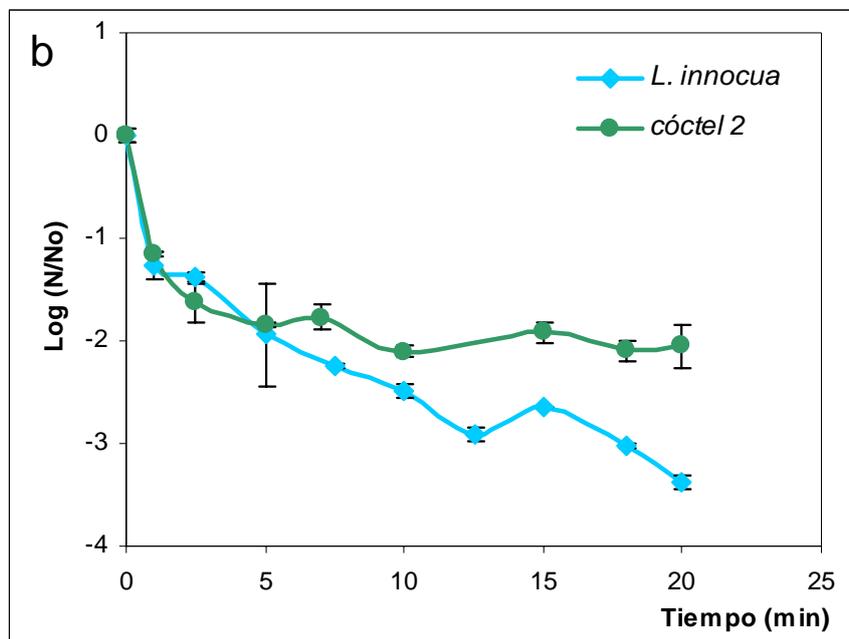
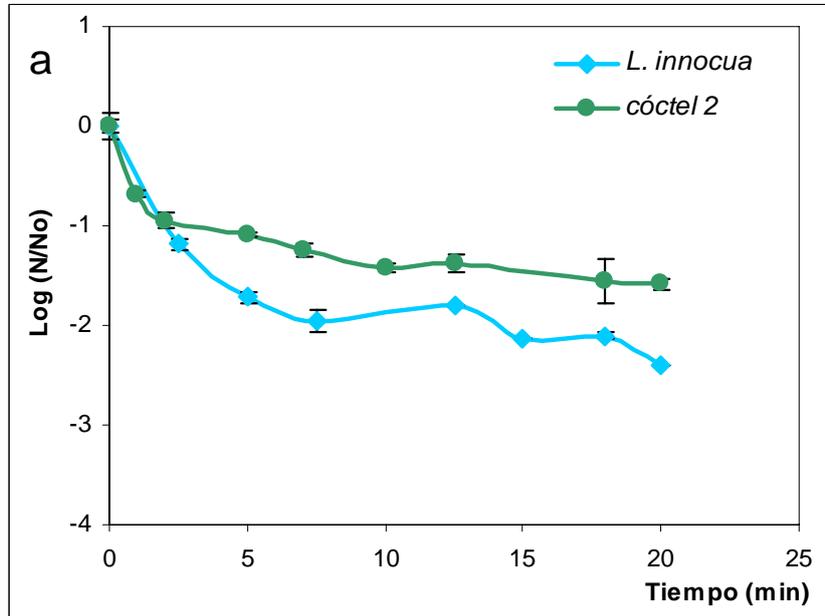


Figura 4.3.8 (continuación)

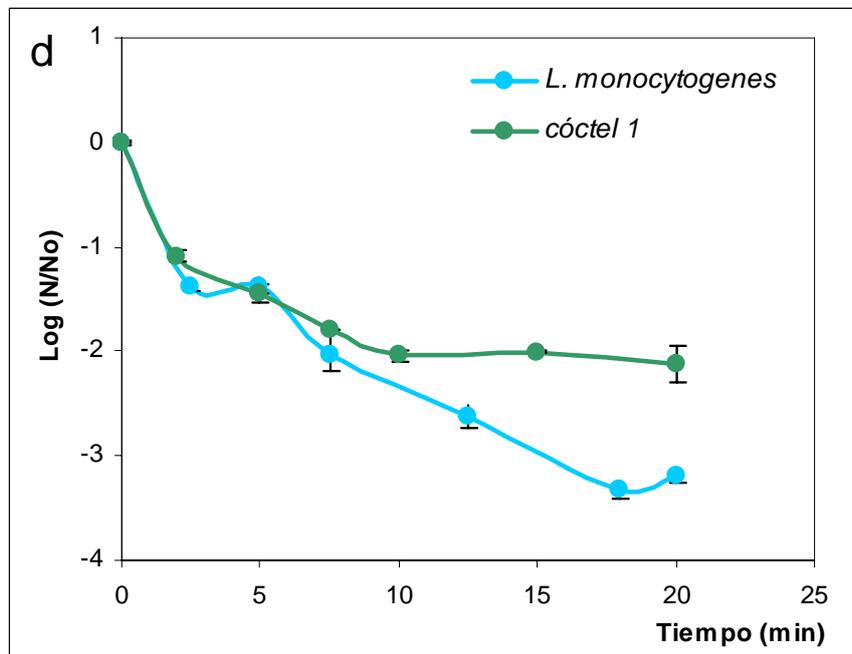
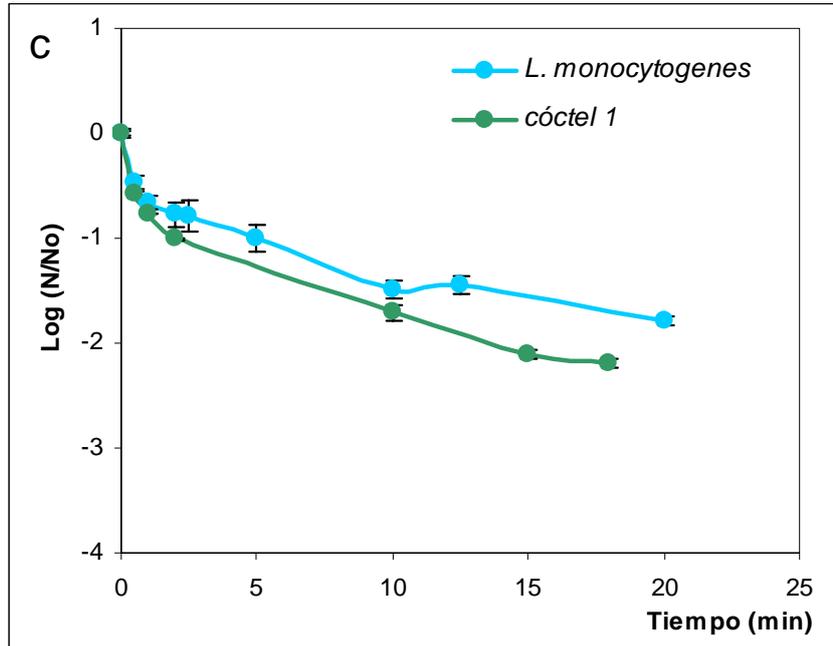
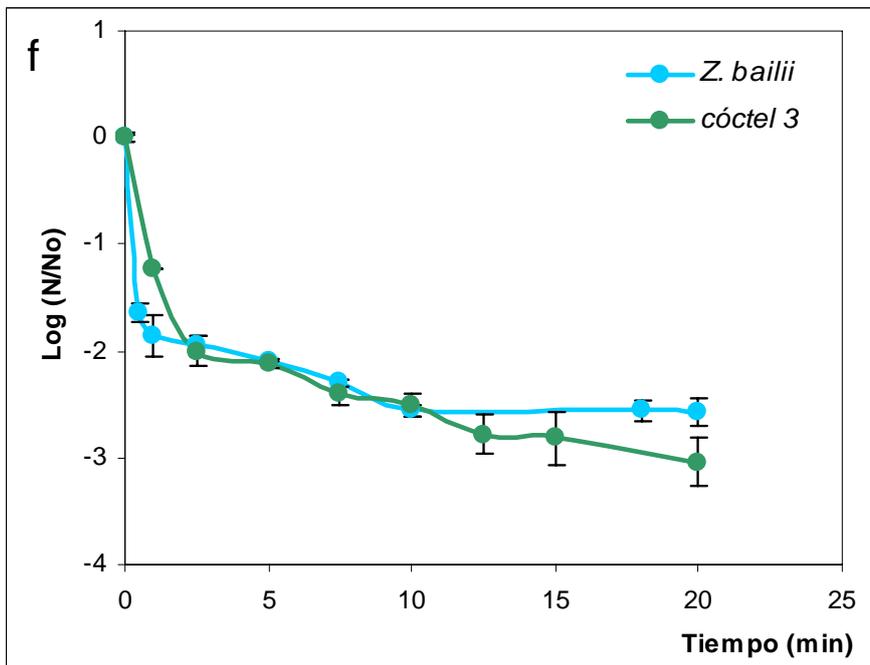
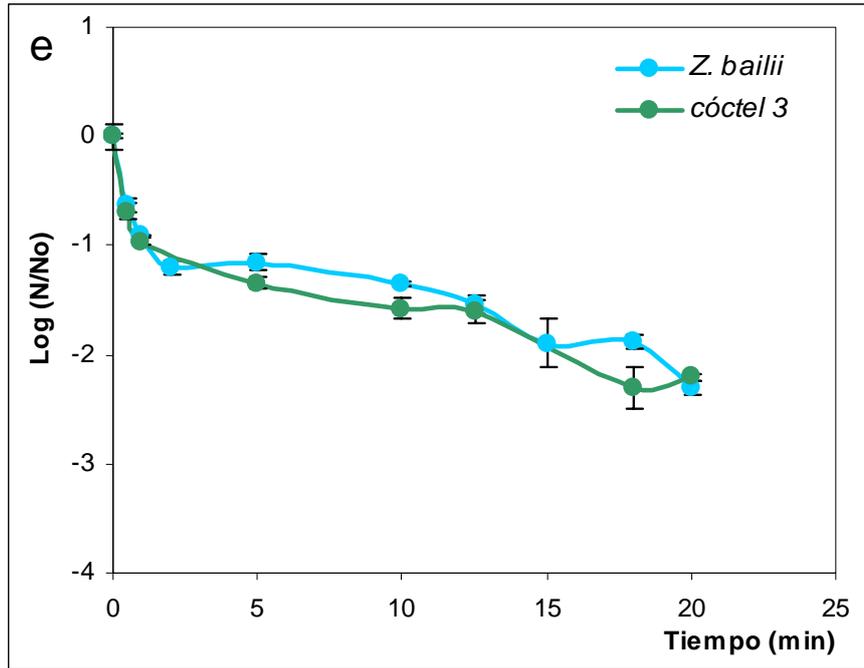


Figura 4.3.8 (continuación)



Las curvas de inactivación correspondientes a *Z. bailii* y el inóculo mixto sometidos a luz UV-C mostraron respuestas muy diferentes de los inóculos bacterianos. En rodajas de pera con piel el patrón de inactivación fue similar tanto para el inóculo simple como el mixto. En cambio, en rodajas de pera sin piel el cóctel de levaduras fue más resistente que el cultivo simple a tiempos cortos de tratamiento (< a 2 min). Sin embargo, a medida que el proceso de irradiación continuaba, una respuesta opuesta fue observada, alcanzando el cóctel de levaduras una reducción de 3 ciclos logarítmicos, mientras que la población de *Z. bailii* permaneció constante (2,5 reducciones logarítmicas) hasta el final del tratamiento.

#### **4.3.3.2- Aplicación del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull**

En la **Figura 4.3.9** se muestran las curvas predichas por el modelo de Weibull, junto a los datos experimentales de las curvas de inactivación para los inóculos simples e inóculos mixtos tratados en rodajas de pera con y sin piel. El coeficiente de determinación ( $R^2_{aj}$ ) tuvo un buen ajuste, entre el 92,2 y 99,8%, de la variación obtenida puede ser explicada por el modelo elegido. El tratamiento resultó, nuevamente, ser más efectivo en rodajas de pera sin piel. Las formas de las curvas de los inóculos mixtos, con  $n < 1$ , dieron similar a los inóculos simples. Si  $n \ll 1$ , puede ser que las células remanentes tengan menos probabilidad de morir, indicando que esas células son resistentes o se adaptaron al estrés. Se observa además en las curvas de distribuciones de frecuencias de resistencias (**Figura 4.3.10**) y **Tablas 4.3.3 y 4.3.4** que al igual que los inóculos simples, tampoco poseen hombro, ni moda, tienen cola, están sesgados hacia la derecha y se obtuvieron grandes valores de varianza. En la literatura no hay información acerca de la aplicación del modelo tipo Weibull a curvas de supervivencia correspondientes a microorganismos inoculados sobre superficies sólidas.

**Figura 4.3.9** Aplicación del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull a las curvas de inactivación de microorganismos inoculados en pera (a, c, e) con piel y (b, d, f) sin piel, sometidas a luz UV-C. (—) valores predichos; (●) datos experimentales.

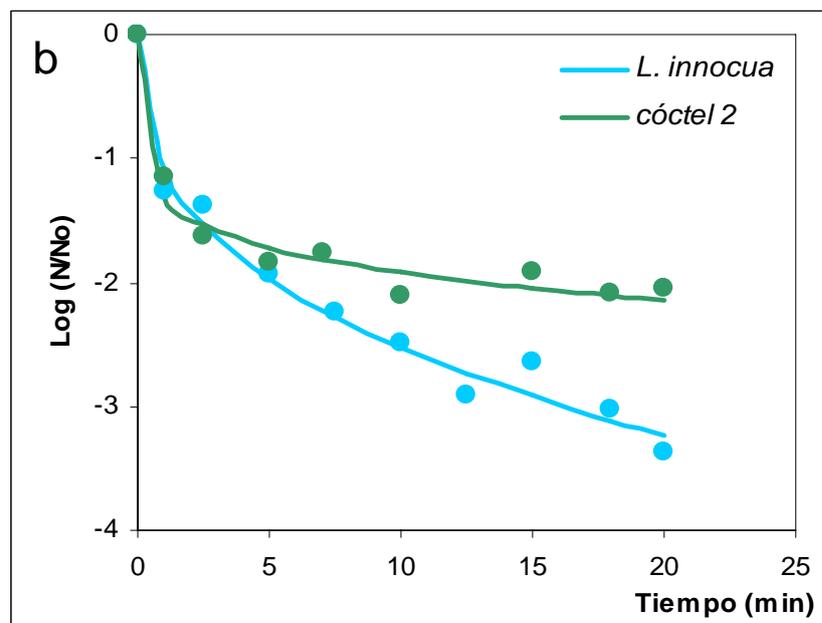
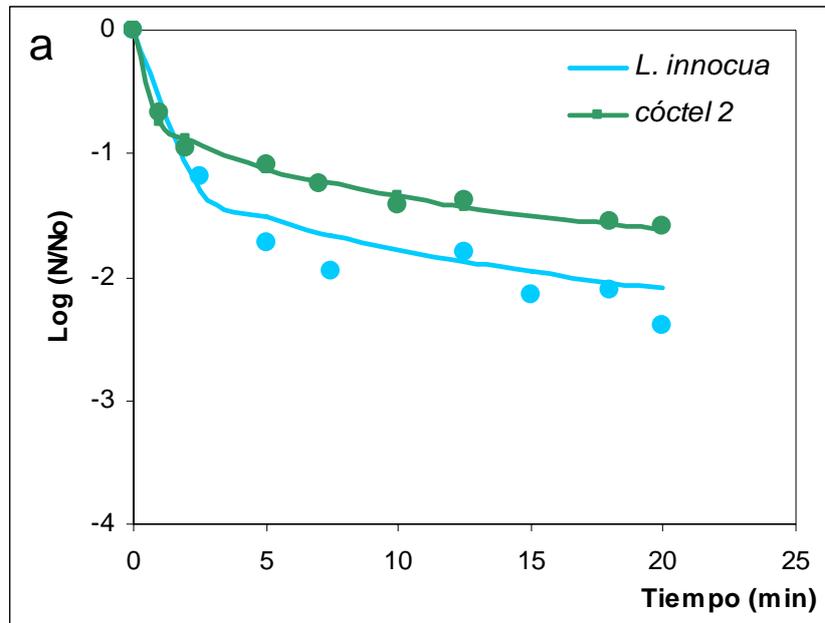


Figura 4.3.9 (continuación)

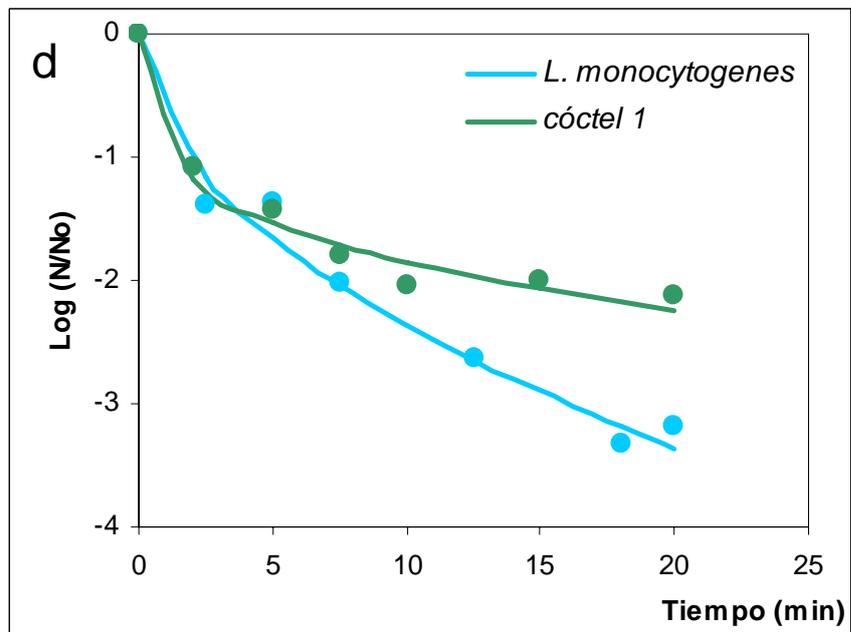
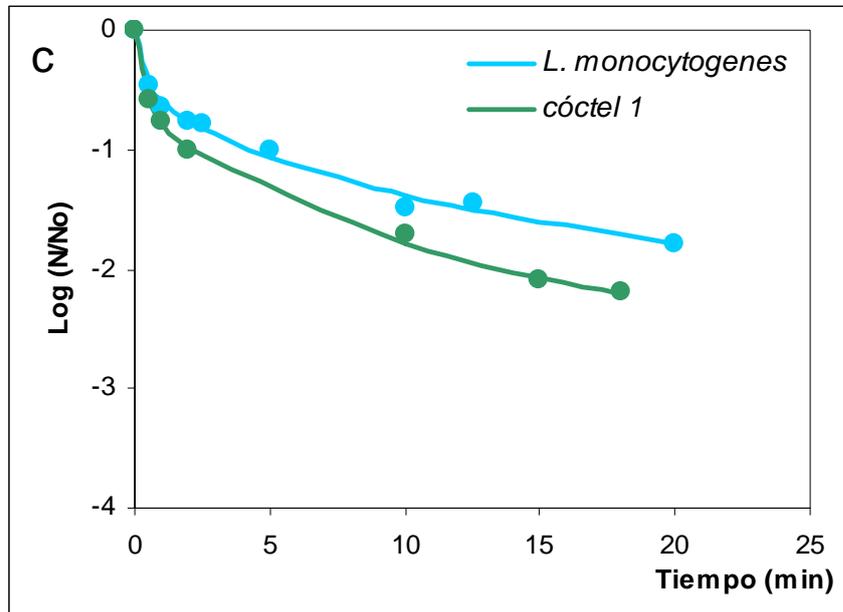
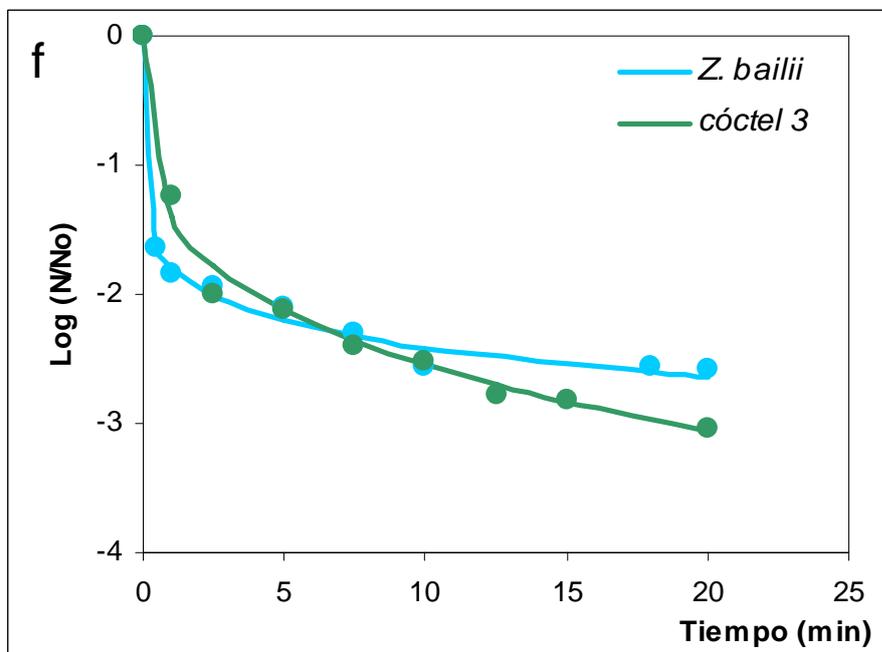
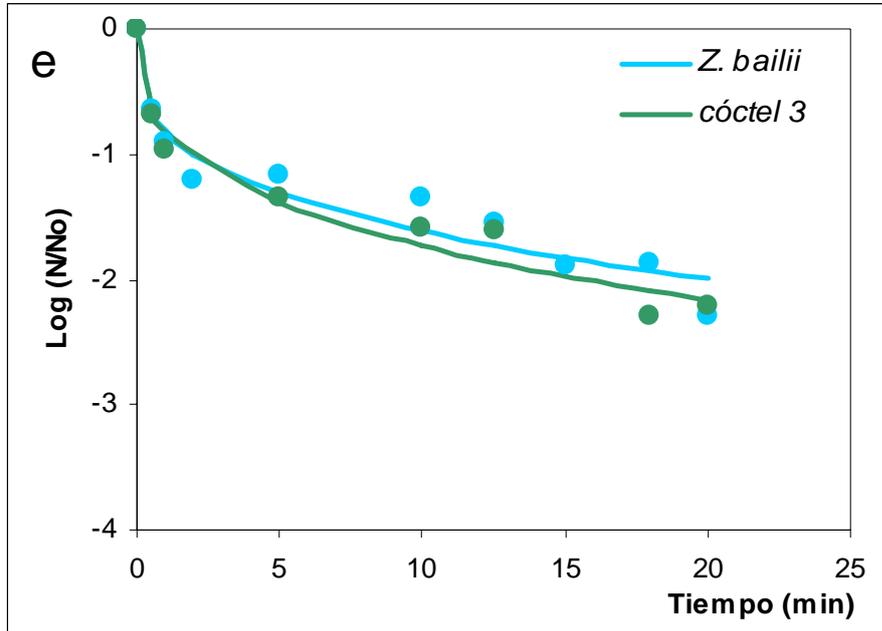


Figura 4.3.9 (continuación)



**Figura 4.3.10** Distribuciones de frecuencias de resistencias calculadas según el modelo de Weibull para la inactivación de microorganismos en pera (a, c, e) con piel y (b, d, f) sin piel, tratada con radiación UV-C hasta 20 min.

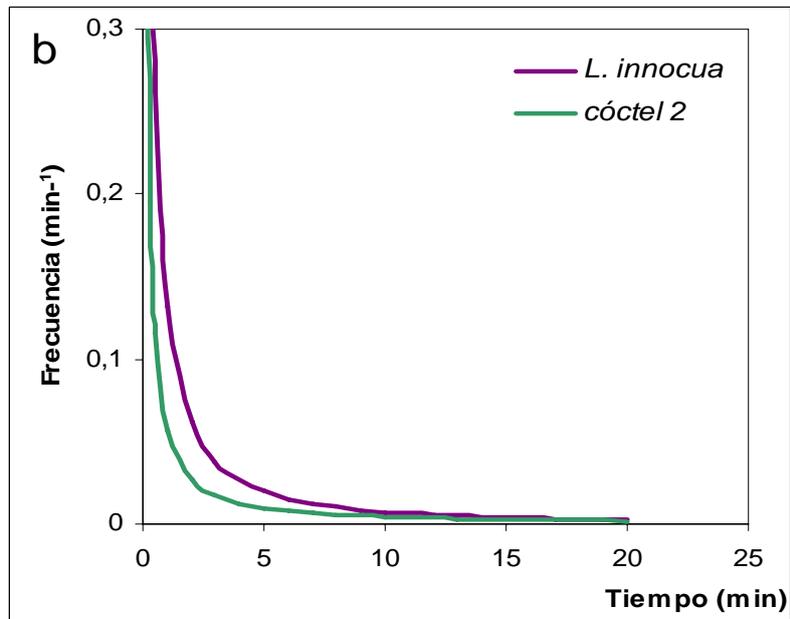
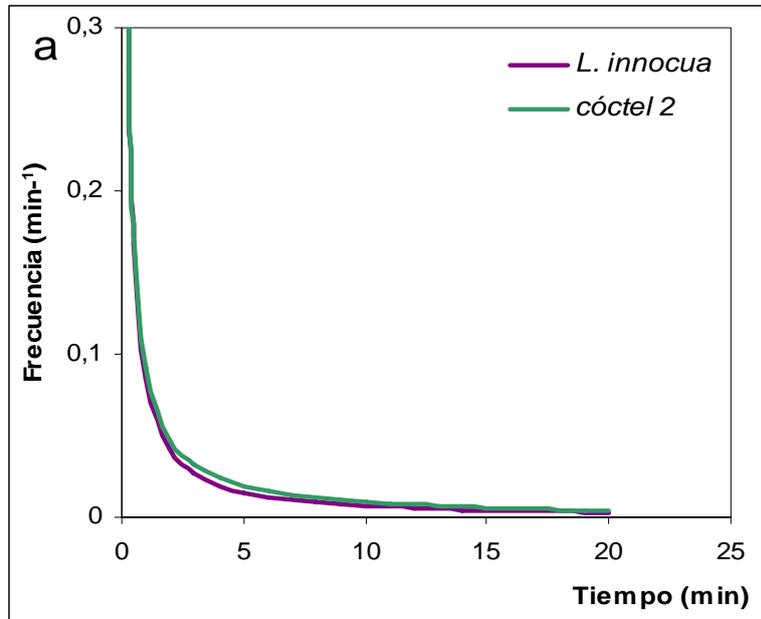


Figura 4.3.10 (continuación)

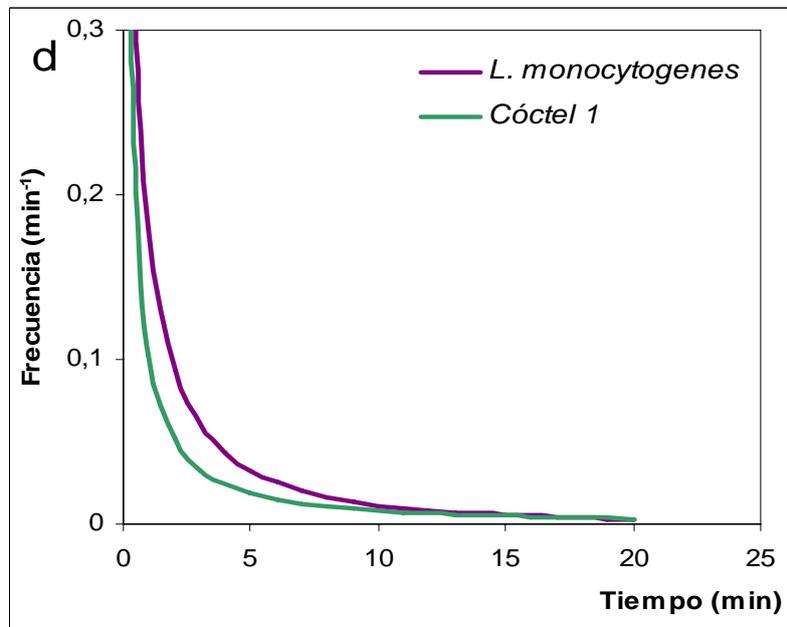
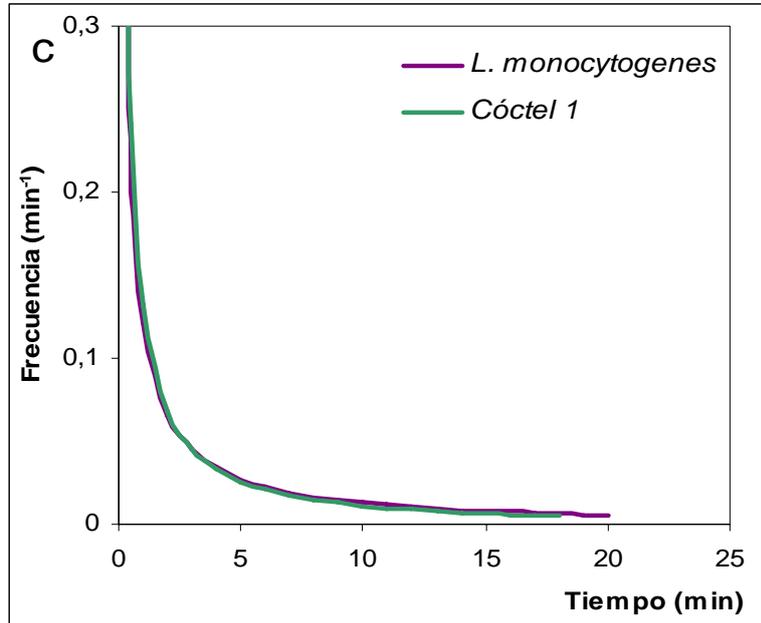
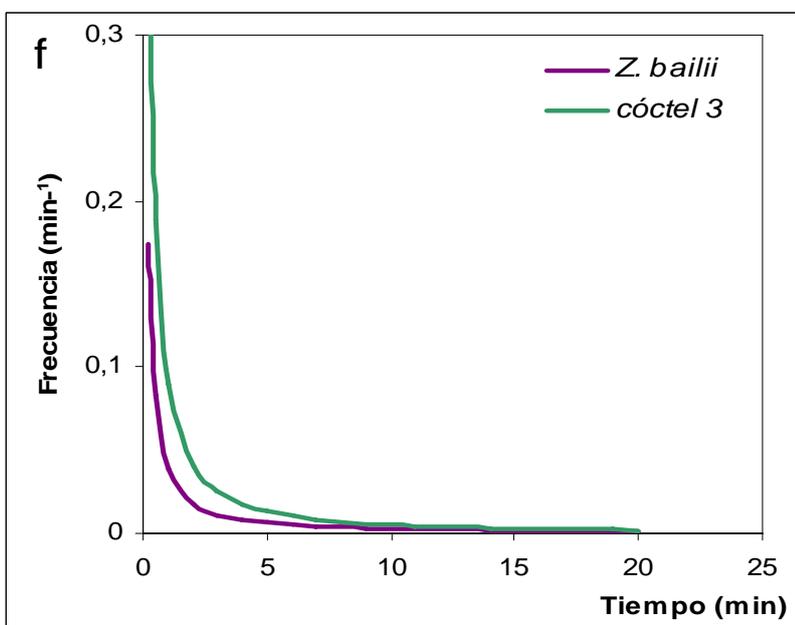
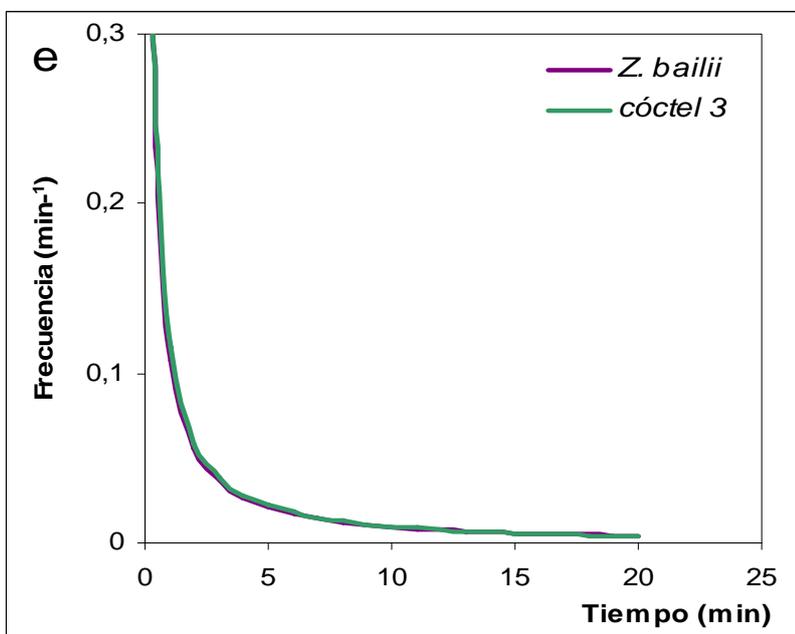


Figura 4.3.10 (continuación)



Algunos estudios hechos en biofilms que forman los mismos microorganismos cuando se adhieren a una superficie, y secretan una sustancia polimérica (de polisacáridos) que las protege del medio externo, mencionan la dificultad de observar una respuesta homogénea debido a distintos factores, como diferencias en la distribución de células en el biofilm y la existencia de una biocapa no uniforme sobre la superficie considerada (Ganesh y Anand, 1998).

Los valores de las modas, medias y varianzas obtenidos por la aplicación del modelo indican **(Tabla 4.3.3 y 4.3.4)**, como se mencionó anteriormente, que la mayor parte de la población murió a tiempos cortos de tratamiento, quedando remanentes las células más resistentes. Es por ello, que para los ensayos posteriores de inactivación por métodos combinados, se eligió un tiempo de tratamiento con luz UV-C de 7,5 minutos ( $3,7 \text{ kJ/m}^2$ ), dado que no hubo una notoria diferencia en la inactivación de los microorganismos a partir de ese tiempo de tratamiento.

**TABLA 4.3.3** Parámetros de la distribución de Weibull,<sup>1,2</sup> correspondiente a microorganismos sobrevivientes irradiados con luz UV-C en rodajas de pera sin piel.

Microorganismo	$b^1$	$n^1$	$R^2_{adj}$	$F^4$	$\bar{t}_c$ (min)	$\sigma^2_{tc}$ (min <sup>2</sup> )	$v_1$ (-)
Inóculos simples							
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114D	0,73±0,11	0,51±0,06	97,5	512	3,6	60,5	5,9
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	1,10±0,09	0,36±0,03	97,8	1187	3,5	175	14,6
<i>Z. bailii</i> NRRL 7256	1,79±0,04	0,13±0,01	99,0	3040	+++	+++	+++
<i>E. coli</i> ATCC 11229	1,82±0,05	0,14±0,01	98,8	3088	+++	+++	+++
Inóculos mixtos <sup>3</sup>							
Cóctel 1	0,97±0,10	0,28±0,04	97,3	622	14,3	+++	36,1
Cóctel 2	1,33±0,09	0,16±0,03	96,3	789	+++	+++	+++
Cóctel 3	1,40±0,07	0,26±0,02	98,7	1909	5,2	+++	49,5

<sup>1</sup> b, n = constantes del modelo Weibulliano;  $R^2_{adj}$  = coeficiente de determinación ajustado;  $\bar{t}_c$  = media de la distribución;  $\sigma^2_{tc}$  = varianza y  $v_1$  = coeficiente de sesgo.

<sup>2</sup> +++: valores del estadístico >100

<sup>3</sup> Cóctel 1: *L. monocytogenes* ATCC 19114 D y *L. monocytogenes* ATCC 7644; Cóctel 2: *L. innocua* ATCC 33090; *L. innocua* CIP 8011 y *L. welshimeri* BE 313/01; Cóctel 3: *Z. bailii* NRRL 7256; *Z. rouxii* ATCC 52519 y *D. hansenii* NRRL 7268.

<sup>4</sup>Nivel de significación,  $\alpha < 0,0001$

**TABLA 4.3.4** Parámetros de la distribución de Weibull correspondiente a microorganismos sobrevivientes irradiados con luz UV-C en rodajas de pera con piel.

Microorganismo	$b^1$	$n^1$	$R^2_{adj}$	$F^4$	$\bar{t}_c$ (min)	$\sigma^2_{tc}$ (min <sup>2</sup> )	$v_1$ (-)
Inóculos simples							
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114D	0,59±0,03	0,37±0,02	98,9	1553	17,4	+++ <sup>2</sup>	13,4
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	1,05±0,14	0,23±0,05	95,8	530	15,8	+++ <sup>2</sup>	49,5
<i>Z. bailii</i> NRRL 7256	0,81±0,10	0,30±0,05	92,2	288	18,7	+++ <sup>2</sup>	27,5
<i>E. coli</i> ATCC 11229	0,90±0,07	0,35±0,03	97,4	803	6,8	+++ <sup>2</sup>	16
Inóculos mixtos <sup>3</sup>							
Cóctel 1	0,76±0,02	0,37±0,01	99,8	5237	8,8	+++ <sup>2</sup>	13,4
Cóctel 2	0,74±0,03	0,26±0,02	99,0	2576	60,8	+++ <sup>2</sup>	49,5
Cóctel 3	0,83±0,10	0,32±0,06	95,7	361	12,6	+++ <sup>2</sup>	21,7

<sup>1</sup> b, n = constantes del modelo Weibulliano;  $R^2_{adj}$  = coeficiente de determinación ajustado;  $\bar{t}_c$  = media de la distribución;  $\sigma^2_{tc}$  = varianza y  $v_1$  = coeficiente de sesgo.

<sup>2</sup> +++: valor del estadístico >100

<sup>3</sup> Cóctel 1: *L. monocytogenes* ATCC 19114 D y *L. monocytogenes* ATCC 7644; Cóctel 2: *L. innocua* ATCC 33090; *L. innocua* CIP 8011 y *L. welshimeri* BE 313/01; Cóctel 3: *Z. bailii* NRRL 7256; *Z. rouxii* ATCC 52519 y *D. hansenii* NRRL 7268. <sup>4</sup>Nivel de significación,  $\alpha < 0,0001$

#### 4.3.4- Citometría de flujo

Con el propósito de determinar el daño causado por la irradiación ultravioleta sobre los microorganismos, se utilizó la técnica de citometría de flujo. Mediante la elección de fluorocromos adecuados, se pudo analizar distintos aspectos de la fisiología celular. En este trabajo se utilizó la fluoresceína diacetato (FDA) para observar la actividad metabólica y el ioduro de propidio (IP) para la integridad de membrana.

##### 4.3.4.1- Optimización de la técnica

Antes de utilizar esta técnica se debieron optimizar algunos parámetros como, la cantidad de células que tiene que contener la muestra a pasar por el citómetro de flujo para una correcta detección (Vives-Rego y col., 2000), volumen de muestra adecuado para la marcación con los fluorocromos y volumen que se debe adicionar de cada uno, dependiendo del microorganismo que se analice y con el propósito de alcanzar una mejor resolución en la medición.

En cuanto al número de células a pasar por el citómetro, se pudo observar que cuando se pasó un número elevado de las mismas se visualizaron manchones de fluorescencia en los gráficos que no se correspondían con la presencia de microorganismos y además quedaron restos de fluorescencia en el tubo de pasaje de células del citómetro que fueron arrastrados cuando se pasó una nueva muestra.

Cuando se pasaron pocas células no se obtuvo un resultado representativo de lo que le ocurría a la población total, además de interferir la relación entre señal/ruido de la fluorescencia. Se concluyó así que la concentración óptima para trabajar era de  $1-5 \times 10^6$  Cel/mL.

Con respecto a los volúmenes de muestra y de fluorocromos necesarios para una adecuada marcación, se probaron distintas combinaciones detalladas en **Materiales y Métodos, apartado 3.13.1.2 y 3.13.1.3**. En levaduras se adoptó la relación de 1 mL de muestra con la concentración seleccionada de  $1-5 \times 10^6$  Cel/mL, a la que se adicionó 2  $\mu$ L tanto de FDA (5 mg/mL en acetona) como de IP (1 mg/mL en agua destilada). Ya que en 1 mL de muestra, hubo buen contacto de FDA con las levaduras, y el fluorocromo pudo difundir a través de la membrana

plasmática, no ocurrió lo mismo con las bacterias. Se observó además en la lectura del citómetro, que si se agregaba demasiada cantidad de ambos fluorocromos, se divisaban manchones de fluorescencia que no se correspondían a células individuales.

Dado que las bacterias poseen una pared celular compleja que dificulta la difusión del fluorocromo FDA hacia el citoplasma, sumado al hecho que además las bacterias Gram-negativas poseen la capa de lipopolisacáridos, se debió ajustar tanto el volumen de muestra como la cantidad de fluorocromo, para que ambos tuvieron buen contacto y los fluorocromos pudieran atravesar la pared celular, ya que estos fluorocromos son ampliamente utilizados en células eucariotas, donde existen claros protocolos de los volúmenes a utilizar. Para los ensayos posteriores en bacterias, se partió, de 1 mL de muestra con la concentración de  $\approx 1-5 \times 10^6$  Cel/mL, la cual se centrifugó y resuspendió en un volumen de 50  $\mu$ L de buffer fosfato (PBS) y se añadieron 20  $\mu$ L de FDA, para que esté en mayor contacto con las células y pueda difundir con más facilidad y 4  $\mu$ L de IP. Los volúmenes elegidos produjeron la mayor eficacia cuando se observaron los resultados en el citómetro de flujo.

#### **4.3.4.2- Análisis de microorganismos tratados con luz UV-C mediante citometría de flujo**

Para visualizar mejor el daño causado por la radiación UV-C, sin la interferencia del tejido vegetal de la pera, se irradiaron suspensiones microbianas en una solución de agua de peptona tal como se detalla en **Materiales y Métodos, apartado 3.13.2**. Posteriormente, se procedió a la marcación de las células con los dos fluorocromos y a la lectura de las muestras en el citómetro de flujo. El análisis de los datos se efectuó mediante el programa WinMDI 2.8<sup>®</sup>. En este estudio se aplicaron dos fluorocromos, fluoresceína diacetato (FDA) e ioduro de propidio (IP). El FDA es utilizado para la evaluación de la actividad enzimática celular, es un precursor lipofílico no fluorescente que difunde a través de la membrana plasmática. Intracelularmente el grupo diacetato es hidrolizado por esterazas inespecíficas quedando un compuesto polar fluorescente de color verde que es la fluoresceína (F). Las células sólo permanecen fluorescentes si la

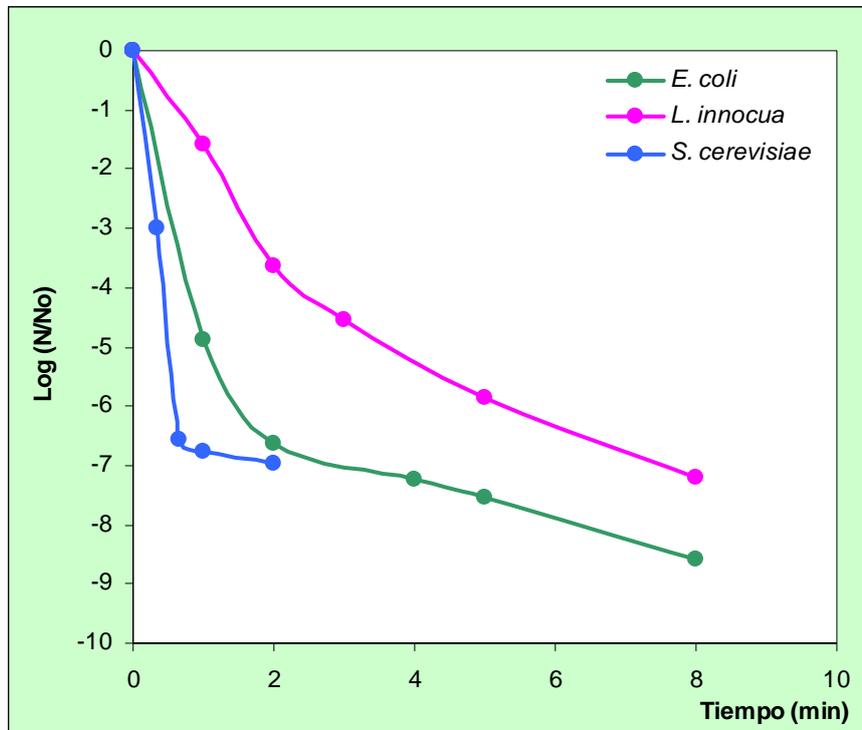
membrana está intacta y F no puede difundir hacia fuera de la misma. En contraste, IP es un compuesto que se une al ADN y es impermeable a la membrana, por la cual no puede penetrar en la célula si esta tiene la membrana intacta. Luego de la pérdida de la integridad de la membrana causada por la radiación UV, IP puede difundir y unirse al material genético dando una fluorescencia roja (Ueckert y col., 1995).

En paralelo también se realizó el recuento de células por plaqueo en superficie, para obtener la curva de inactivación de los distintos microorganismos.

Las curvas de inactivación por luz UV-C obtenidas mediante recuento en placa mostraron un marcado quiebre (**Figura 4.3.11**). Al comienzo del tratamiento, donde la curva tuvo mayor pendiente, seguramente ocurrió la muerte celular de los microorganismos más sensibles de la población, mientras que a tiempos mayores, los microorganismos remanentes fueron más resistentes al tratamiento, inactivándose a menor velocidad. *S. cerevisiae* fue el microorganismo más sensible a la acción de la luz UV-C, no detectándose población cultivable luego de 2 minutos de tratamiento ( $\approx 1 \text{ kJ/m}^2$ ), mientras que al mismo tiempo de tratamiento, se alcanzó una reducción de 6,6 ciclos log para *E. coli* y 3,6 ciclos log para *L. innocua*, siendo este último el microorganismo más resistente. A los 8 minutos de irradiación con luz UV-C ( $3,9 \text{ kJ/m}^2$ ) se obtuvo una reducción de 8,5 ciclos log para *E. coli* y 7,2 ciclos log para *L. innocua*, no visualizándose colonias luego de ese tiempo. Un perfil similar de resistencias fue reportado por Aronsson y col. (2005), cuando aplicaron campos eléctricos pulsados con una intensidad de 5 a 30 kV/cm, durante 2 ó 4  $\mu\text{s}$  en buffer PBS, a estas mismas especies microbianas. Es probable que cuando se aplican estas tecnologías no térmicas, la estructura externa del microorganismo tenga una alta incidencia en el efecto de inactivación producido. Sumado a que los microorganismos son más sensibles cuando el ensayo se realiza en un medio simple, como buffer PBS y la solución de agua de peptona.

Cuando se analizaron los resultados obtenidos mediante citometría de flujo, se pudieron observar algunos aspectos fisiológicos que complementan la información brindada por las curvas de inactivación. Las **Figuras 4.3.12, 4.3.13 y 4.3.14** muestran la densidad celular en función de la fluorescencia para los distintos microorganismos ensayados. En la **Tabla 4.3.5** se especifican los

**Figura 4.3.11** Curvas de inactivación de los distintos microorganismos en agua de peptona tratados con luz UV-C hasta  $3,9 \text{ kJ/m}^2$ , en placas de petri a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

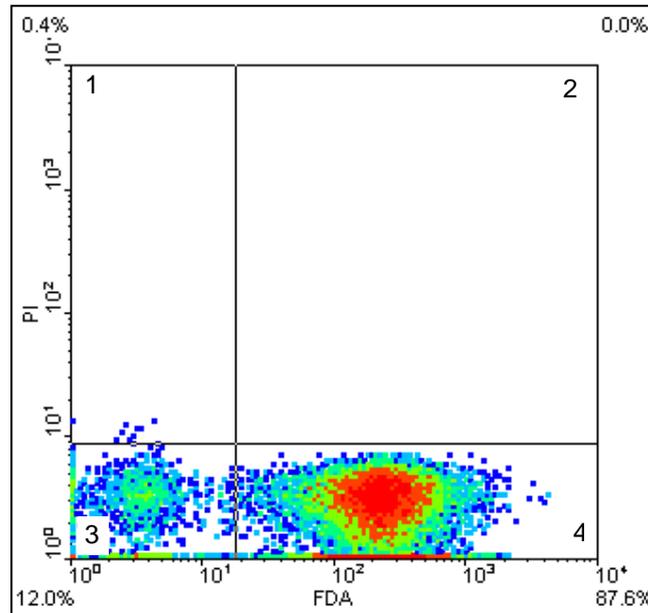


**Tabla 4.3.5** Designación de los cuadrantes de las células teñidas con FDA e IP.

Cuadrante	Patrón de fluorescencia de las células analizadas	Posible explicación del mecanismo celular envuelto
1	F <sup>-</sup> IP <sup>+</sup>	Actividad esterasa no detectable, membrana comprometida.
2	F <sup>+</sup> IP <sup>+</sup>	Actividad esterasa, membrana mínimamente dañada
3	F <sup>-</sup> IP <sup>-</sup>	Actividad esterasa no detectable, o F expulsada de la célula, membrana intacta.
4	F <sup>+</sup> IP <sup>-</sup>	Actividad esterasa, membrana intacta

**Figura 4.3.12** Gráficos de densidad de FDA vs IP para evaluar los efectos sobre la actividad esterasa e integridad de membrana en *E. coli* expuesta a diferentes tiempos de irradiación con luz UV-C. a) 0 min, b) 1 min, c) 2 min, d) 3 min, e) 5 min y f) 8 min.

a)



b)

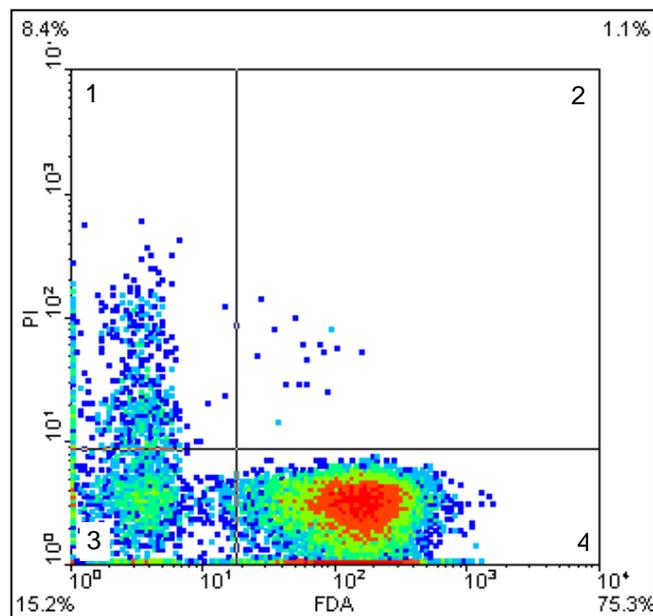
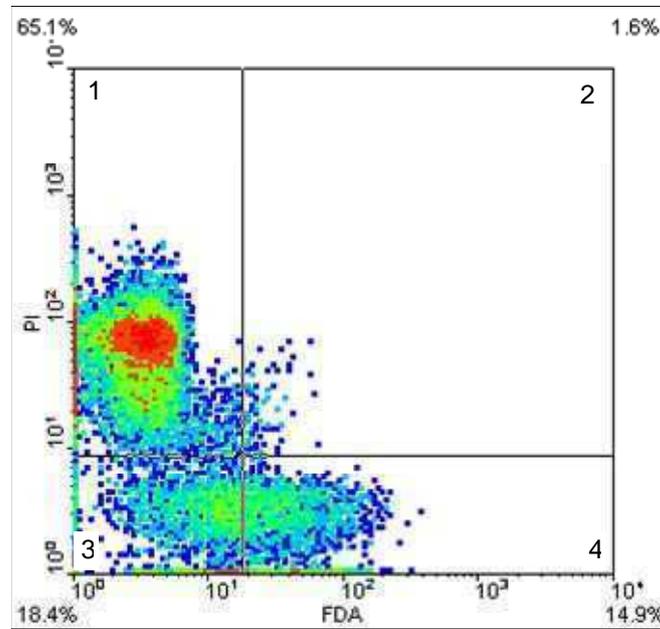


Figura 4.3.12 (continuación)

c)



d)

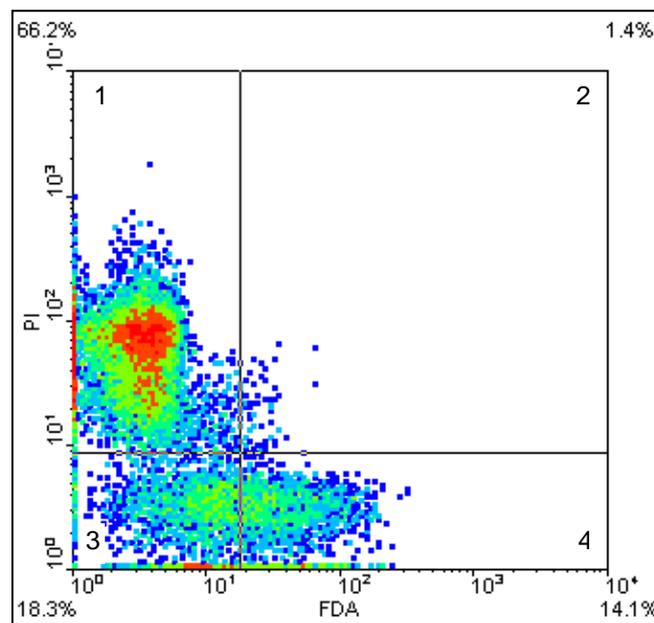
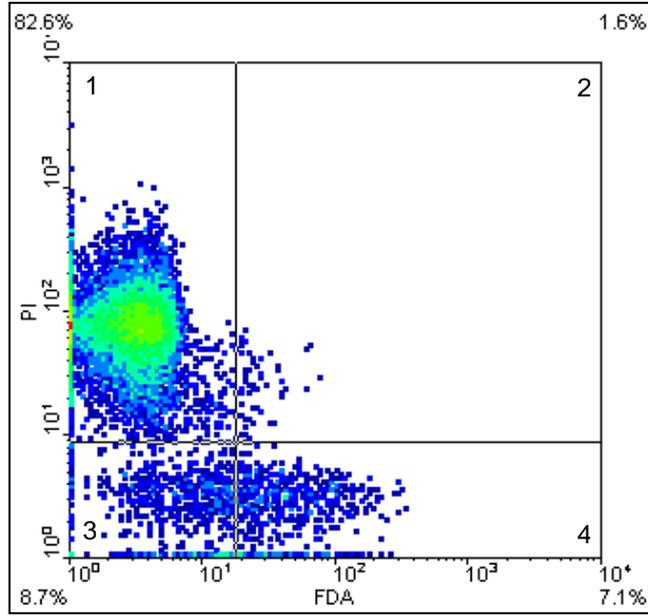
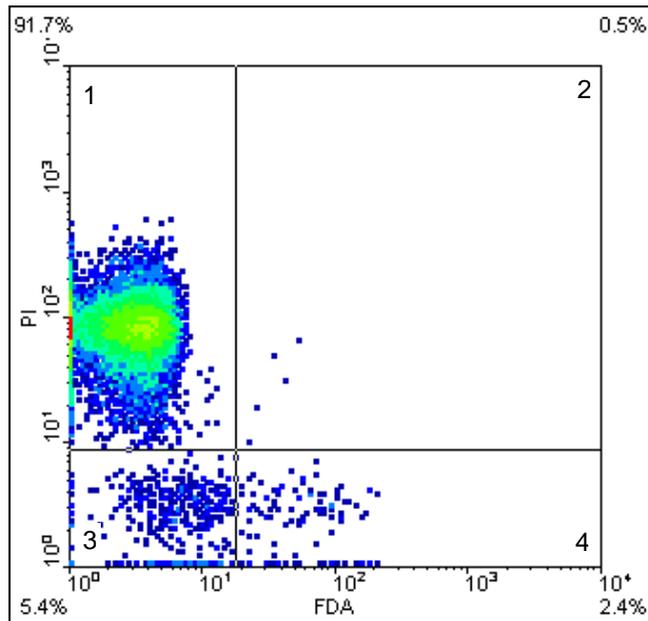


Figura 4.3.12 (continuación)

e)

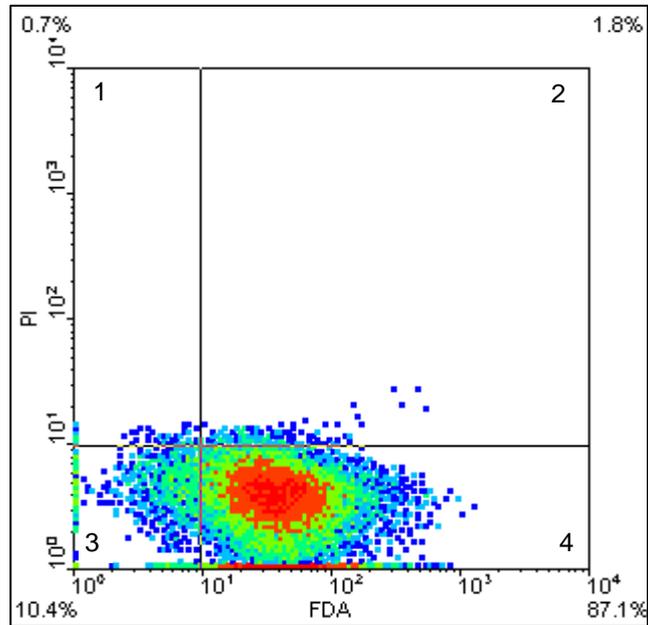


f)



**Figura 4.3.13** Gráficos de densidad de FDA vs IP para evaluar los efectos sobre la actividad esterasa e integridad de membrana en *L. innocua* expuesta a diferentes tiempos de irradiación con luz UV-C. a) 0 min, b) 1 min, c) 2 min, d) 3 min, e) 5 min y f) 8 min.

a)



b)

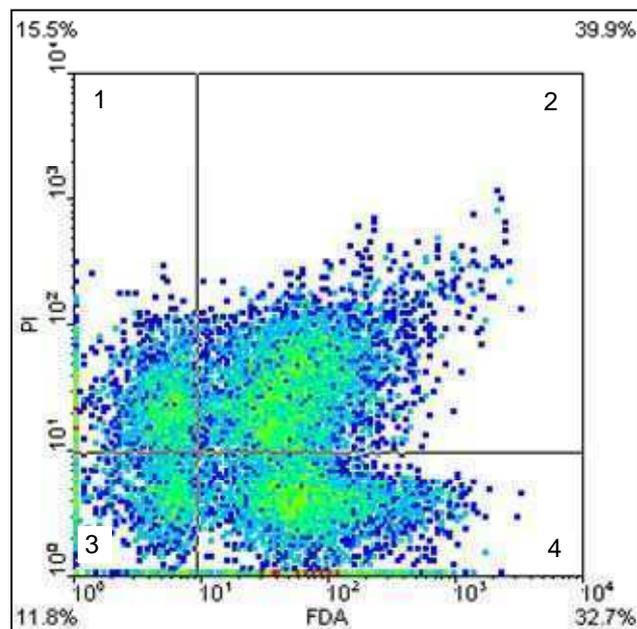
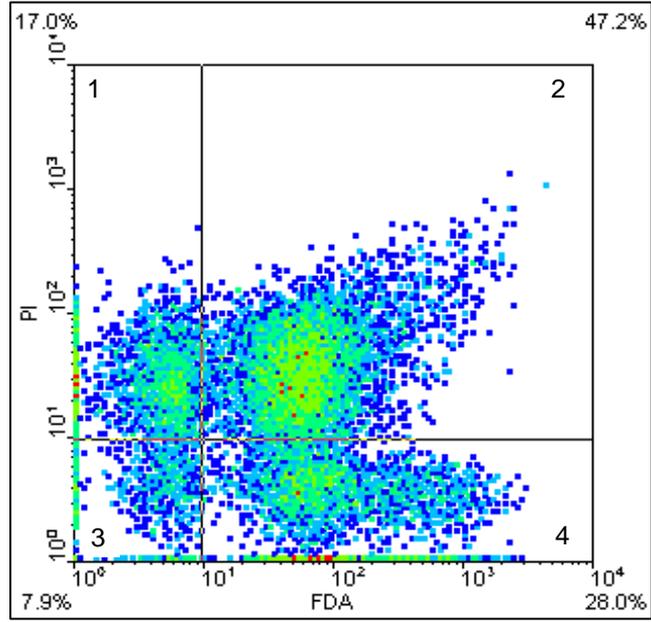


Figura 4.3.13 (continuación)

c)



d)

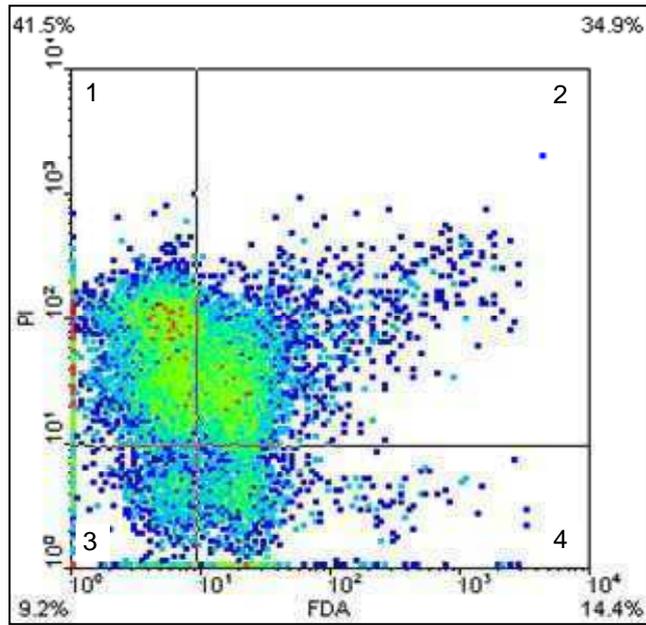
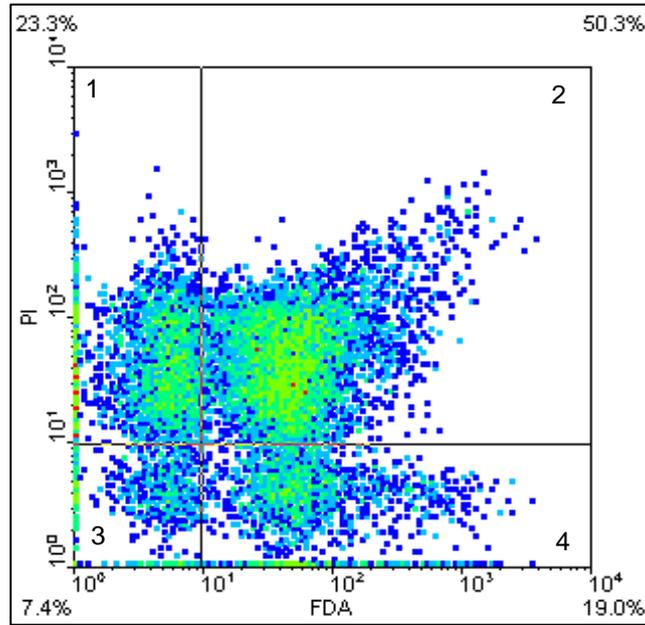
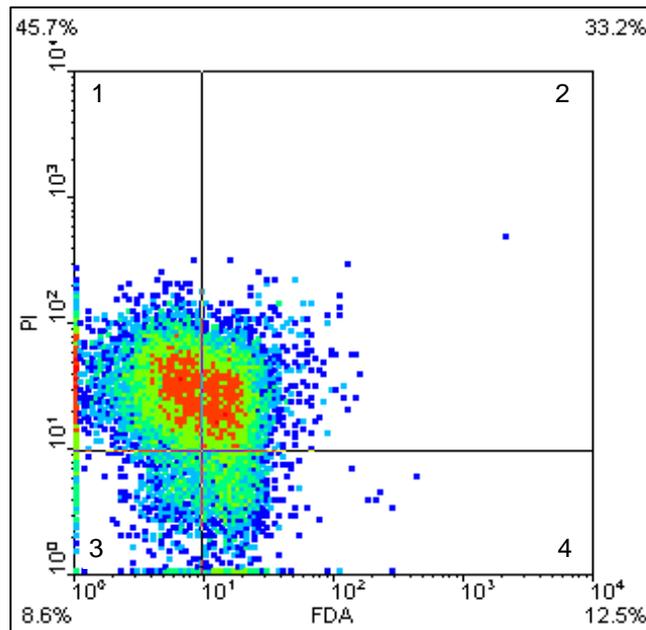


Figura 4.3.13 (continuación)

e)

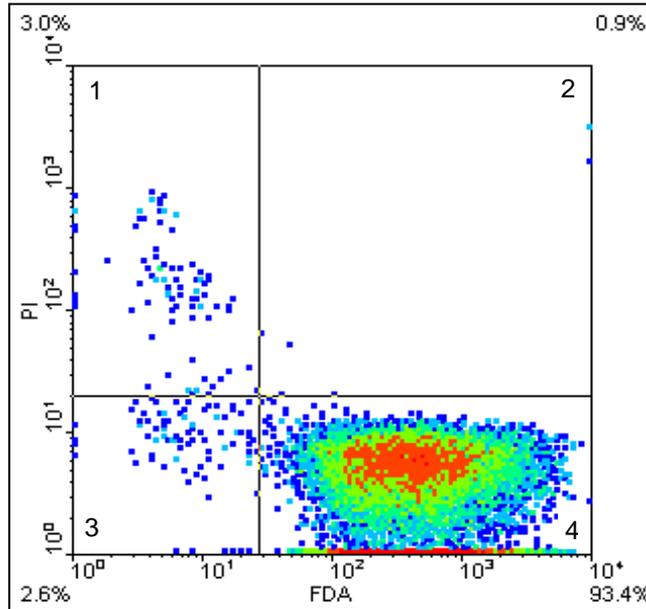


f)



**Figura 4.3.14** Gráficos de densidad de FDA vs IP para evaluar los efectos sobre la actividad esterasa e integridad de membrana en *S. cerevisiae* expuesta a diferentes tiempos de irradiación con luz UV-C. a) 0 min, b) 1 min, c) 2 min, d) 3 min, e) 5 min y f) 8 min.

a)



b)

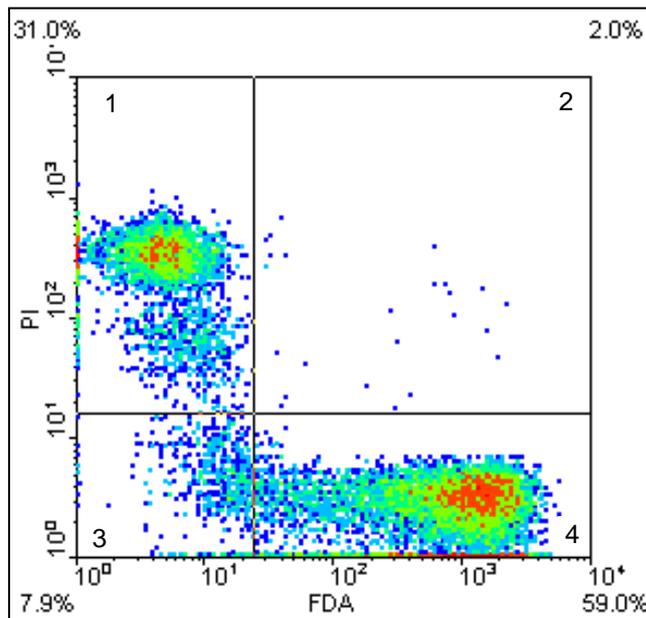
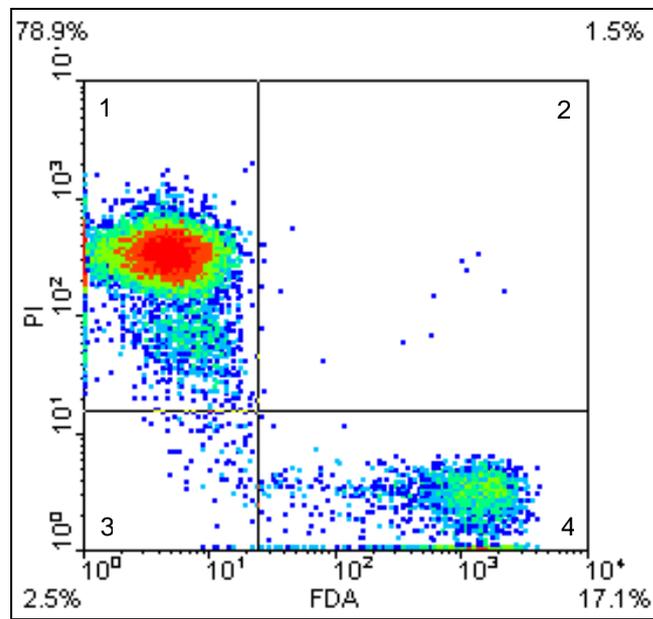


Figura 4.3.14 (continuación)

c)



d)

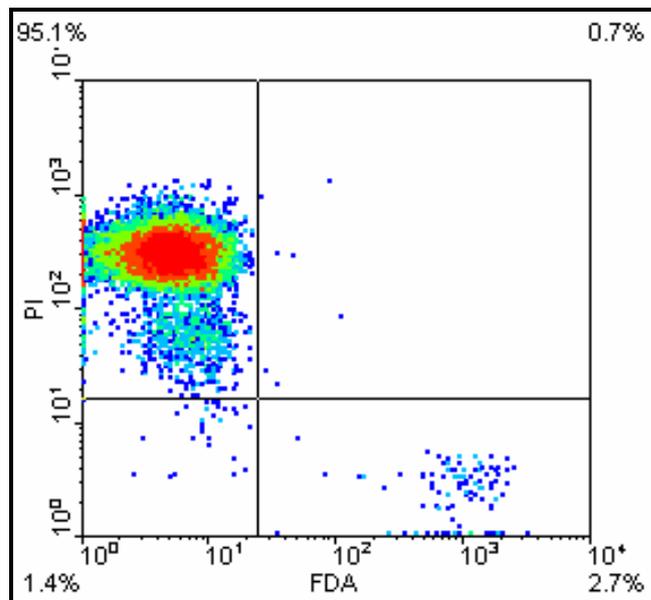
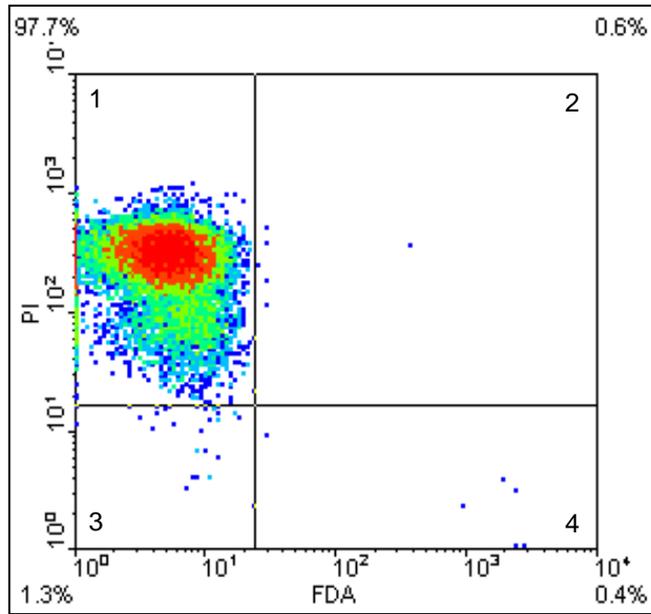
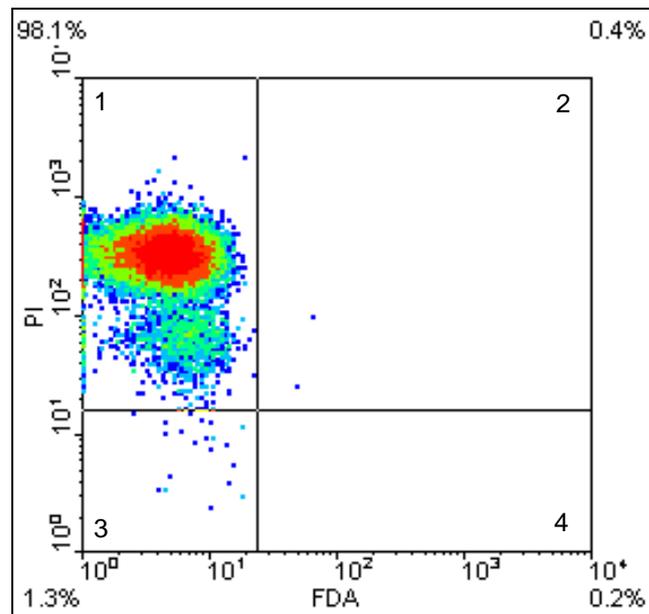


Figura 4.3.14 (continuación)

e)



f)



patrones de fluorescencia para cada uno de los cuadrantes y el mecanismo celular involucrado.

La evolución de los patrones de fluorescencia con la dosis de UV-C fue distinta dependiendo del microorganismo irradiado. En la **Figura 4.3.12** se observa que, cuando *E. coli* fue tratada con UV-C durante tiempos cortos, el número de eventos en el cuadrante 4 fue progresivamente disminuyendo con el consiguiente aumento en los cuadrantes 3 y 1. O sea, las células de *E. coli* fueron perdiendo progresivamente la fluorescencia verde. A las causas ya mencionadas que explicarían la ausencia de fluorescencia verde en bacterias metabólicamente activas, se suman aquellos efectos que puede estar produciendo el tratamiento propiamente dicho, como por ejemplo la desestabilización de la membrana, que favorecería la difusión de la fluoresceína hacia el exterior de la célula (y la penetración de IP con desarrollo de fluorescencia roja) ó la pérdida de actividad metabólica (en consecuencia, de la capacidad de las esterasas para hidrolizar FDA), debido al daño causado por la luz UV-C (**Figura 4.3.12, b, c y d cuadrante 3**). A medida que aumentó el tiempo de exposición a la luz UV-C y la integridad de la membrana y la capa de LPS continuaron perdiéndose o desestabilizándose, los eventos en el cuadrante 1 aumentaron a expensas de la disminución de los eventos en los cuadrantes 3 y 4. El fluorocromo IP continuó entrando en más células, uniéndose al ADN y ocasionando mayor concentración de fluorescencia roja (**Figura 4.3.12, d, e y f, cuadrante 1**).

En cambio, con *L. innocua* se visualizó un patrón de fluorescencia diferente, en donde las células adquirieron fluorescencia roja indicando que la integridad de la membrana se fue perdiendo, pero a su vez hidrolizaron el fluorocromo FDA, sugiriendo que mantuvieron la actividad de esterasa (**Figura 4.3.13 b y c, cuadrante 2**). Algunos autores (Ueckert y col., 1995) denominaron a esta subpoblación como “células viables pero no cultivables” porque, si bien poseían actividad metabólica, eran incapaces de formar colonias en agar. Este aspecto resulta relevante en la conservación de alimentos, ya que la presencia de dicha subpoblación podría ser crítica, siendo potencialmente deteriorativa en caso de recuperación o bien conservar su actividad patogénica.

En general, las poblaciones de microorganismos no son homogéneas en estructura y función. Por ello, cuando a las células sin tratar con luz UV-C se les agregó FDA no todas aparecieron en el cuadrante 4 (**Figuras 4.3.12 a, 4.3.13 a,**

y **4.3.14 a**). Ello se observó principalmente en bacterias, posiblemente debido a que FDA no podría difundir libremente hacia el interior de la célula por la presencia de la membrana externa de lipopolisacáridos (LPS) en las bacterias Gram-negativas o a la gruesa pared de peptidoglicanos en las bacterias Gram-positivas, (Hewitt y col., 1998). También podría contribuir a este comportamiento la expulsión activa de F hacia el exterior de la célula por las bombas de expulsión que poseen las bacterias, y en consecuencia las mismas no presentarían fluorescencia a pesar de estar metabólicamente activas (Ananta y Knorr, 2009).

Los resultados obtenidos por citometría indicaron que los mecanismos de daño celular difirieron según el microorganismo ensayado. Sin embargo, las curvas de inactivación obtenidas por recuento en placa no se correlacionaron a los distintos tiempos con la fracción de células teñidas solamente con IP (cuadrante 1), ya que la citometría de flujo tendió a sobrestimar la viabilidad de los microorganismos comparado con el recuento en placa. Luego de 2 minutos de tratamiento, en el análisis por citometría sólo 17% de la población de *L. innocua*, 65,1% de la población de *E. coli* y 78,9% de la población de *S. cerevisiae* apareció en el cuadrante 1 (células con membrana severamente dañada y sin actividad metabólica, por lo tanto no viables) (**Figura 4.3.12 c, 4.3.13 c, y 4.3.14 c, cuadrante 1**), mientras que en plaqueo en superficie (**Figura 4.3.11**) se obtuvieron reducciones de 3,6; 6,6 y 7 ciclos log respectivamente. Esto demuestra que la penetración de IP refleja el estado de la integridad de la membrana en la célula, pero no puede ser considerado como único indicador de la viabilidad celular (Ananta y Knorr, 2009). Estos autores han reportado resultados similares cuando estudiaron el daño causado en *Lactobacillus rhamnosus* al aplicar altas presiones (400 y 600 Mpa) durante 10 minutos. Encontraron que células que habían perdido completamente la habilidad de extruir la fluoresceína eran incapaces de formar colonias en agar y por lo tanto eran consideradas como muertas, aunque todavía poseían actividad esterasa y la membrana intacta.

El patrón de fluorescencia de *S. cerevisiae* (**Figura 4.3.14**) fue el que mejor correlacionó con las curvas de inactivación obtenidas mediante recuento de colonias en agar. Según el mismo, fue el microorganismo más sensible a la luz UV-C, dañándole la membrana plasmática y permitiendo la entrada de IP y su unión al ADN. A medida que aumentó el tiempo de tratamiento, las células que se encontraban en el cuadrante 4, se visualizaron en el cuadrante 1.

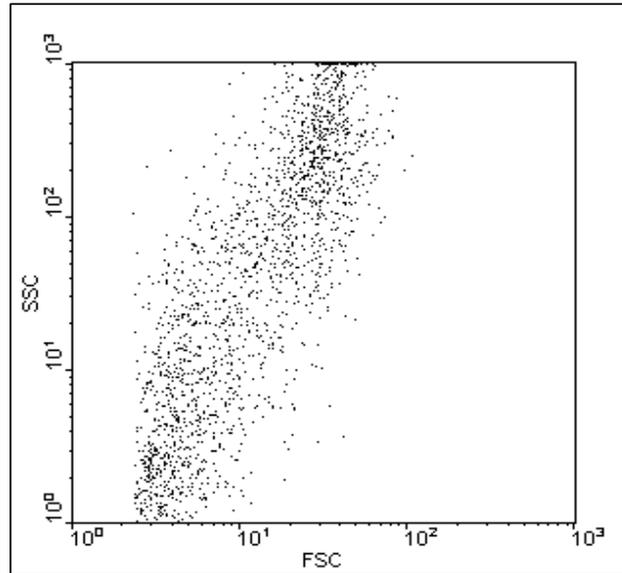
Cuando se obtuvieron los gráficos de tamaño (Forward, FSC) vs granularidad (size, SSC) de los microorganismos ensayados, se puede advertir que en las células de *E. coli* y *L. innocua*, se produjo una disminución del tamaño celular y la complejidad interna de la célula, que podría deberse a la acción que produce la radiación UV sobre las paredes celulares ocasionando ruptura y quizás desprendimiento de la misma, por lo que se visualizan más pequeñas (**Figura 4.3.15 y 4.3.16**). No obstante no ocurrió lo mismo con *S. cerevisiae*, en donde el tamaño celular y la complejidad prácticamente no varían a lo largo del tratamiento (**Figura 4.3.17**).

La acción germicida de la radiación ultravioleta en el rango entre los 200 y 280 nm (UV-C) es principalmente debido a su habilidad de romper moléculas de ADN, pero el análisis mediante citometría de flujo aplicado en este trabajo ha permitido corroborar que la radiación UV-C también provoca un daño significativo en la integridad de la membrana, en distinto grado y forma, evidenciado por las tinciones diferenciadas que se obtuvieron con los fluorocromos aplicados y los microorganismos aquí estudiados expuestos a este agente.

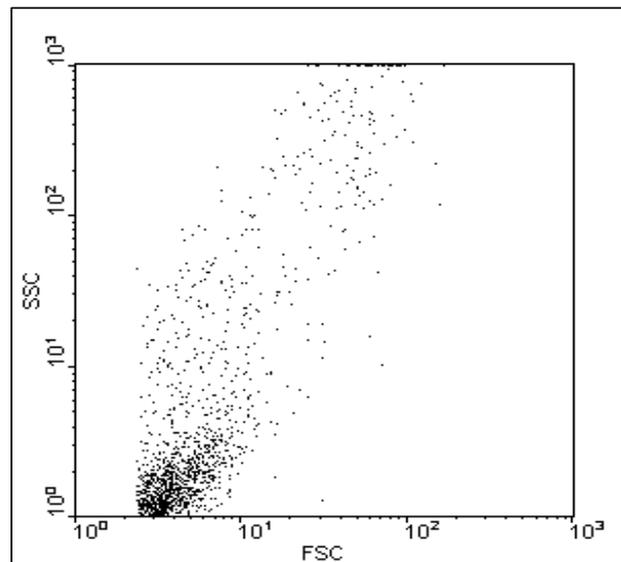
Por otro lado, la técnica de citometría de flujo demostró que utilizando los fluorocromos adecuados, puede ser una herramienta de fácil aplicación donde se obtienen los resultados en corto tiempo, y contribuye a un mejor entendimiento de los mecanismos de inactivación por radiación UV-C, que complementa los resultados obtenidos mediante la técnica de recuento en placa.

**Figura 4.3.15** Gráficos de punto, tamaño (forward) vs granularidad (size) de *E. coli* tratada con UV-C, a) 0 min y b) 8 min en agua de peptona.

a)

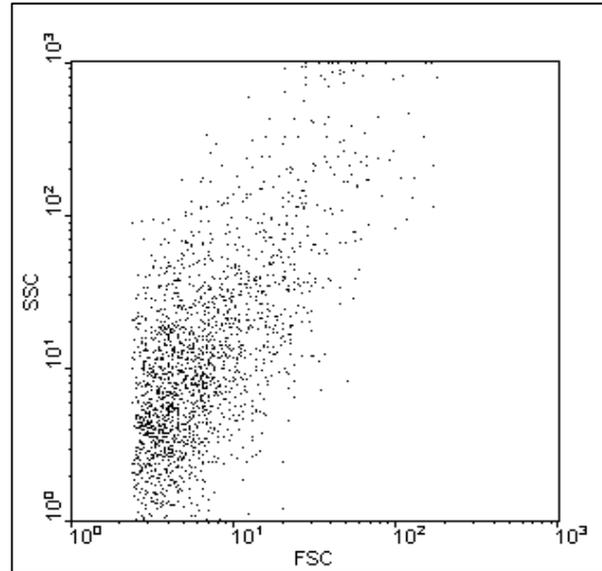


b)

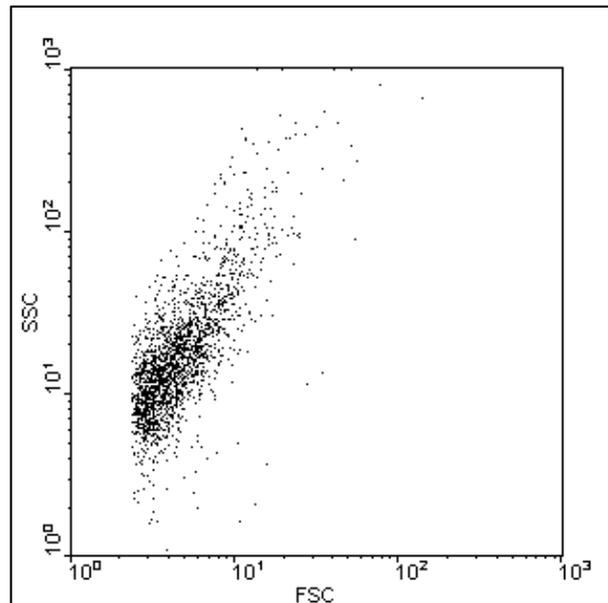


**Figura 4.3.16** Gráficos de punto, tamaño (forward) vs granularidad (size) de *L. innocua* tratada con UV-C, a) 0 min y b) 8 min en agua de peptona.

a)

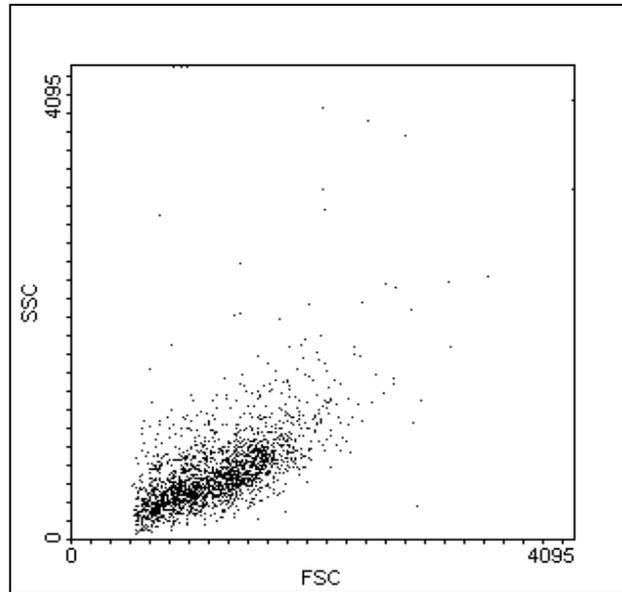


b)

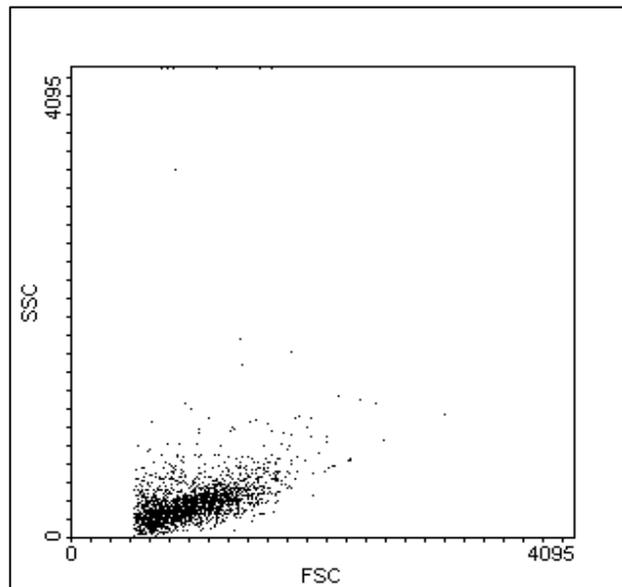


**Figura 4.3.17** Gráficos de punto, tamaño (forward) vs granularidad (size) de *S. cerevisiae* tratada con UV-C, a) 0 min y b) 8 min en agua de peptona.

a)



b)



#### 4.3.5- Observación microscópica de células de *E. coli* ATCC 11229 en suspensión líquida tratadas con luz ultravioleta

Para ampliar la información obtenida mediante la técnica de citometría de flujo, se monitorearon los cambios estructurales asociados al daño por luz ultravioleta en células de *E. coli* ATCC 11229 luego de un tratamiento de 8 min (3,9 kJ/m<sup>2</sup>) en medio líquido utilizando microscopía electrónica de transmisión.

A fin de efectuar una mejor interpretación de las micrografías, en la **Figura 4.3.18** se muestra un esquema de la pared celular de bacterias Gram- negativas, compuesta por:

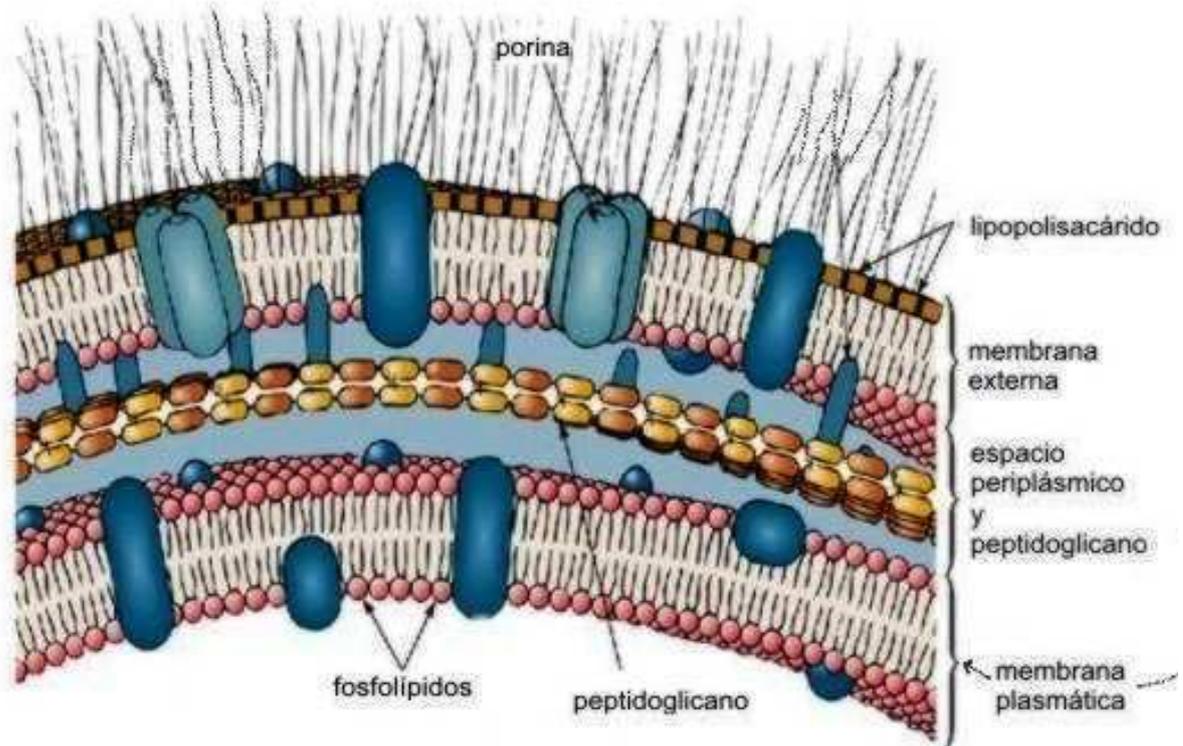
- \_ una delgada capa interna de péptidoglicano, de 2-3 nm de espesor que constituyen un 10-20% de la pared celular.

- \_ una membrana externa, consistente en una bicapa lipídica de aproximadamente 7 nm de espesor, conformada por fosfolípidos, lipoproteínas, lipopolisacáridos y proteínas. Los fosfolípidos están localizados principalmente en la capa interna de la membrana externa, lo mismo que las lipoproteínas que conectan la membrana externa a los péptidoglicanos (Norris y Manners, 1993). Los lipopolisacáridos están localizados en la capa externa de la membrana externa y consisten de una porción lipídica denominada lípido A embebida en la membrana y una porción de polisacáridos que se extiende hacia afuera desde la superficie bacteriana, donde también se localizan proteínas integrales formadoras de poros o porinas.

- \_ El periplasma o espacio periplásmico es el material gelatinoso entre la membrana externa, los peptidoglicanos y la membrana citoplasmática (Link y col., 1997).

El tratamiento se llevó a cabo sobre células de *E. coli* ATCC 11229 en medio líquido según lo descrito en **Materiales y Métodos, apartado 3.14**. En las células de *E. coli* sin tratar de la **Figura 4.3.19** de las micrografías en MET se pudo observar claramente la pared celular como una estructura multicapa compleja, visualizándose la doble capa de la membrana externa. Entre la pared y la membrana citoplasmática se percibió notoriamente el espacio periplásmico. En las células de *E. coli* tratadas con UV por 8 minutos (**Figura 4.3.19 b, f y h**) se observó un alisamiento de la pared celular de las bacterias, y zonas con la pared no tan bien definidas, lo que concuerda con los resultados obtenidos por

**Figura 4.3.18** Estructura de la pared celular de bacterias Gram-negativas.



**Figura 4.3.19** Microfotografías en MET de células de *E. coli* ATCC 11229. **a, c, e, g**: control. **b, d, f, h**: células tratadas 8 min. con luz UV-C. **om**: membrana externa; **p**: peptidoglicanos; **cm**: membrana citoplasmática, **pe**: periplasma. **a-d**: aspectos generales (escala 200 nm); **e-h**: detalles (escala 100 nm).

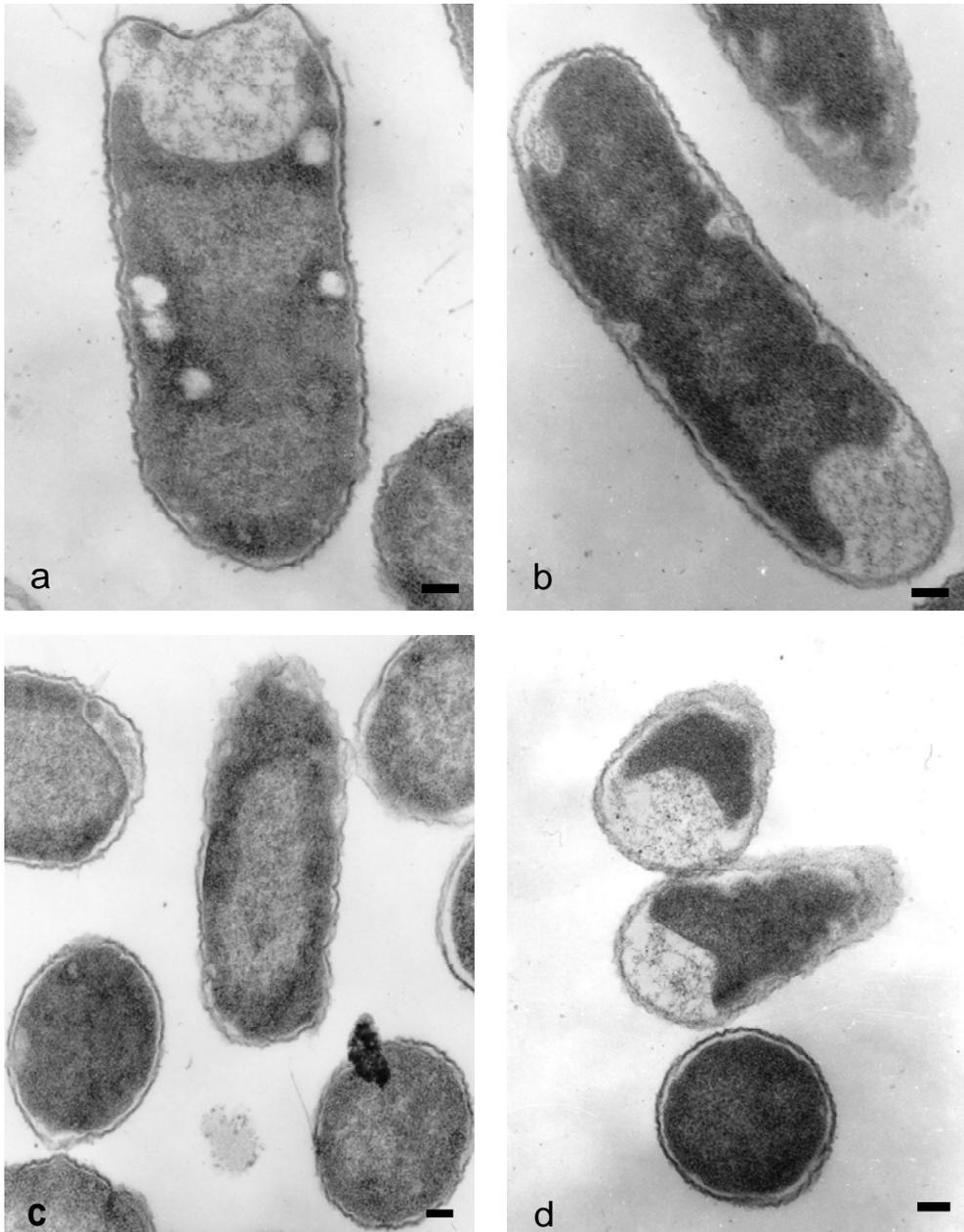
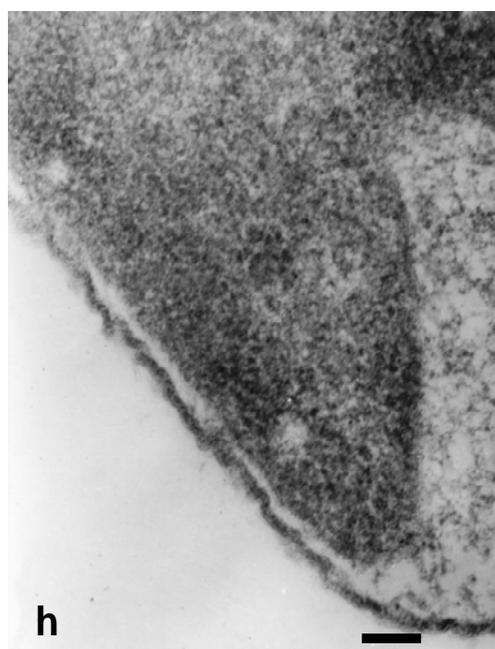
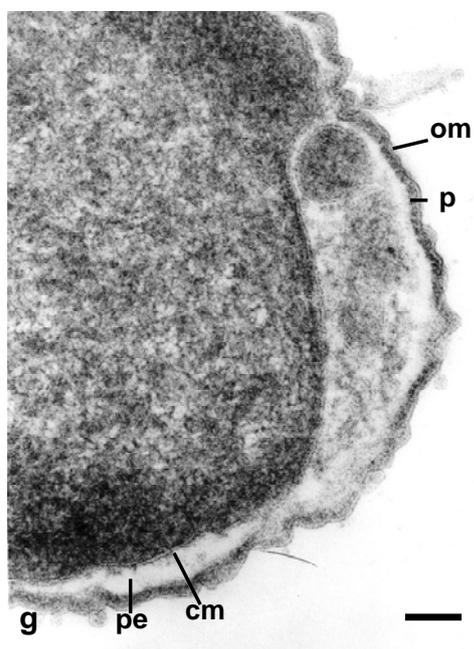
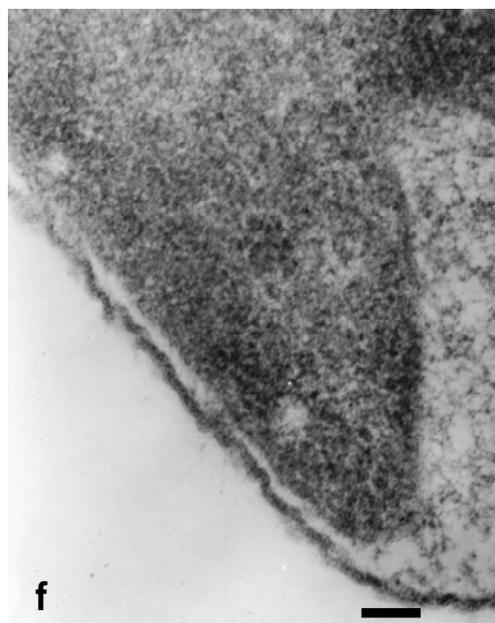
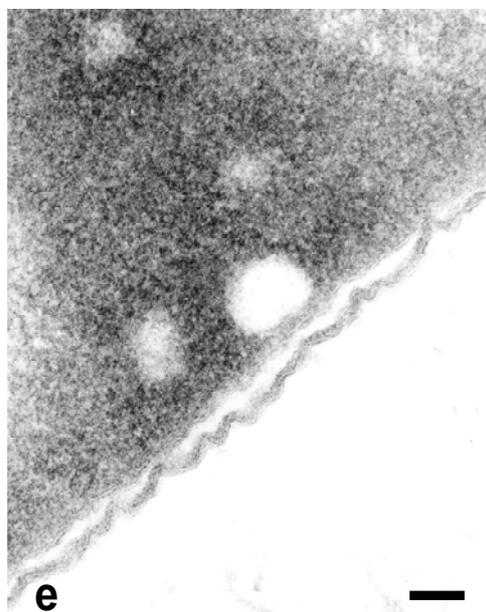


Figura 4.3.19 (continuación)



citometría de flujo, en la cual la irradiación con UV podría provocar la pérdida de la integridad de la membrana y pared celular y la entrada del yoduro de propidio.

La granulometría interna también se vio alterada en las células tratadas, en coincidencia con los estudios de citometría de flujo (**Figura 4.3.15 b**), posiblemente debido al daño en las proteínas de los ribosomas, advirtiéndose un citoplasma más uniforme. Mediante microscopía también se advirtió una leve invaginación del citoplasma (**Figura 4.3.19 b y d**).

#### 4.4- Tratamientos con peróxido de hidrógeno

Ya se ha mencionado que el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es un agente oxidante fuerte dañando proteínas, ADN y membrana celulares en los microorganismos (Juven y Pierson, 1996), aunque sus efectos dependen de la concentración, pH y temperatura a la cual se lo aplica. El mismo está siendo ampliamente utilizado para decontaminar distintos tipos de alimentos, sólo o combinado con otras tecnologías.

En una primera etapa, se quiso estudiar el efecto del  $H_2O_2$  en rodajas de pera sobre algunas especies microbianas. Posteriormente, se eligieron las condiciones más apropiadas de aplicación del mismo, con el propósito de utilizarlas en un tratamiento combinado  $H_2O_2$ /luz UV-C, tal como se describe en **Materiales y Métodos apartado 3.8.3.**

##### 4.4.1- Optimización del tiempo de secado de las rodajas de pera inoculadas

Con el propósito de lograr mayor adhesión microbiana y evitar así que se disperse la carga microbiana inoculada en la solución de inmersión de peróxido de hidrógeno, se debió realizar una prueba previa para establecer el tiempo de secado de las mismas, una vez inoculadas con el microorganismo de prueba *L. innocua* ATCC 33090. Las rodajas de pera sin piel inoculadas se dejaron secar dentro de la cabina de seguridad biológica entre 30 minutos y 3 horas (**Materiales y Métodos apartado 3.8.2.1**).

En la **Figura 4.4.1** se observa que cuando el tiempo de secado de la rodaja inoculada fue nulo, la concentración de bacterias que quedan adheridas en la superficie de la pera, luego de la inmersión en la solución de  $H_2O_2$  fue de aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/g. Cuando el tiempo de secado varió entre 30 minutos y 3 horas, con posterior inmersión de las rodajas por 5 minutos, la concentración de bacterias que quedaron adheridas a la rodaja fue mayor que en el control, pero similar entre los distintos tiempos de secado (entre  $2,24 \times 10^8$  y  $2,60 \times 10^8$  UFC/g). La cantidad de inóculo que se pierde por dispersión en la solución de  $H_2O_2$  cuando no se deja un tiempo de secado es de aproximadamente 0,5 ciclos logarítmicos y se mantiene en valores equivalentes al aumentar el

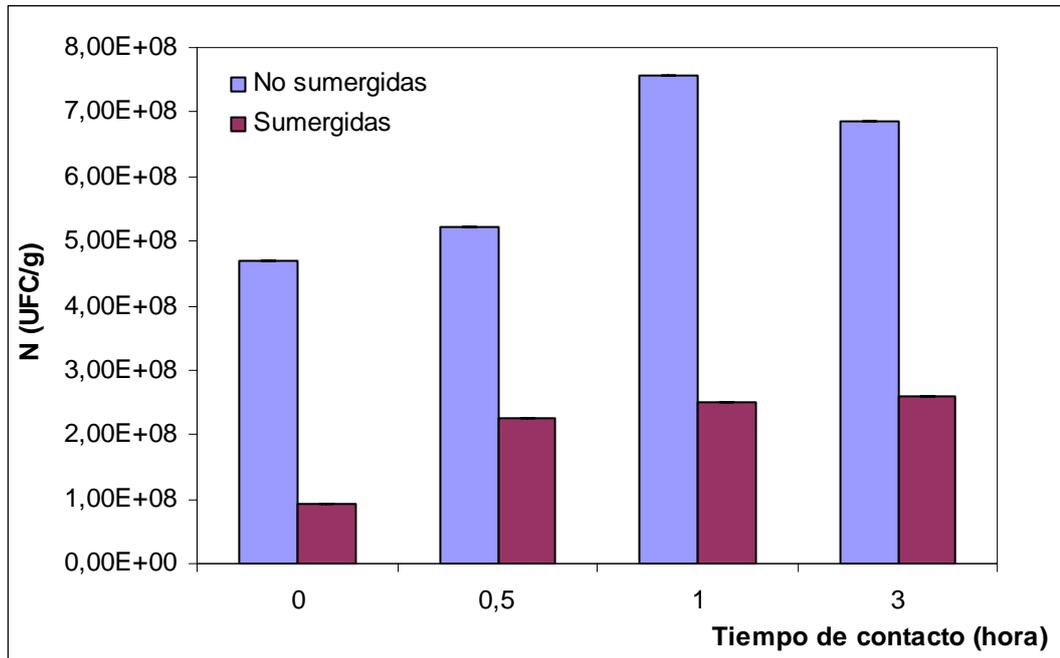
tiempo de secado. Por lo tanto, para los estudios con  $H_2O_2$  que se llevaron a cabo posteriormente, se inocularon las rodajas de pera con el microorganismo correspondiente y se esperó 30 minutos antes de realizar el ensayo.

#### 4.4.2- Efecto del tiosulfato de sodio pentahidratado

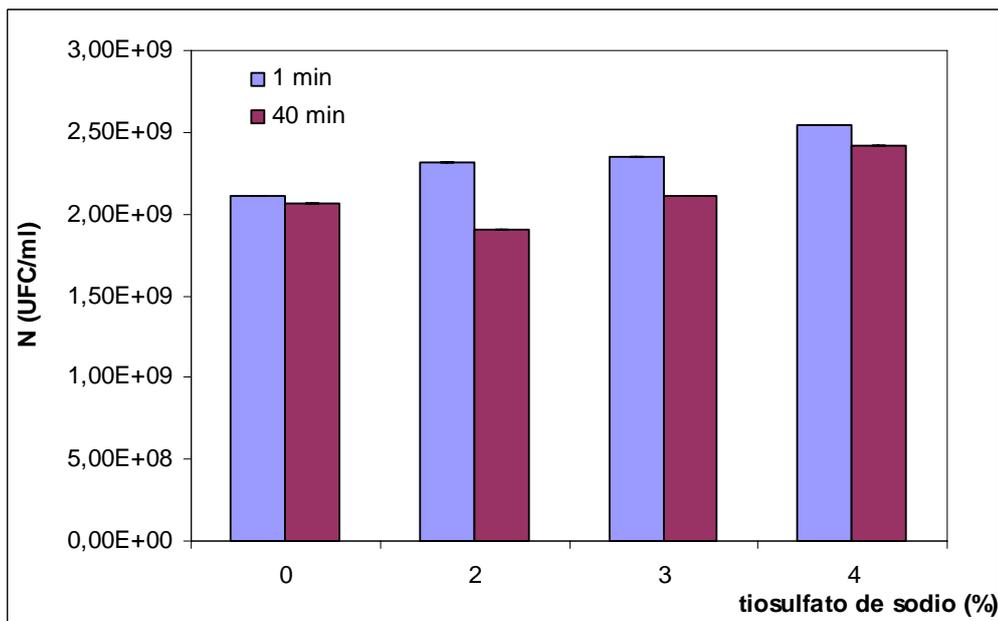
El reactivo tiosulfato de sodio se utilizó para neutralizar la reactividad del  $H_2O_2$  una vez finalizado el tratamiento (**Materiales y Métodos, apartado 3.8.2.2**). Sin embargo, se analizó previamente si el tiosulfato de sodio no inactivaba a la bacteria *per se*. Para ello, se prepararon soluciones con distintas concentraciones de tiosulfato de sodio (0, 2, 3 y 4%), a las cuales se le agregó un inóculo de *L. innocua* ATCC 33090. Las soluciones se mantuvieron en agitación por 1 ó 40 minutos, tiempo al cabo del cual se retiró una alícuota y se procedió al recuento en placa.

Los resultados muestran que ninguna concentración ensayada de tiosulfato de sodio afectó al microorganismo de prueba (**Figura 4.4.2**). Las pequeñas variaciones observadas podrían deberse a la variabilidad que presentan las soluciones entre sí y puede considerarse dentro del error experimental. Raffellini (2009) utilizando las mismas concentraciones de tiosulfato de sodio para neutralizar soluciones de  $H_2O_2$  con distintas cepas de *E. coli*, observó que la solución de 4% p/v de tiosulfato de sodio fue la única que neutralizó completamente las mayores concentraciones de  $H_2O_2$  ensayadas (3%-6%). En base a estos resultados, en los ensayos subsiguientes se utilizó la máxima concentración de tiosulfato de sodio (4%), con el propósito de asegurar la total neutralización del  $H_2O_2$  añadido.

**Figura 4.4.1** Recuento de *L. innocua* ATCC 33090 en rodajas de pera sin piel, control (no sumergidas) y sumergidas en agua de peptona por 5 minutos, luego de haber dejado el inóculo en contacto con la rodaja por 0,5; 1 y 3 horas.



**Figura 4.4.2** Recuento de *L. innocua* ATCC 33090 luego del contacto por 1 ó 40 minutos con soluciones de tiosulfato de sodio de diferente concentración (0, 2, 3 y 4%).



#### 4.4.3- Utilización del peróxido de hidrógeno en medio líquido

En una primera etapa, los estudios de inactivación se realizaron en un medio líquido conteniendo 1%, 2% ó 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tal como se detalla en **Materiales y Métodos, apartado 3.8.2.3**, con el propósito de determinar el efecto del mismo sobre los microorganismos sin interferencia de la matriz.

En la **Figura 4.4.3** se muestran los resultados obtenidos en las soluciones buffer (Ác. cítrico 0,1M y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2M) conteniendo inóculos de *E. coli* ATCC 11229 tratadas por 6 min., *L. innocua* ATCC 33090 tratadas por 20 min. y *Z. bailii* NRRL 7256 tratadas por 7 min., cuando se aplicó a 25°C, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% y 2% a pH 4,2 y 3% a pH 3,0.

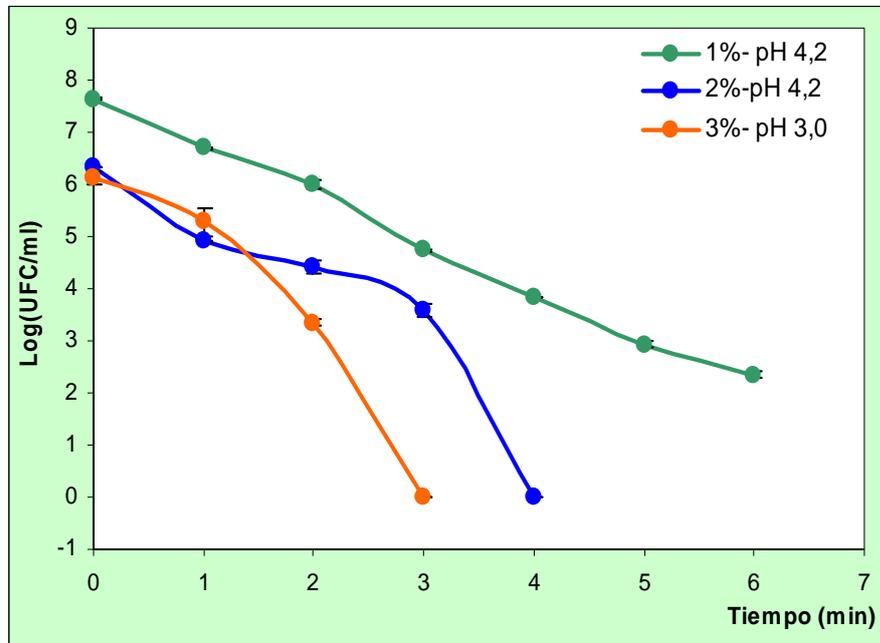
Cuando el ensayo se llevó a cabo con la menor concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1%) y a pH 4,2, se obtuvo una cinética de inactivación aproximadamente lineal para todos los microorganismos estudiados. Sin embargo, no produjo mayor efecto sobre la inactivación de *L. innocua*, siendo la reducción de 3 ciclos logarítmicos luego de 20 minutos de tratamiento, mientras que para *E. coli* la misma reducción logarítmica se obtuvo con 3 minutos de tratamiento. Raffellini y col. (2008) utilizando una solución de peróxido al 1% pH 4,4, obtuvieron una reducción de 7 ciclos logarítmicos de *E. coli* ATCC 35218 a los 3 minutos de tratamiento, por lo que la efectividad del peróxido de hidrógeno en la inactivación microbiana varía dependiendo de la especie y de la cepa dentro de una misma especie.

No se observaron diferencias en el sistema inoculado con *L. innocua* cuando se le aplicó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2% con pH 4,2 y al 3% con pH 3,0, obteniéndose una reducción de 7 ciclos logarítmicos al cabo de 12 minutos de tratamiento (**Figura 4.4.3 b**). La forma de la curva en ambos casos fue cóncava hacia abajo y con una caída abrupta.

En el medio líquido inoculado con *E. coli* (pH 4,2), el agregado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2% produjo recuento no detectable al cabo de 4 minutos de tratamiento. Cuando la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue de 3% y pH 3,0, no se observaron colonias al cabo de 3 minutos de contacto. La inactivación que se alcanzó en ambos casos fue de aproximadamente 6,2 ciclos log (**Figura 4.4.3 a**). Estos resultados concuerdan con lo observado por Raffellini y col. (2008), que trabajaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en concentraciones entre 0 y 3% a distintos pH (3,0; 4,4; 5,8 y 7,2) en medio líquido y demostraron que aumentando la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y disminuyendo el pH, se

**Figura 4.4.3** Efecto de la concentración de  $H_2O_2$  y el pH sobre la inactivación de a) *E. coli* ATCC 11229 b) *L. innocua* ATCC 33090 y c) *Z. bailii* NRRL 7256 en sistema modelo a temperatura ambiente. ([ ] desvío Standard.

a)



b)

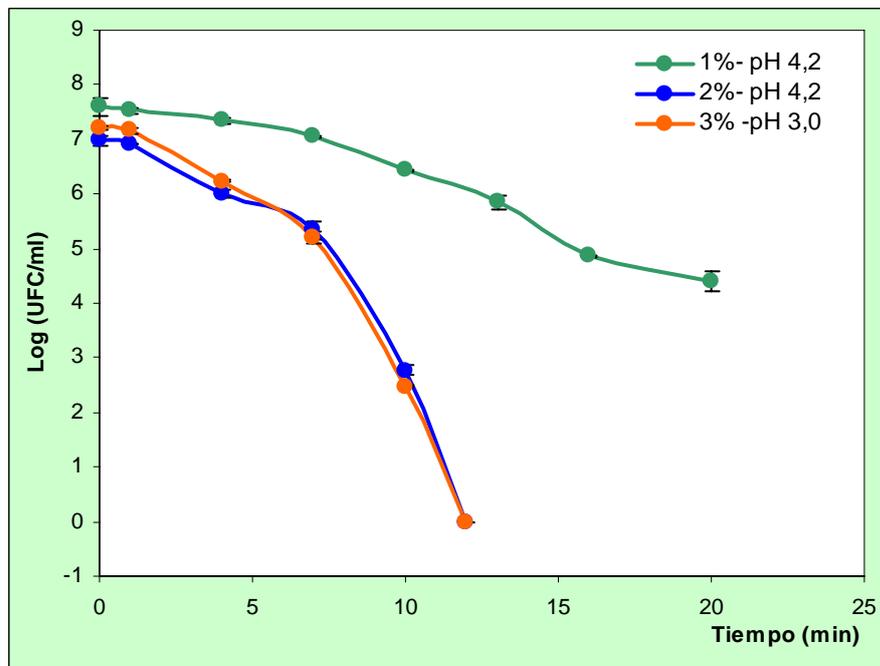
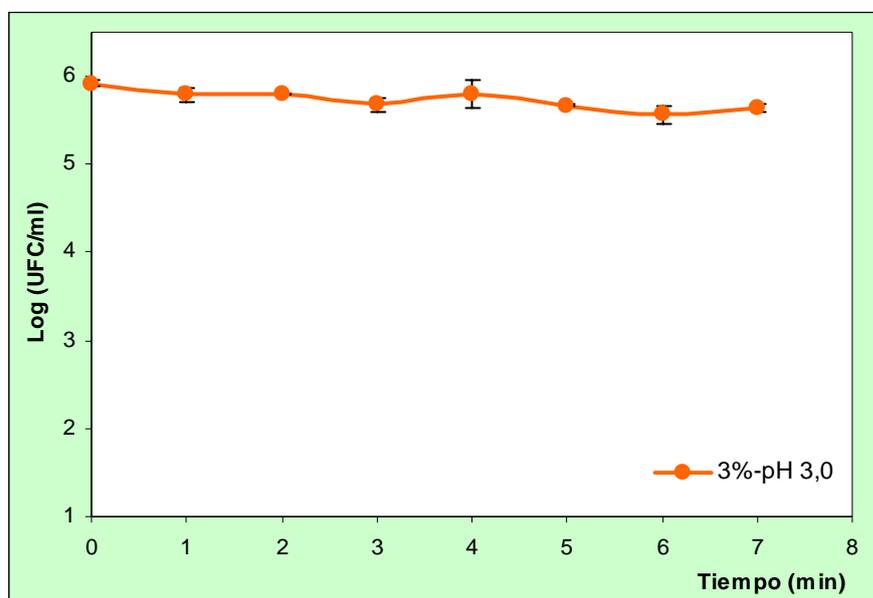


Figura 4.4.3 (Continuación)

c)



producía una reducción de 7 ciclos log de *E. coli* ATCC 35218, en menor tiempo de tratamiento cuando era tratada en sistema modelo. No ocurrió lo mismo con *L. innocua*. En general se ha visto que las bacterias Gram negativas son más sensibles al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que las bacterias Gram positivas (Block, 2001).

Cuando se efectuó el ensayo con *Z. bailii* (**Figura 4.4.3 c**) se aplicó la única condición H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% y pH 3,0 ya que las levaduras son más resistente a la acción del peróxido por poseer la enzima catalasa que descompone al peróxido en agua y oxígeno (Bayliak y col., 2006). Se observó que casi no hubo cambios durante los 7 minutos de tratamiento, produciéndose una escasa reducción de sólo 0,4 ciclos logarítmicos confirmando que esta cepa posee una gran actividad de catalasa. Bayliak y col. (2006) estudiaron varias concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en buffer PBS durante 30 minutos de tiempo de contacto a 28°C en 6 cepas de *S. cerevisiae*. Ellos observaron que la eficacia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en inactivar a las levaduras dependía de si la cepa poseía o no una alta actividad de catalasa que pudiera neutralizar al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 4.4.4- Efecto del peróxido de hidrógeno en matriz sólida

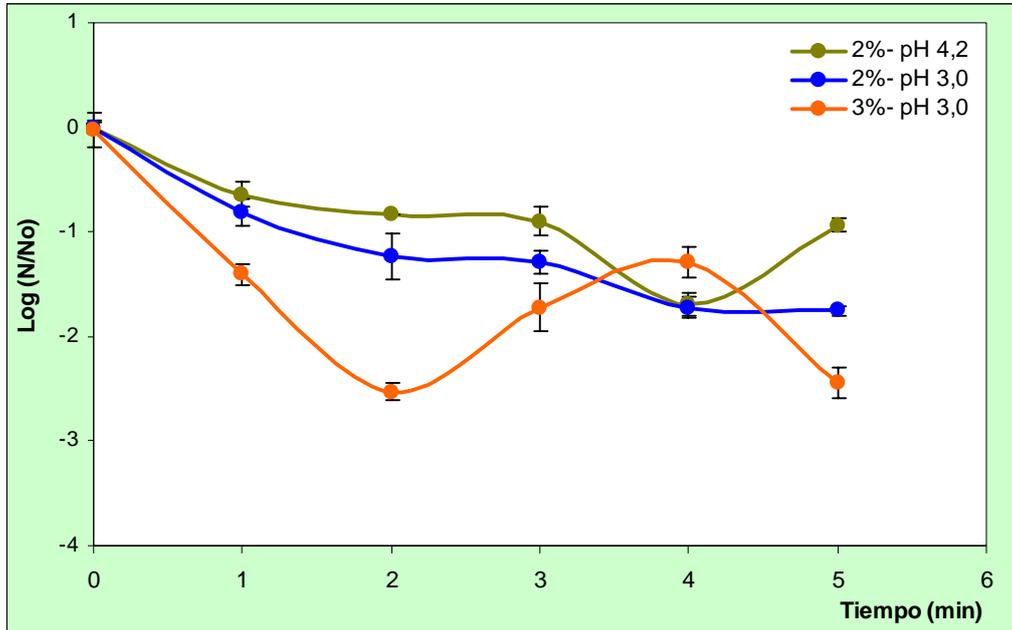
En una segunda parte, en base a los resultados obtenidos con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y pH en medio líquido, se realizaron los estudios utilizando *E. coli* ATCC 11229 inoculada sobre rodajas de pera sin piel, las cuales se sumergieron en soluciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2% v/v a pH 3,0 y 4,2 y 3% v/v con pH 3,0 (**Materiales y Métodos, apartado 3.8.2.4**). Se puede observar en la **Figura 4.4.4** que las curvas de inactivación no resultaron lineales y que la eficacia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuyó a medida que decreció la concentración y aumentó el pH de la solución empleada para tratar las rodajas de pera. Utilizando la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2% v/v con pH 3,0 y 4,2 se obtuvieron luego de 5 minutos de tratamiento, una reducción de 1,7 y 1,0 ciclos logarítmicos respectivamente, mientras que la misma reducción se obtuvo con sólo 1 minuto de contacto cuando se aplicó la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% con pH 3,0. Esta concentración condujo a una reducción de 2,5 ciclos logarítmicos en *E. coli* luego de 5 minutos de tratamiento sin causar signos de deterioro visibles en las rodajas de pera. Para tiempos de contacto mayores a 5 minutos de las rodajas con la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hubo un deterioro con pérdida

de material a las dos concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sapers y Sites (2003), aplicando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1% a 20 °C, en manzanas inoculadas con *E. coli* ATCC 25922, obtuvieron una reducción de 2,8 y 2,9 ciclos logarítmicos pero con 15 y 30 minutos de tratamiento respectivamente, lo cual resulta en un tiempo muy prolongado para un producto mínimamente procesado.

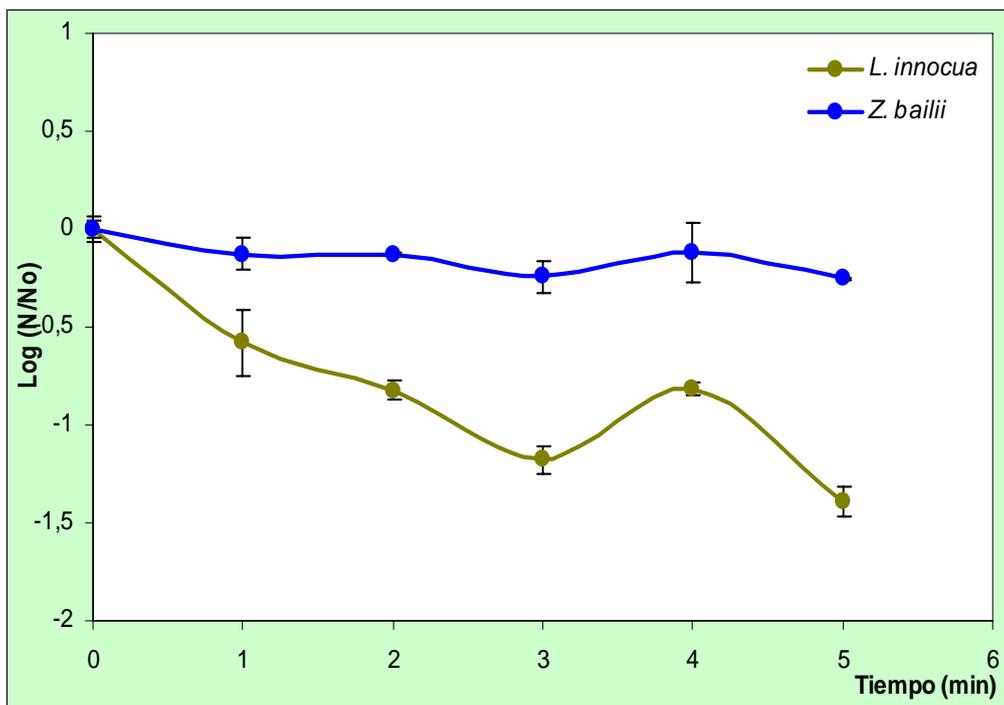
Como cabía esperar, la inactivación de *E. coli* sobre rodajas de pera sin piel fue menos efectiva que la observada en medio líquido, ya que la matriz le proporciona cierta protección, dificultando que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre en contacto con el microorganismo.

Cuando el ensayo se realizó en pera sin piel con inóculos de *L. innocua* y *Z. bailii*, sólo se empleó la solución de 3% v/v de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a pH 3,0, dado que esta condición fue la combinación que mayor efectividad dio inactivando *E. coli*. Nuevamente como se muestra en la **Figura 4.4.5**, fue muy poco efectiva la acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre *Z. bailii*, en donde sólo se obtuvo 0,25 reducciones decimales. En cambio con *L. innocua*, se consiguió casi la misma reducción a los 5 min de tratamiento tanto en medio líquido como en las rodajas de pera, de aproximadamente 1,4 reducciones decimales (**Figura 4.4.3 y 4.4.5**). Wei y col. (2005) aplicando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% v/v, a 45°C durante 1 ó 3,5 minutos en lechuga inoculada con *L. innocua* LTH 3096, solo obtuvieron una reducción de 1,23 y 2,06, respectivamente. Coincidiendo de este modo que, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiene menor efecto en las bacterias gram positivas y que para lograr un mayor efecto del mismo se debe aplicar a mayor temperatura. En este estudio no se aplicó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a mayores temperaturas con el fin de evitar el deterioro por calor de las rodajas de pera y así obtener un producto mínimamente procesado lo más parecido a la fruta fresca.

**Figura 4.4.4** Efecto de la concentración de  $H_2O_2$  y el pH sobre la inactivación de *E. coli* sobre rodajas de pera sin piel a temperatura ambiente, durante 5 minutos.



**Figura 4.4.5** Curvas de inactivación de *L. innocua* y *Z. bailii* en rodajas de pera sin piel, tratadas con  $H_2O_2$  al 3% v/v, pH 3,0 a 25 °C durante 5 minutos.



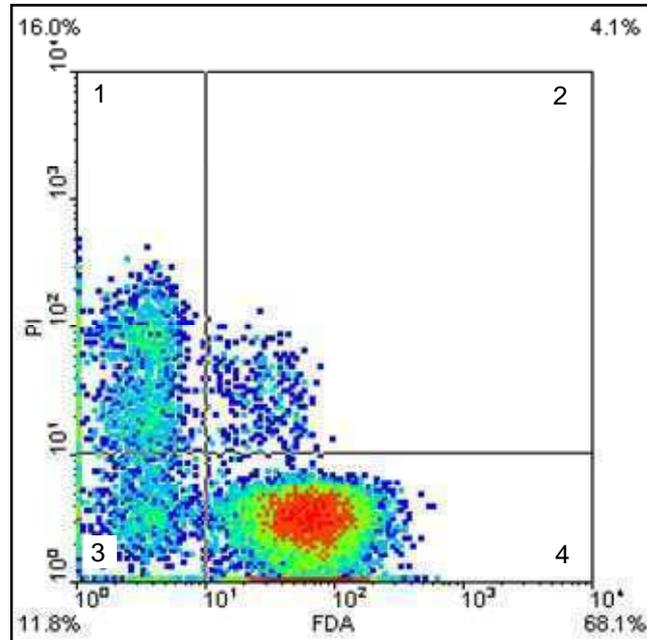
#### 4.4.5- Análisis por citometría de flujo de células de *E. coli* ATCC 11229 en suspensión líquida tratadas con peróxido de hidrógeno

Con el objetivo de observar posibles cambios en algunos aspectos fisiológicos de los microorganismos debido al tratamiento con  $H_2O_2$ , se utilizó la técnica de citometría de flujo. El tratamiento se llevó a cabo con *E. coli* ATCC 11229 tratada en solución de 3% v/v de  $H_2O_2$  y pH 3,0 a temperatura ambiente, tal como se detalla en **Materiales y Métodos, apartado 3.13.3**. Para el pasaje de las células por el citómetro de flujo, las mismas se marcaron como se explicó anteriormente con fluoresceína diacetato (FDA) e ioduro de propidio (IP).

La **Figura 4.4.6** muestra los gráficos de densidad obtenidos (Raffellini, 2009). Como se observa en la misma, no toda la población al tiempo inicial se encontró en el cuadrante 4 el cual indica que poseen actividad metabólica y la membrana íntegra, sino que la población presentó un comportamiento heterogéneo (**Figura 4.4.6 a**). Esto demuestra que no toda la población se encontraba en el mismo estado metabólico, incluso hubo una subpoblación (16%) de células que mostró fluorescencia roja indicativo de daño en membrana, y a su vez no pudieron metabolizar el fluorocromo FDA. A medida que el tiempo de tratamiento fue aumentando los patrones de fluorescencia variaron. En la **Figura 4.4.6 b**, se observa que al minuto de tratamiento en la solución de  $H_2O_2$ , el número de eventos del cuadrante 4 disminuyó con el consiguiente aumento de eventos en los cuadrantes 1 y 3. A los 5 minutos de tratamiento puede observarse que, aumentó la subpoblación de células con daño en la membrana (**Figura 4.4.6 c**, cuadrante 1). El aumento de eventos en el cuadrante 3 podría deberse a que la fluoresceína sale de la célula por la progresiva desestabilización de la membrana ó debido a que la misma es expulsada activamente de la célula por las bombas que poseen las bacterias (Ananta y Knorr, 2009). A estas causas que explicarían la pérdida de fluorescencia verde e incremento de la fluorescencia roja al aumentar la severidad del tratamiento, se suman aquellos efectos que puede estar produciendo el estrés oxidativo. Por ejemplo, la desestabilización de la membrana por peroxidación de lípidos y por ende pérdida de la integridad y función de la membrana plasmática; o pérdida de actividad metabólica y en consecuencia, de la capacidad de las esterasas para hidrolizar FDA.

**Figura 4.4.6** Gráficos de densidad de FDA vs. IP para evaluar los efectos sobre la actividad esterasa e integridad de membrana en *E. coli* ATCC 11229 de la exposición a 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v/v pH 3,0 a 25°C durante a) 0 min, b) 1 min, c) 5min.

a)



b)

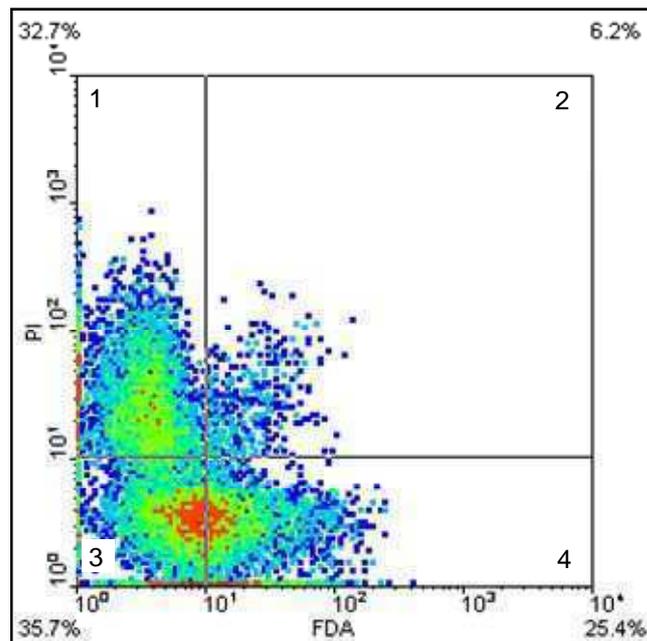
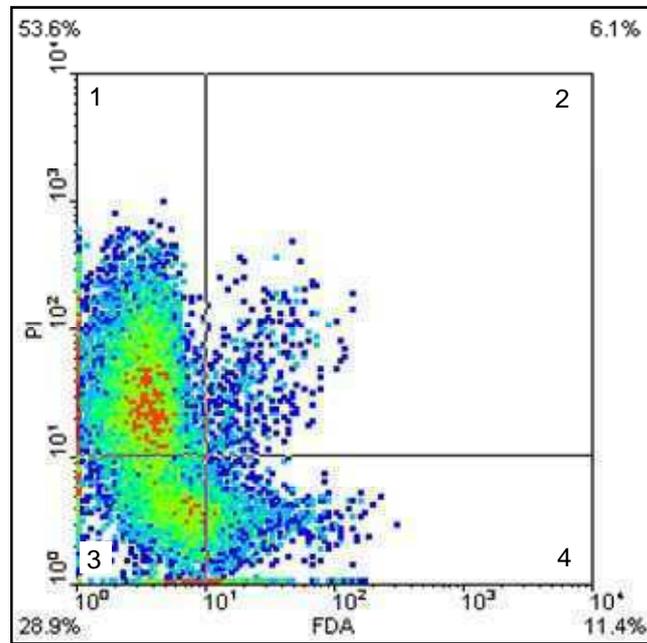


Figura 4.4.6 (continuación)

c)

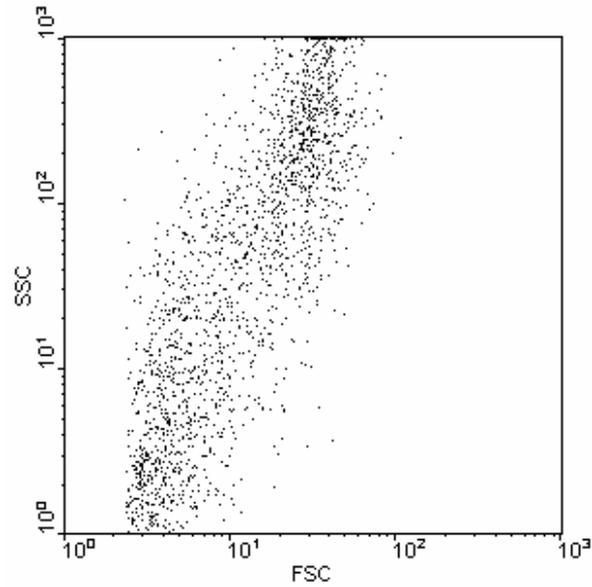


La curva de inactivación de *E. coli* obtenida por recuento en placa (**Figura 4.4.3 a**) no se correlacionó nuevamente con la fracción de células teñidas con IP (cuadrante 1), ya que como se explicó anteriormente, la citometría de flujo tiende a sobreestimar la viabilidad de los microorganismos comparada con el recuento en placa. Luego de 1 minuto de tratamiento en el análisis por citometría sólo el 32,7% de la población apareció en el cuadrante 1 (células con membrana severamente dañada y sin actividad metabólica, por lo tanto no viables), mientras que por recuento en placa se alcanzó una reducción de 1 ciclo logarítmico. Al cabo de 5 minutos de tratamiento, por citometría de flujo se visualizó un 53,6% de células teñidas con IP, mientras que en el recuento en placa no se detectaron colonias a partir de los 3 minutos de tratamiento. Esto revela que el ingreso de IP refleja el estado de la integridad de la membrana en la célula, sin embargo, la pérdida de la capacidad de formar colonias por la exposición al  $H_2O_2$  no se debería solamente a la alteración o degradación de la membrana celular.

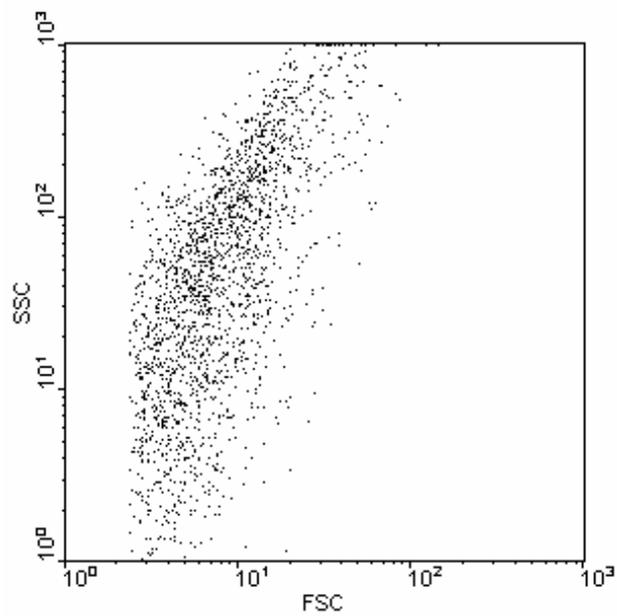
La dispersión frontal (FSC) y la dispersión lateral (SSC) para células de *E. coli* ATCC 11229 antes y después de la exposición a peróxido de hidrógeno se observa en la **Figura 4.4.7**. En células de *E. coli* sin tratar, se observó una distribución unimodal con respecto a FSC pero bimodal en relación a SSC, relacionada con la granulometría celular. Este comportamiento es característico de microorganismos con formas bacilares y puede ser atribuido a la diferente orientación de las células elongadas cuando pasan a través del rayo láser (Hewitt y Nebe-Von Caron, 2001). Después del tratamiento, se observó una distribución unimodal respecto a FSC y SSC, concentrada a valores intermedios en cuanto a la dispersión lateral. Ello estaría indicando un cambio en la forma y la granulometría de las células.

**Figura 4.4.7** Gráficos de punto tamaño (FSC) vs granularidad (SSC) de células de *E. coli* tratadas con 3,0 % v/v  $H_2O_2$  pH3 a 25°C. a) control, b) 5 min.

a)



b)



#### 4.4.6- Observación microscópica de células de *E. coli* ATCC 11229 en suspensión líquida tratada con peróxido de hidrógeno

En esta etapa se contemplaron los cambios estructurales asociados al estrés oxidativo en *E. coli* ATCC 11229 luego del tratamiento durante 5 min con 3% v/v de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a pH 3,0 y 25°C utilizando microscopía electrónica de transmisión (MET).

La **Figura 4.4.8** muestra las micrografías obtenidas en MET para células de *E. coli* ATCC 11229 control (sin tratar) y tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La pared celular de las células control apareció como una estructura multicapa compleja, visualizándose claramente la doble capa de la membrana externa, así como la capa interna de peptidoglicanos. Entre la pared y la membrana plasmática fue bien notorio el espacio periplásmico.

El tratamiento oxidativo provocó varios cambios estructurales. En la mayoría de las células, el periplasma no aparecía límpido como en las células control. La membrana externa y la membrana plasmática mostraron episodios de ruptura con formación de vesículas. En la pared se observó menor ondulación que en el caso de células intactas y la granulometría interna también se vio alterada, posiblemente en parte por el daño causado a las proteínas de los ribosomas (**Figura 4.4.8 b, d y f**). En coincidencia con los estudios de citometría de flujo, se observó una granulometría más uniforme en las células tratadas.

**Figura 4.4.8** Microfotografías en MET de células de *E. coli* ATCC 11229. **a, c, e, g:** control. **b, d, f, h:** células tratadas 5 min con 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pH 3,0 a 25°C. **om:** membrana externa; **p:** peptidoglicanos; **cm:** membrana plasmática, **pe:** periplasma. **a y b:** aspectos generales (escala 500 nm); **c-d:** aspectos generales (escala 200 nm); **g y h:** detalles (escala 100 nm); **e y f:** células en división (escala 200 nm).

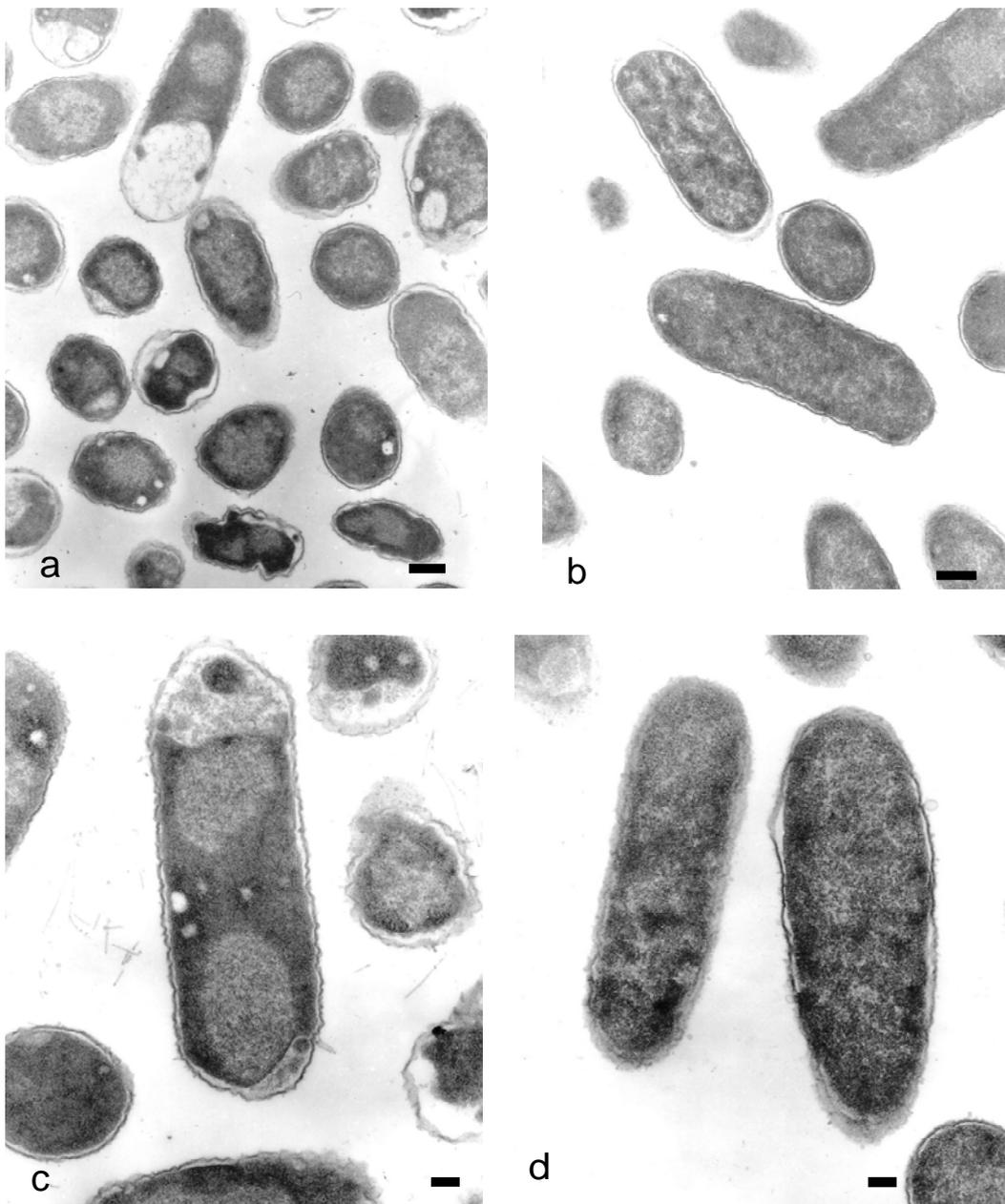
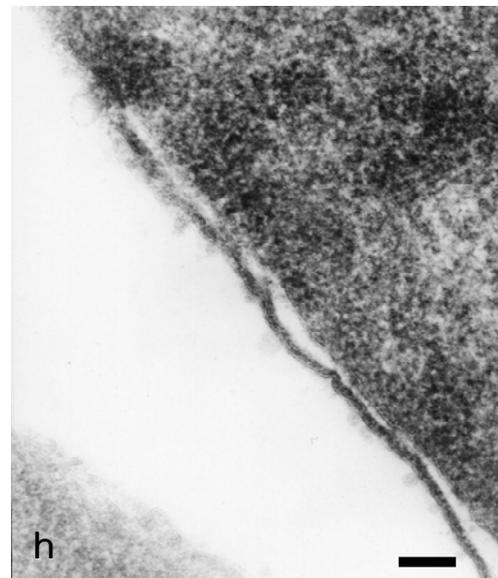
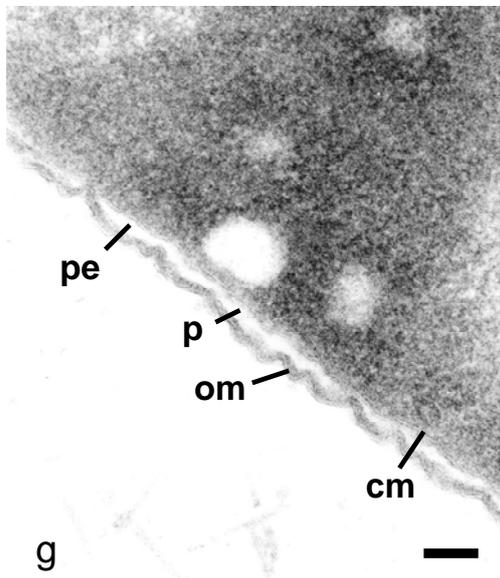


Figura 4.4.8 (continuación)



#### 4.5- Tratamientos combinados: luz ultravioleta y peróxido de hidrógeno

Luego de analizar el efecto individual de cada tecnología luz UV-C y peróxido de hidrógeno, sobre algunas especies de microorganismos, se estudió la aplicación de ambas de forma combinada.

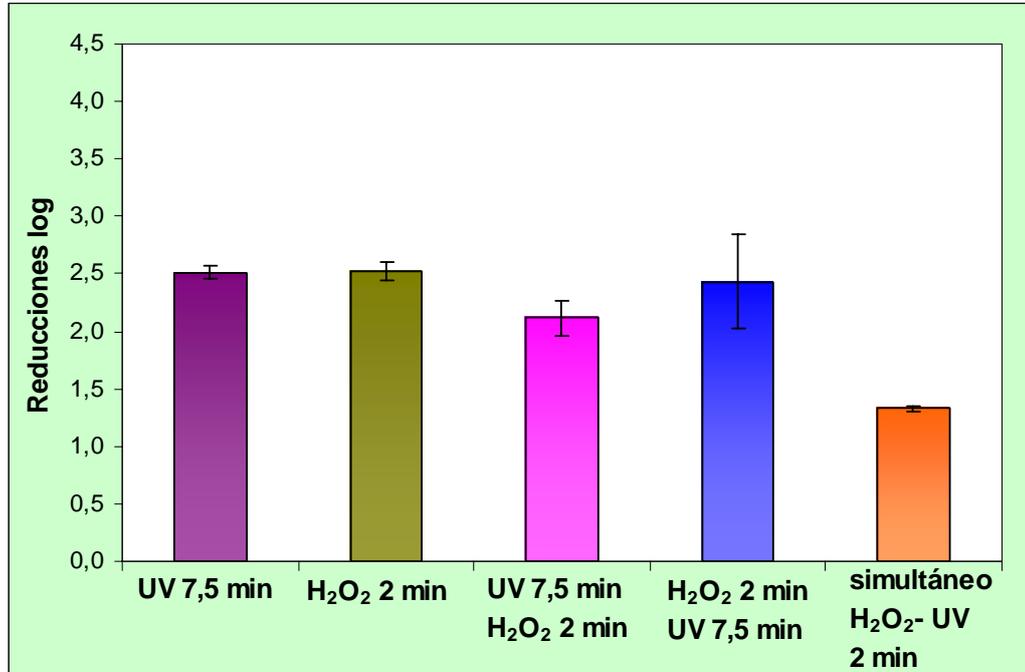
Para ello, se inoculó *E. coli* ATCC 11229 en rodajas de pera sin piel, para los tratamientos combinados en serie ( $H_2O_2 \rightarrow UV$  y  $UV \rightarrow H_2O_2$ ) y en simultáneo ( $UV/H_2O_2$ ), como se explica en **Materiales y Métodos apartados 3.8.3.1 y 3.8.3.2**. Los tiempos de tratamiento de cada tecnología se escogieron analizando los resultados obtenidos en las etapas anteriores. Para los tratamientos en serie, se seleccionó una dosis de irradiación UV-C de  $3,7 \text{ kJ/m}^2$  (correspondiente a 7,5 minutos) y tratamiento con  $H_2O_2$  3% v/v a pH 3,0 durante 2 ó 5 minutos, a temperatura ambiente. Cuando el ensayo fue en simultáneo los tiempos de exposición a ambos agentes (luz UV-C y  $H_2O_2$ ) fueron 2 y 5 minutos, en las condiciones mencionadas.

Los tratamientos en simultáneo ( $UV-C/H_2O_2$ ; 2 y 5 min), no produjeron una inactivación significativa de *E. coli*, para la cual sólo se obtuvo una reducción de 1,4 ciclos logarítmicos. Incluso fue menor que la inactivación obtenida aplicando cada tecnología individualmente. Esto podría deberse a que la solución de peróxido impide que toda la radiación UV-C que se emite llegue a la rodaja, ya que la luz UV tiene efecto superficial y así una menor proporción llega a penetrar la rodaja de pera produciendo una escasa reducción en la población de *E. coli* (Shama, 1999) (**Figura 4.5.1 a y b**). Hadjok y col. (2008), aplicaron  $H_2O_2$  en forma de spray a distintos alimentos bajo continua irradiación de luz UV y observaron mayor efectividad del proceso aunque dependió de la superficie del alimento a tratar. Utilizaron  $H_2O_2$  1,5 % v/v a  $50^\circ\text{C}$  y luz UV-C ( $3,8 \text{ kJ/m}^2$ ) durante 1 minuto de contacto en lechuga, espinaca, brócoli y tomate, en donde obtuvieron una reducción en la población de *E. coli* O157:H7 de 3,9; 4,8; 2,6 y 3,6 ciclos logarítmicos respectivamente.

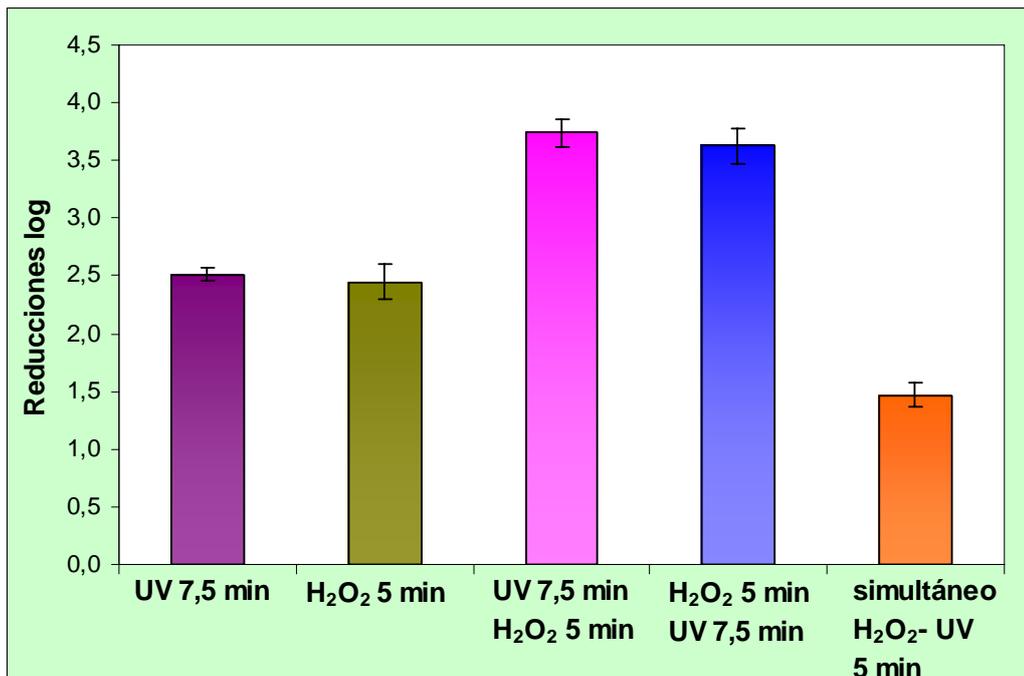
La efectividad del tratamiento cuando se aplicó en forma consecutiva,  $H_2O_2$ -UV y UV- $H_2O_2$  2 min, sobre rodajas de pera sin piel para inactivar *E. coli*, no mejoró la inactivación respecto de cada tratamiento individual. Sin embargo cuando se aplicó en forma consecutiva, en ambas secuencias y para 5 minutos de

**Figura 4.5.1** Reducciones logarítmicas alcanzadas en la población de *E. coli* debido a los tratamientos individuales: UV-C 7,5 minutos y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a) 2 min; b) 5 min, y a los tratamientos combinados UV-C/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /UV-C con a) UV-C 7,5 min y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 min; y b) UV-C 7,5 min y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 min. Tratamiento simultáneo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /UV-C por a) 2 min, b) 5 min.

a)



b)



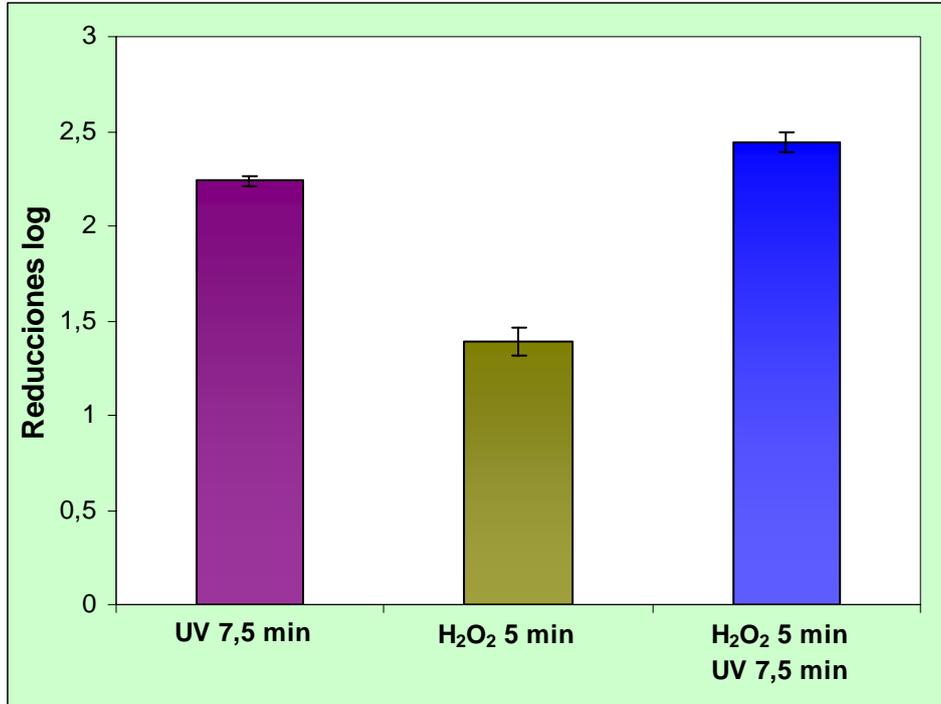
inmersión en la solución de  $H_2O_2$  se observó una mayor inactivación de la población de *E. coli*, obteniéndose una reducción de 3,6 ciclos logarítmicos.

Cuando se utilizaron *L. innocua* y *Z. bailii* no se llevó a cabo el ensayo en simultáneo (**Figura 4.5.2 a y b**), por ser microorganismos más resistentes y por la escasa efectividad observada en el caso de *E. coli*. Por lo tanto, se eligió ensayar el tratamiento consecutivo  $H_2O_2$ -UV con  $H_2O_2$  5 min y UV 7,5 min.

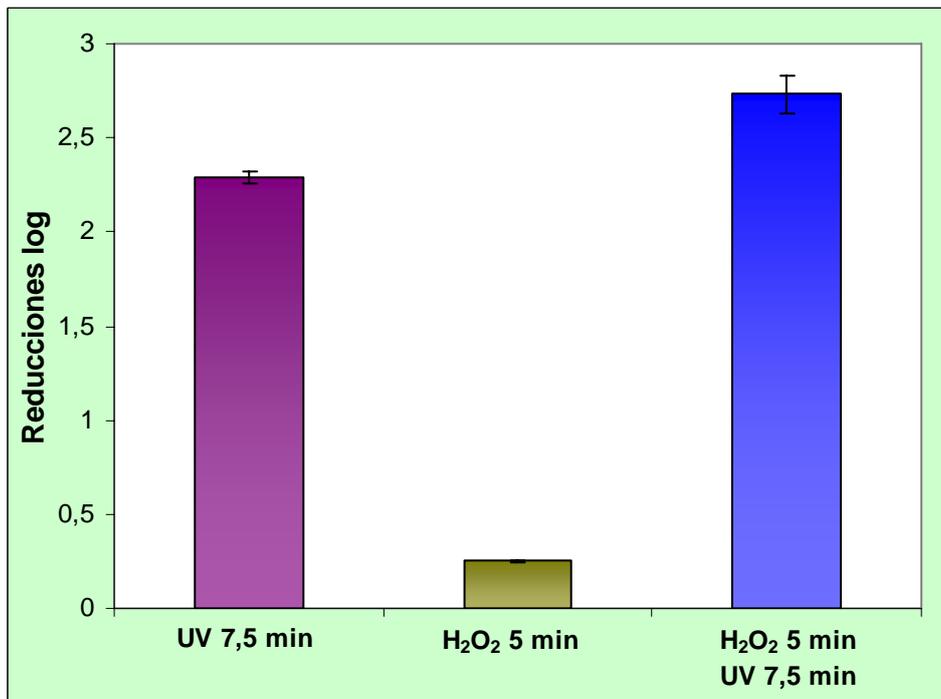
En ambos casos la inactivación fue mayor que la aplicación de los tratamientos por separado. Para *Z. bailii* se observa que la inactivación fue aditiva, lográndose una reducción de 2,7 ciclos logarítmicos, mientras que en *L. innocua* se obtuvo una inactivación de 2,4 ciclos logarítmicos, que se bien fue mayor que aplicando las tratamientos por separado no llegó a ser aditiva.

**Figura 4.5.2** Reducciones logarítmicas alcanzadas en las poblaciones de a) *L. innocua* y b) *Z. bailii* al aplicar luz UV-C 7,5 min; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 min y el tratamiento combinado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 min y UV-C 7,5 min a temperatura ambiente.

a)



b)



#### 4.6- Estudios de almacenamiento

Se llevó a cabo el estudio de almacenamiento de las rodajas de pera sin piel con el fin de analizar si hubo recuperación de los microorganismos remanentes injuriados (*E. coli*, ATCC 11229, *L. innocua* ATCC 33090 y *Z. bailii* NRRL 7256) luego de la aplicación del tratamiento de inactivación con la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% v/v con pH 3,0, durante 5 minutos y luz UV-C durante 7,5 minutos (3,7 kJ/m<sup>2</sup>), y rodajas control sin tratamiento, almacenadas durante 6 días en refrigeración (4°C).

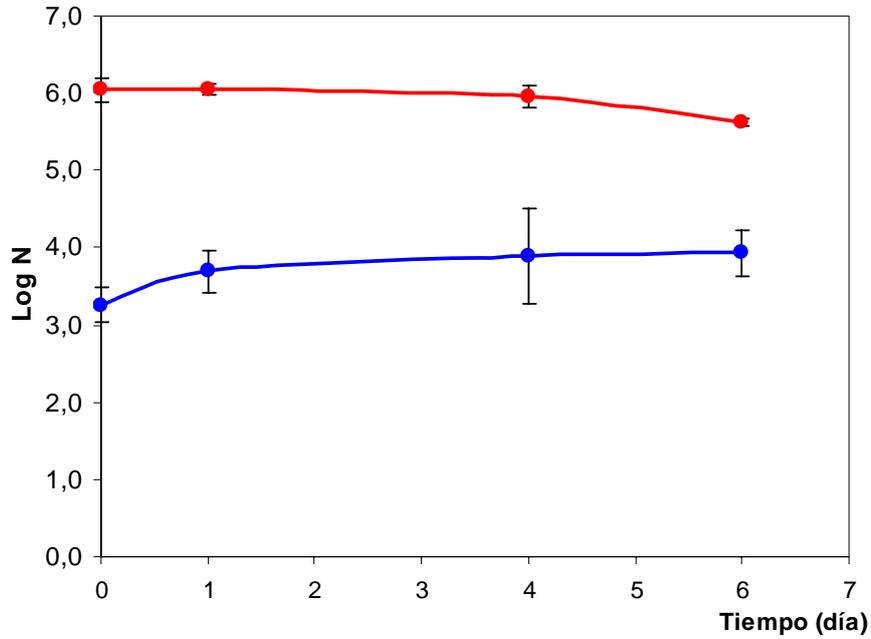
La evolución de los recuentos de los microorganismos ensayados se presenta en la **Figura 4.6.1**. En la misma se observa que la población de *E. coli* aumenta, pero levemente durante el primer día de almacenamiento en 0,4 ciclo logarítmico permaneciendo constante, y sin recuperación durante el resto del almacenamiento. Estos resultados concuerdan con lo observado por Hadjok y col., (2008) al aplicar luz UV-C (3,78 kJ/m<sup>2</sup>) en simultáneo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,5 % v/v, 50°C) en *E. coli* O157:H7 inoculada en lechuga y almacenada a 4°C durante 8 días.

En cambio, con *L. innocua* se observó un aumento de la población hasta el cuarto día de almacenamiento y finalmente, el recuento descendió hacia el final del almacenamiento. La población *Z. bailii* inoculada en rodajas de pera procesadas por el método combinado propuesto, permaneció aproximadamente constante durante todo el almacenamiento, mientras que en el sistema control proliferó.

Se puede concluir que la aplicación combinada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-UV-C en las condiciones antes descritas, redujo la población microbiana inoculada en rodajas de pera sin piel y que la población sobreviviente no pudo recuperarse, salvo con *L. innocua*, que finalmente disminuyó, a lo largo del almacenamiento refrigerado indicando daño severo. En el caso de los microorganismos sobrevivientes que pudieron reparar el daño inducido por el tratamiento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV-C, murieron durante el almacenamiento (Hadjok y col, 2008).

**Figura 4.6.1** Recuento de microorganismos en rodajas de pera sin piel tratados con  $H_2O_2$  al 3% v/v con pH 3,0 durante 5 min. y UV-C durante 7,5 min. ( $3,7 \text{ kJ/m}^2$ ) y almacenadas en bolsas estériles a  $4^\circ\text{C}$  por 6 días. a) *E. coli*, b) *L. innocua*, c) *Z. bailii*. (●) control, (●) tratadas.

a)



b)

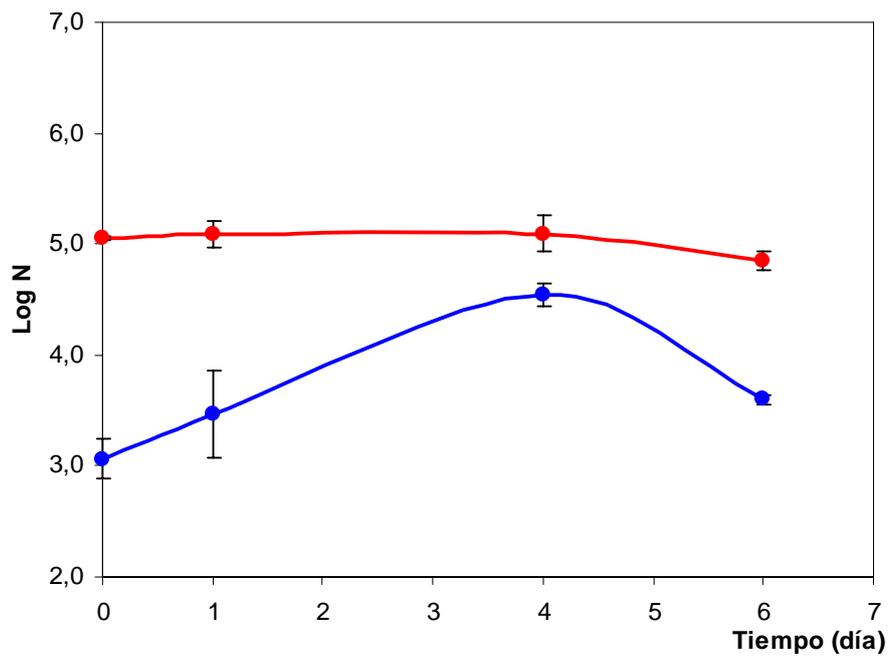
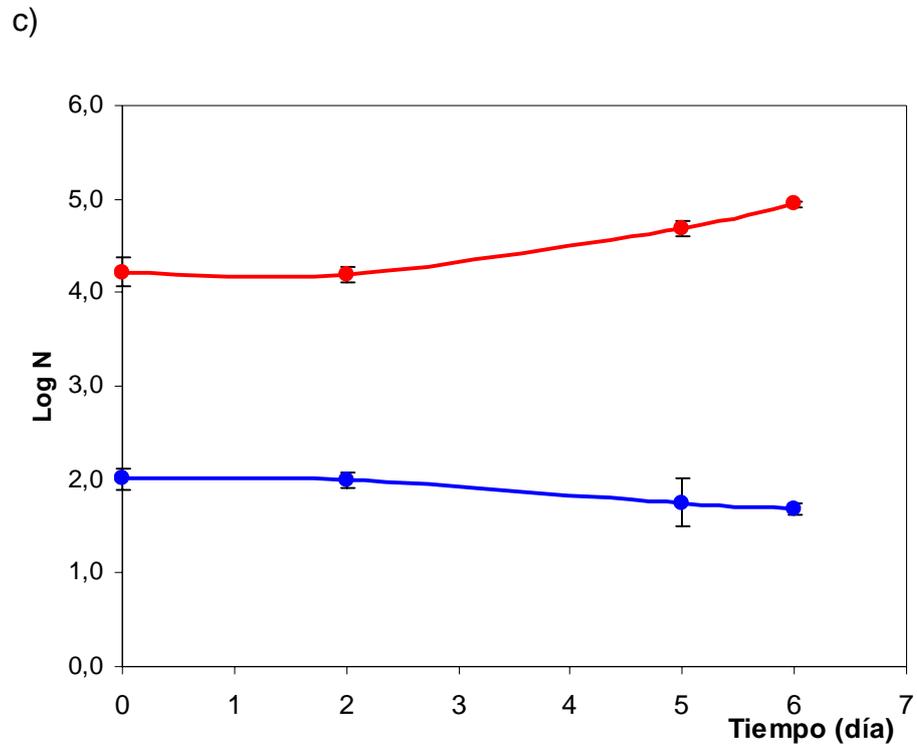


Figura 4.6.1 (continuación)



#### 4.7- Evolución de la flora nativa

Con el propósito de evaluar la calidad microbiológica de las rodajas de pera sin piel, procesadas por la metodología propuesta:

- Tratamiento **D**: UV-C sólo 7,5 min. ( $3,7 \text{ kJ/m}^2$ ).
- Tratamiento **E**: combinado en serie con inmersión en  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% v/v, pH 3,0; durante 5 min. y luego aplicación de UV-C durante 7,5 min.

Se estudió la evolución de la flora en las rodajas de pera sin piel sin ningún tratamiento (control) y rodajas de pera sometidas a los tratamientos mencionados y almacenadas en refrigeración ( $4^\circ\text{C}$ ) durante 8 días. En esta etapa del estudio se utilizaron peras deterioradas, con el propósito de situarse en el peor escenario de prueba para verificar la eficiencia de los procesos propuestos, motivo por el cual se obtuvieron recuentos iniciales elevados de parte de la flora nativa.

Tal como se describió en **Materiales y Métodos, apartado 3.12** se siguió el recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales, ácido-tolerantes mesófilos, hongos y levaduras.

El tratamiento propuesto **E** (inmersión en  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% v/v, pH 3,0; durante 5 min. y aplicación de luz UV-C durante 7,5 min.,  $3,7 \text{ kJ/m}^2$ ) resultó altamente efectivo, inhibiendo casi por completo todos los microorganismos integrantes de la flora nativa de la pera durante el tiempo de almacenamiento evaluado, obteniéndose menos de 15 UFC/g de pera, en todos los recuentos realizados (**Figura 4. 7.1**).

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos de las rodajas de pera sin tratar, disminuyó en los primeros días de almacenamiento, sin embargo, después del tercer día se obtuvieron recuentos cada vez mayores hasta llegar a  $1,8 \times 10^5$  UFC/g al final del almacenamiento. Lo mismo ocurrió con las rodajas de pera procesadas según el tratamiento **D** (UV-C 7,5 min,  $3,7 \text{ kJ/m}^2$ ), donde hubo una leve disminución al primer día, pero luego se obtuvieron recuentos cada vez mayores hasta el día 8 de almacenamiento, llegando a obtenerse un recuento de  $2,6 \times 10^4$  UFC/g, aproximadamente 1 ciclo log menos que las rodajas de pera control.

Similares resultados obtuvieron Fonseca y Rushing (2006), quienes aplicaron luz UV-C a rodajas de sandía durante 3 min. ( $4,1 \text{ kJ/m}^2$ ) con posterior almacenamiento a  $3 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 7 días.

Estos autores obtuvieron una reducción de 1,5 ciclos log aplicando el tratamiento con UV-C (día 0), y al final del almacenamiento (día 7), observaron que el recuento de microorganismos mesófilos aumentó 3,7 ciclos log en las muestras control y en menor medida en las tratadas por luz UV-C (2,5 ciclos log).

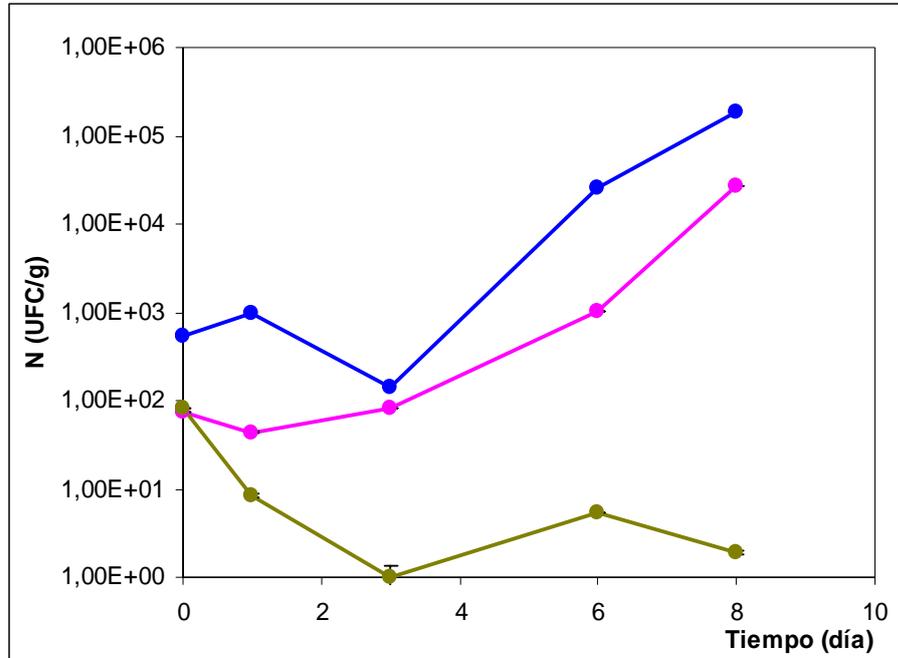
Del recuento total de los microorganismos mesófilos ( $\cong 5,4 \times 10^2 \text{ UFC/g}$  de las rodajas sin tratar y  $\cong 7,4 \times 10^1 \text{ UFC/g}$  de las rodajas sometidas al tratamiento propuesto **D** una proporción resultó ácido-tolerante. Los recuentos de los microorganismos ácido-tolerantes mesófilos de las rodajas sin tratar (**C**), se incrementó a partir del tercer día hasta 2 ciclos logarítmicos al final del almacenamiento. Con el tratamiento propuesto **D**, el recuento disminuyó 1 ciclo log al primer día de almacenamiento, que luego comenzó a incrementarse hasta el final del almacenamiento llegando a los niveles de recuento de los muestras control ( $\cong 1,8 \times 10^4 \text{ UFC/g}$ ) (**Figura 4.7.1 b**).

Si bien se observó el desarrollo de algunos hongos filamentosos durante el almacenamiento, la mayor parte del recuento estuvo integrado por levaduras. Al inicio del almacenamiento, los recuentos de hongos y levaduras correspondientes a las rodajas de peras sin tratamiento resultaron bajos ( $\cong 2,4 \times 10^2 \text{ UFC/g}$  de pera). Sin embargo aumentaron rápidamente del tercer al octavo día de almacenamiento, llegando a  $3,6 \times 10^4 \text{ UFC/g}$  de pera. El tratamiento **D** inhibió el desarrollo de estos microorganismos hasta el primer día, a partir del cual creció el recuento hasta  $1,1 \times 10^4 \text{ UFC/g}$  al octavo día de refrigeración (**Figura 4.7.1 c**).

**Figura 4.7.1** Evolución de la flora nativa durante el almacenamiento en refrigeración (4°C) de rodajas de pera sin piel. a) Aerobios mesófilos; b) Aerobios mesófilos ácido-tolerantes, c) Hongos y levaduras.

● Rodajas de pera sin tratamiento (control); ● Rodajas de pera procesadas según tratamiento D; ● Rodajas de pera procesadas según tratamiento E.

a)



b)

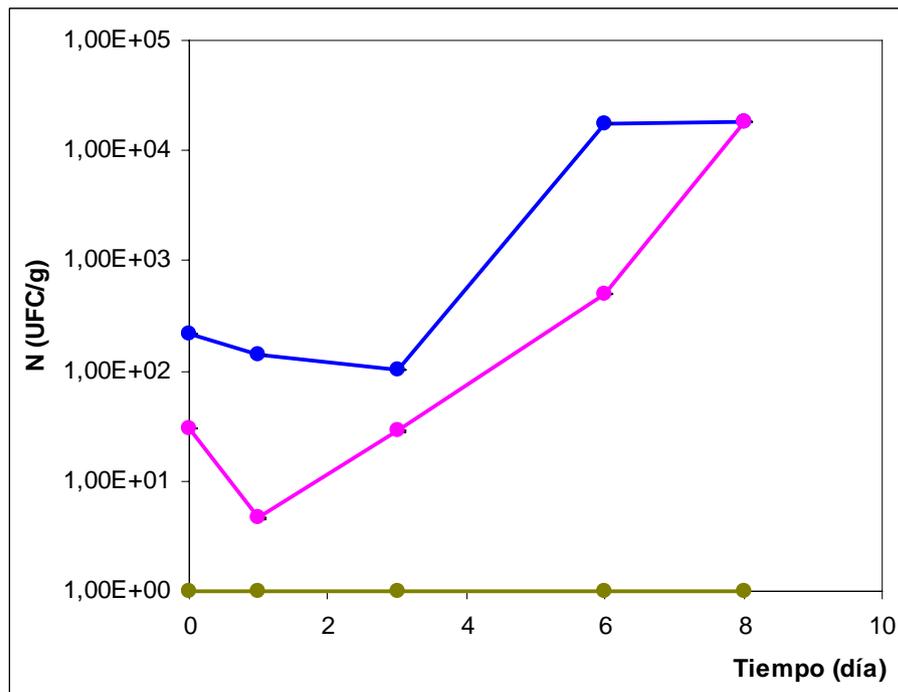
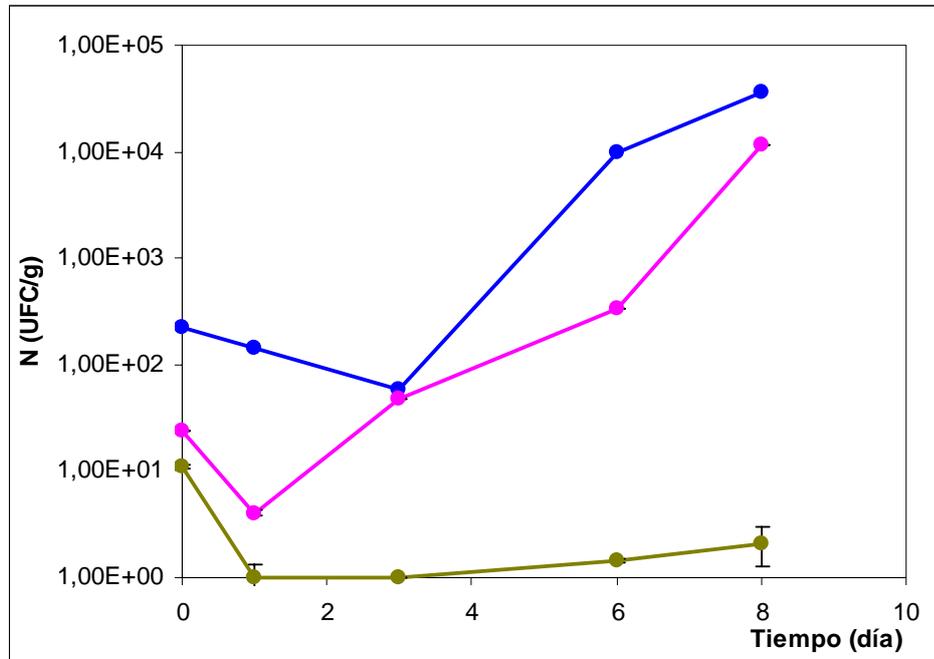


Figura 4.7.1 (continuación)

c)



Es posible concluir que las rodajas de pera sin piel procesadas según el tratamiento propuesto **E**, mantuvieron óptima estabilidad microbiológica durante los 8 días de almacenamiento en refrigeración. El tratamiento propuesto **D**, si bien mostró menor severidad destruyendo la flora nativa, principalmente de bacterias, que aumentó aproximadamente 2 ciclos log, fue efectivo inhibiendo la proliferación de hongos y levaduras hasta 6 días. Esto podría deberse a que el peróxido de hidrógeno produce un daño subletal en las enzimas de los microorganismos debido a los radicales libres que forma y provocaría una disrupción parcial de la membrana, alterando su permeabilidad que sumado a la radiación ultravioleta favorecería más aun, la desestabilización de la membrana y el daño al ADN, produciendo alteración de su estructura con pérdida de funcionalidad, afectando la actividad celular y por lo tanto inhibiendo el crecimiento (Crowe y col., 2007). Sin embargo, las condiciones de operación al aplicar estas tecnologías deben optimizarse para cada producto. Algunos autores (Crowe y col., 2007) al aplicar un tratamiento combinado UV (0,25- 0,55 kJ/m<sup>2</sup>)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1%) no obtuvieron suficientes reducciones decimales en inactivar la microflora asociada a blueberries, alegando que la falta de sinergismo fue consecuencia de aplicar el peróxido de hidrógeno a temperatura ambiente, lo cual genera una escasa producción de radicales libres.

## 4.8- Evolución del color

### 4.8.1- Uso de soluciones antipardecimiento

Las soluciones antipardecimiento se aplican como pretratamiento a las frutas mínimamente procesadas para inhibir el pardecimiento superficial durante su almacenamiento, así se le realice o no un tratamiento de conservación posterior. La efectividad de las soluciones que se utilizan dependen de la fruta, la variedad con la que se trabaja y con el tiempo de inmersión en la misma. En este trabajo, se utilizaron algunas soluciones ya aplicadas en pera y otras utilizadas generalmente en manzana (Sapers y Miller, 1998; Dong y col., 2000) como soluciones de inmersión durante 1 ó 3 minutos de las rodajas de pera de acuerdo al procedimiento descrito en **Materiales y Métodos, apartado 3.15**.

Las soluciones aplicadas fueron las siguientes:

- Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 1%
- Lactato de calcio 1% + Ácido ascórbico 2 %
- Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,1% + Ácido ascórbico 1%

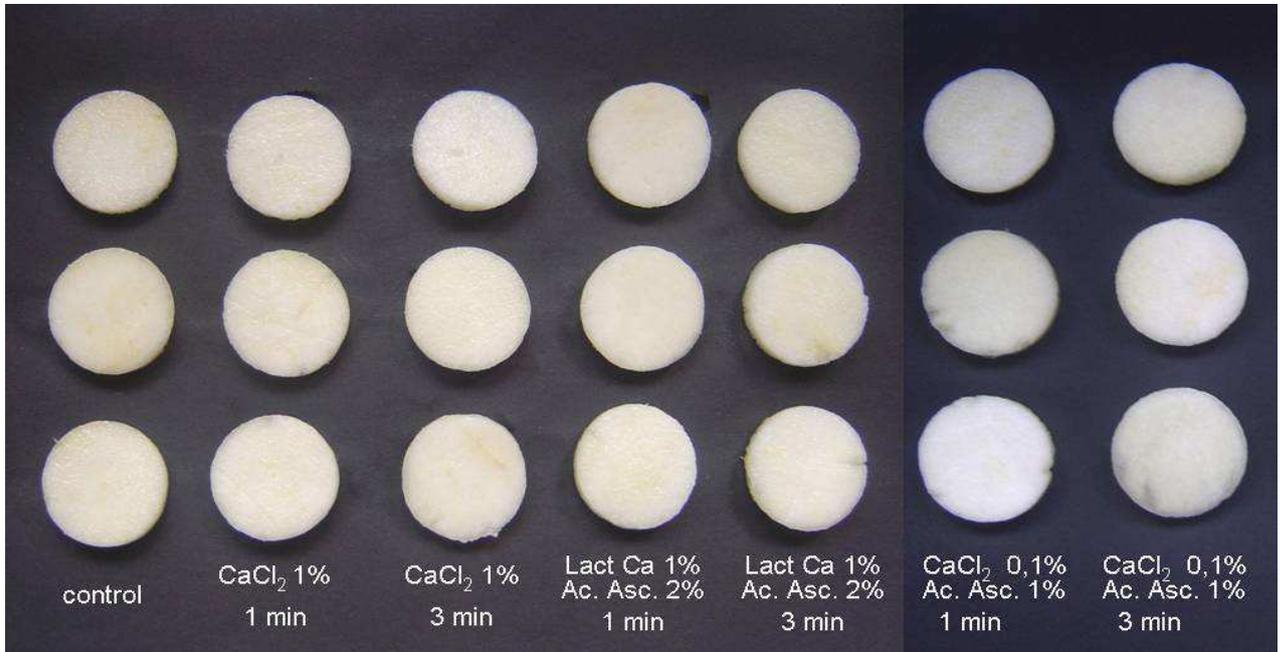
En la **Figura 4.8.1** se muestra las fotografías de las rodajas luego de la inmersión por 1 ó 3 minutos en las distintas soluciones a tiempo 0 y 4 días de almacenamiento en bolsas estériles a 4°C. A tiempo cero, no se observaron diferencias marcadas entre las rodajas de pera sin pretratamiento (control) y las inmersas 1 ó 3 minutos en las soluciones antipardecimiento (**Figura 4.8.1 a**).

Al día 4 de almacenamiento, se observó que las rodajas de pera pretratadas por 1 ó 3 minutos con Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,1% + Ácido ascórbico 1%, resultaron ser las muestras más pardecidas. Con el resto de las soluciones no se percibió una notoria mejoría de las rodajas de pera, siendo que quedaron prácticamente igual que las rodajas control (**Figura 4.8.1 b**).

Ninguna de las soluciones antipardecimiento empleada para esta variedad de pera fue satisfactoria, ni ofreció ventaja alguna en la inhibición del pardecimiento durante el almacenamiento de las rodajas de pera. Debido a esto, se estableció no usar soluciones antipardecimiento como pretratamiento a la irradiación con luz UV-C y/o tratamiento con peróxido de hidrógeno.

**Figura 4.8.1** Aspecto de las rodajas de pera sin pretratamiento (control) e inmersas en distintas soluciones antipardeamiento. a) día 0, b) día 4.

a)



b)



#### 4.8.2- Elección del método de envasado de las rodajas de pera

Con el objeto de determinar un método de envasado de las rodajas de pera sencillo pero adecuado para realizar el seguimiento del color de la fruta, se colocaron rodajas de pera de 1 cm de espesor sin tratamiento en diversos envases, tal como se detalla en **Materiales y Métodos, apartado 3.16.1**. Una vez envasadas se almacenaron a 4°C al abrigo de la luz durante 8 días.

Mediante la medición instrumental de color se obtuvieron durante el almacenamiento los valores triestímulo: X, Y y Z (espacio CIE) y las correspondientes transformaciones matemáticas:  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  (espacio CIE lab) de forma automática.

La **Figura 4.8.2** muestra los cambios de color producidos en rodajas de pera almacenadas en diversos envases, según las funciones de color  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e Índice de pardeamiento.

No se observó gran disparidad entre los diferentes métodos de envasado en cuanto a la disminución de la luminosidad (incremento de  $L^*_0-L^*$ ) ó el aumento del parámetro  $a^*$  (incremento de  $a^*-a^*_0$ ) en el tiempo, aunque el envasado en bolsa de polietileno sin aplicación de vacío mostró el menor cambio en dichos parámetros respecto del inicio del almacenamiento. La aplicación de vacío no generó ventajas y muy por el contrario se observó una disminución marcada de la luminosidad a partir del día 4 de almacenamiento, siendo más notoria en el envase con vacío total (**Figura 4.8.2 a y b**). Esto puede deberse a que al tratarse de tejidos vivos, la aplicación de vacío puede dejar de representar una ventaja por favorecer la respiración anaeróbica (fermentación alcohólica o láctica) de los mismos. Los envases PET y vidrio resultaron en un aumento muy marcado del IB y del parámetro  $b^*$  mientras que nuevamente el envase de polietileno sin aplicación de vacío presentó el mínimo cambio de ambos indicadores durante el almacenamiento (**Figura 4.8.2 c y d**).

**Figura 4.8.2** Evolución de las funciones de color de rodajas de pera con el almacenamiento a 4 °C durante 8 días. Envases: (●) polietileno tereftalato (PET); (●) frasco de vidrio; (●) polietileno sin vacío; (●) polietileno con aplicación de vacío, 24 cm Hg; (●) polietileno con aplicación de vacío, 42 cm Hg; (●) polietileno con aplicación de vacío, 66 cm Hg. a) Luminosidad, L\*; b) a\*;

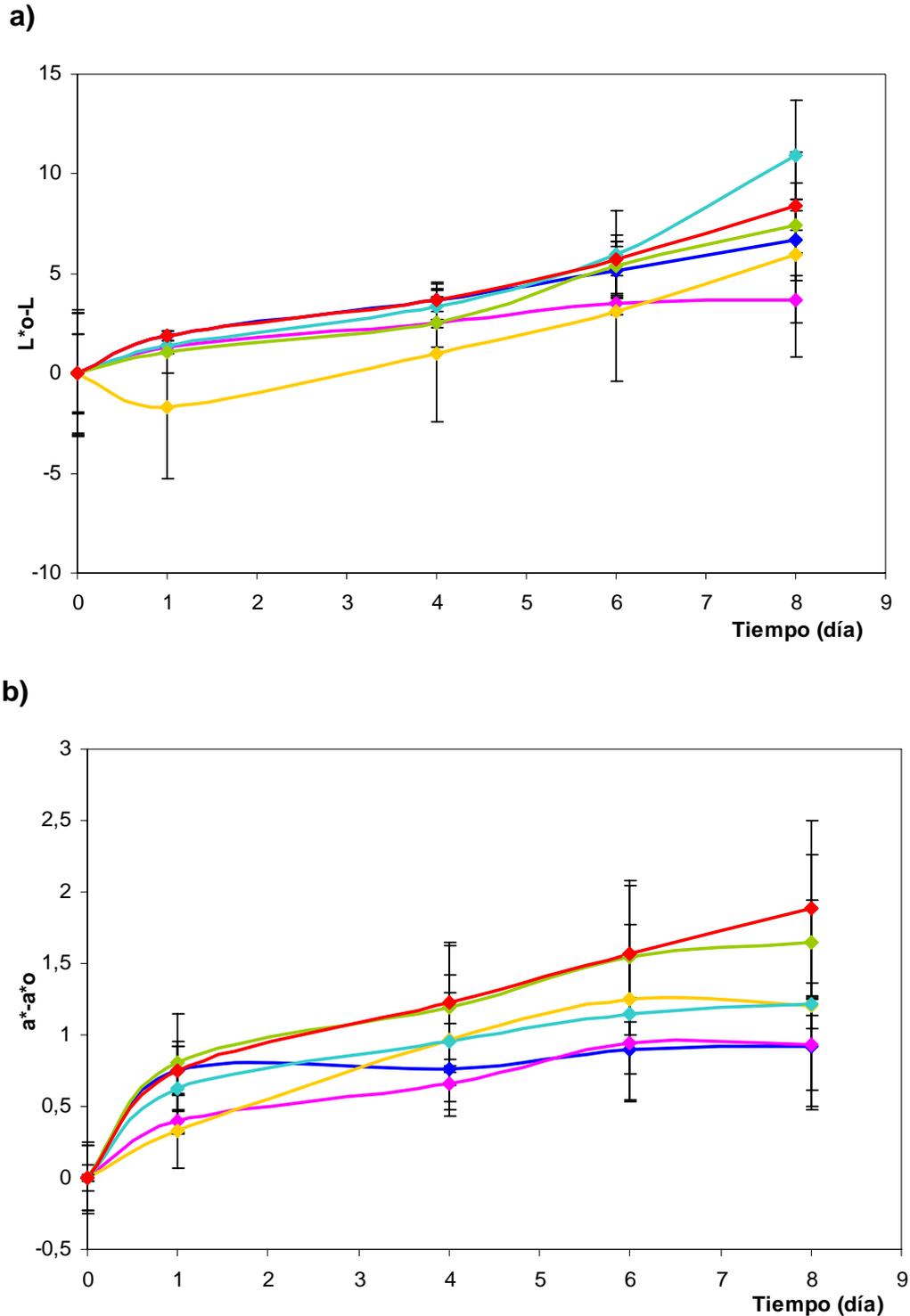
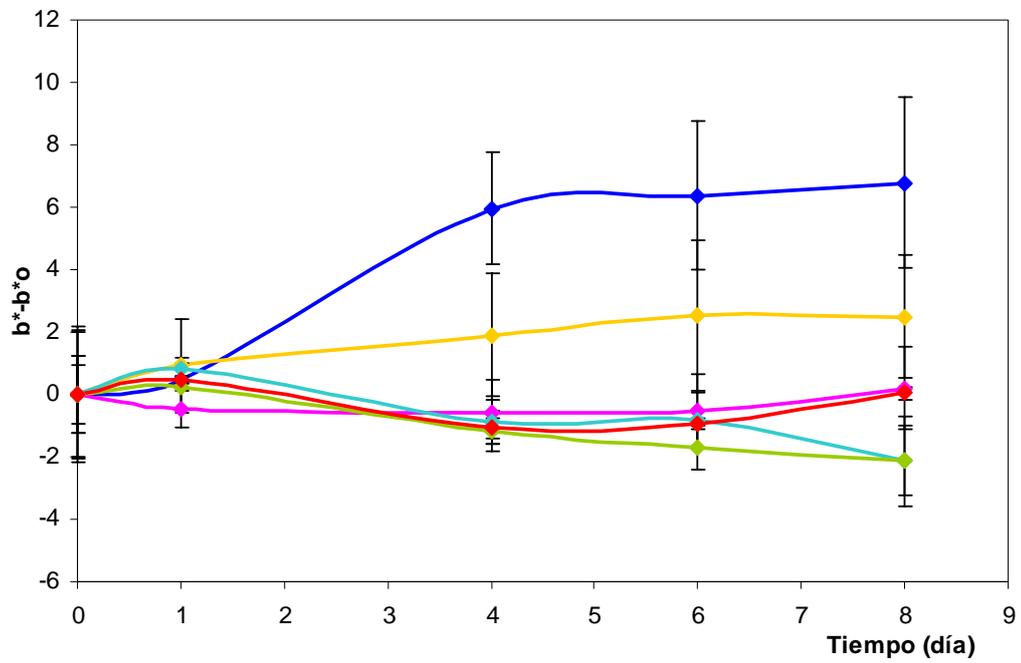
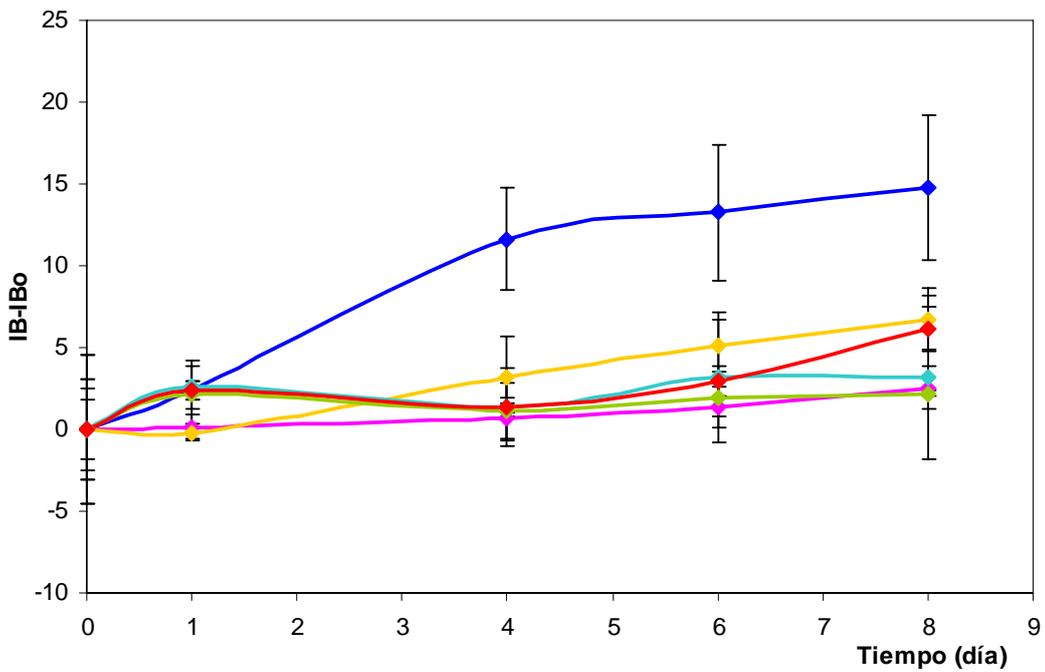


Figura 4.8.2 (continuación)

c)



d)



De acuerdo a los resultados obtenidos, se decidió utilizar un envase de polietileno sin aplicación de vacío para medir el cambio de color de rodajas de pera procesadas con luz UV-C y/o peróxido de hidrógeno.

#### 4.8.3- Medición del cambio de color

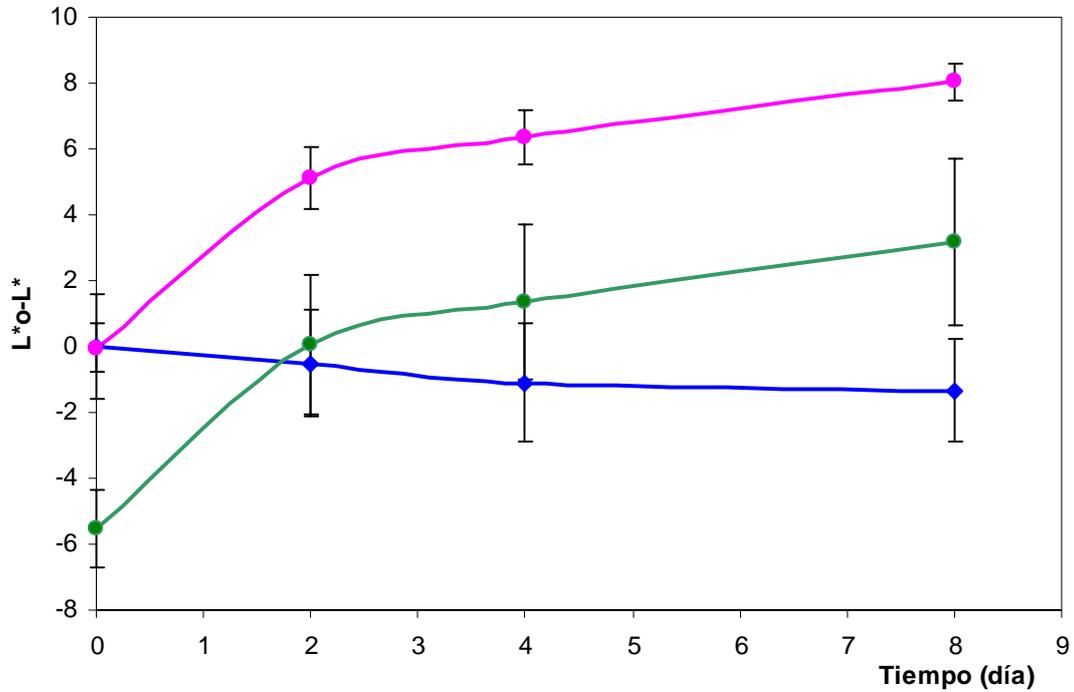
Se analizó la evolución del color a lo largo del almacenamiento de rodajas de pera sometidas a irradiación UV-C por 7,5 min ( $3,7 \text{ kJ/m}^2$ ) (sistema **D**); rodajas de pera con inmersión en  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% v/v y pH 3,0 durante 5 min seguido de irradiación UV-C por 7,5 min (sistema **E**) y rodajas de pera sin tratamiento (control, sistema **C**). Este estudio se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en **Materiales y Métodos, apartado 3.16**.

Las rodajas de pera fresca tenían un color blanco-crema representado por valores de  $L^*$  entre 55,4 y 70,5, valores de  $a^*$  entre -2,1 y 1 y valores de  $b^*$  entre 14,2 y 21. Si bien se midieron 10 muestras, el rango de cada parámetro resultó bastante amplio debido a la variabilidad biológica de las muestras, por lo que se aplicó posteriormente un test de ANOVA para verificar si hubo diferencias significativas entre los tratamientos aplicados.

En la **Figura 4.8.3** se presentan los valores promedio de los parámetros colorimétricos  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , así como también el índice de pardeamiento para los distintos sistemas a lo largo del almacenamiento refrigerado (expresados como diferencias con respecto a los parámetros obtenidos de la muestra fresca al día 0). Los valores del parámetro  $L^*$  (**Figura 4.8.3 a**) de las muestras control presentaron escasa variación a lo largo del almacenamiento. Al día 0 de almacenamiento, se observó en las muestras del sistema E un incremento del parámetro  $L^*$  respecto de las muestras control, evidenciando que el tratamiento combinado  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV-C}$  confirió a las muestras mayor luminosidad inicial (**Figura 4.8.4 a**). Sin embargo, hubo en ambos sistemas tratados (**D** y **E**), un considerable incremento del valor de  $L^*$  al día 2, siendo este aumento menos significativo hacia el final del almacenamiento. Esto indicaría un mayor oscurecimiento de las muestras tratadas con respecto a las muestras control. En general, todas las muestras presentaron un aumento del parámetro  $a^*$ , pero este fue más pronunciado en las peras tratadas, especialmente al día 2 de almacenamiento,

**Figura 4.8.3** Valores promedio de las funciones de color a)  $L^*$  ( $L^*_0-L^*$ ), b)  $a^*$  ( $a^*-a^*_0$ ), c)  $b^*$  ( $b^*-b^*_0$ ) y d) IB ( $IB-IB_0$ ), obtenidas durante al almacenamiento de las rodajas de pera (●) control (sistema C), (●) tratadas con luz UV-C 7,5 min ( $3,7 \text{ kJ/m}^2$ ) (sistema D) y (●) tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  5 min seguido de luz UV-C 7,5 min (sistema E).

a)



b)

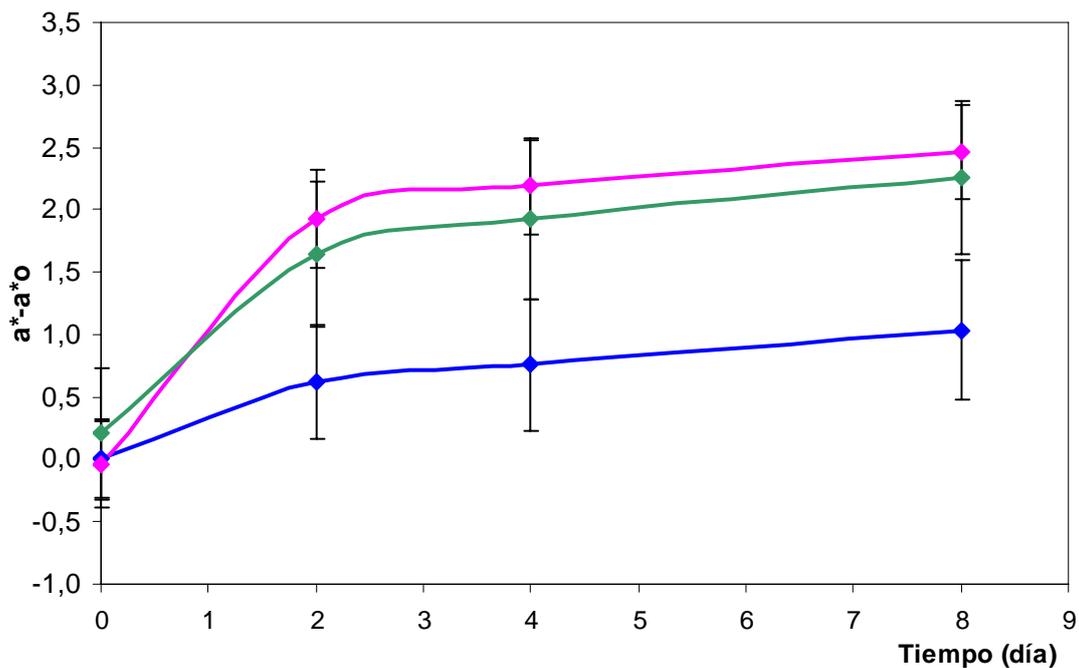
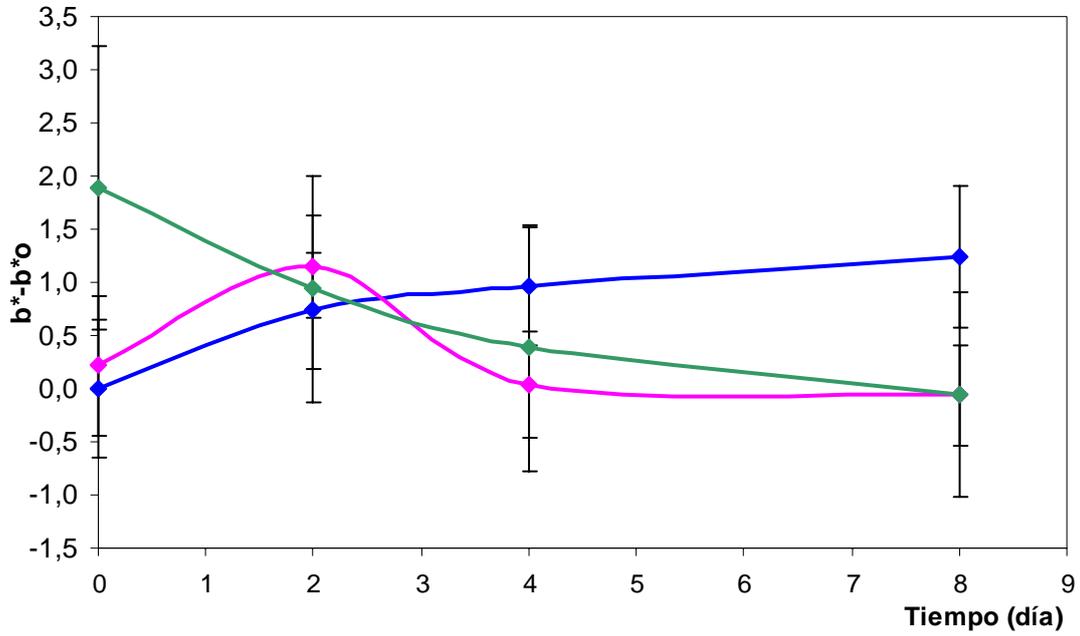
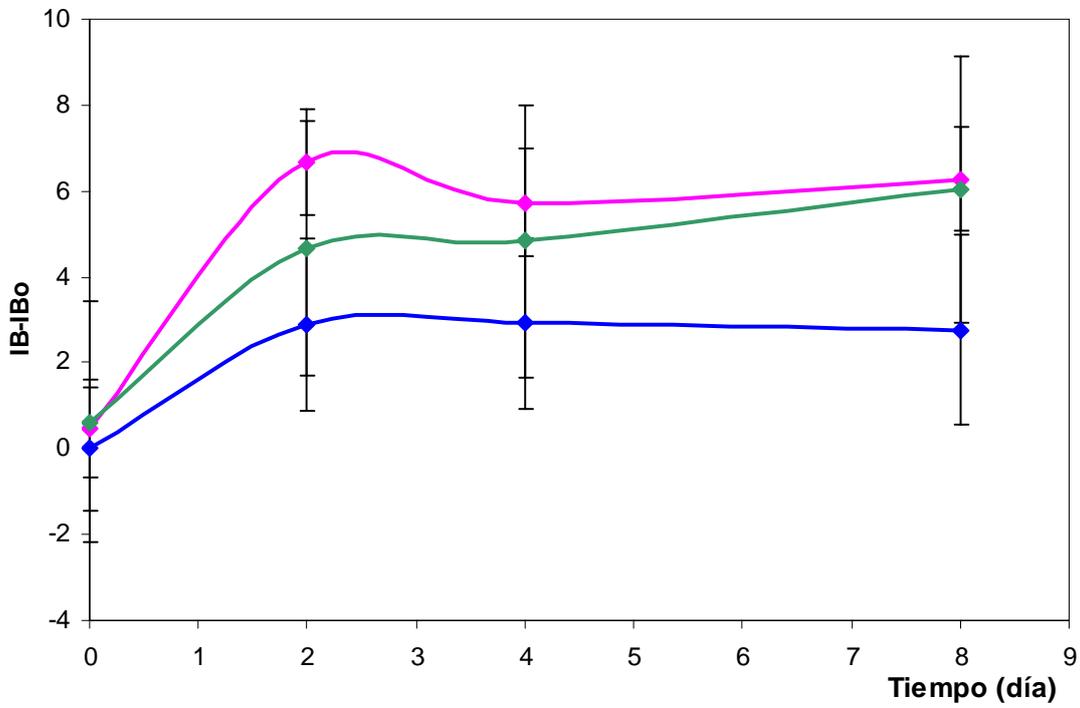


Figura 4.8.3 (continuación)

c)



d)



siendo más leve el aumento en los días subsiguientes. Los cambios simultáneos en ambos parámetros,  $L^*$  y  $a^*$ , fueron un buen indicador del pardeamiento durante el almacenamiento, probablemente debido al resultado de reacciones de pardeamiento oxidativo. Al final del almacenamiento, las muestras tratadas se presentaron algo más pardas que los controles y este efecto fue un poco más marcado en el sistema **D** (UV 7,5 min), (**Figura 4.8.3 a y b**) y (**Figura 4.8.4 c**). Varios autores han reportado que una disminución en el valor de  $L^*$  y un incremento en el valor de  $a^*$ , son indicativos de pardeamiento en manzana (Monsalve-González y col., 1993; Gómez y col., 2010) y en pera (Clark y col., 2002).

El parámetro  $b^*$  presentó en las muestras tratadas, un aumento inicial inmediatamente después del tratamiento, que en el caso del sistema **D** siguió aumentando hasta el segundo día y luego disminuyó hasta el final del almacenamiento, mientras que en el sistema **E** la disminución de dicho parámetro se dio desde el principio del almacenamiento.

En la **Figura 4.8.3 d** se muestran los valores del índice de pardeamiento (IB) (expresado como diferencia con los valores de IB de las rodajas frescas al día 0) de las muestras tratadas y almacenadas (4°C). Al inicio del almacenamiento, no se manifestó una diferencia notoria de los valores de  $\Delta IB$  entre los diferentes sistemas. Estos valores se incrementaron al segundo día, luego del cual, el sistema **C** permaneció casi constante, el sistema **D** disminuyó hasta el cuarto día y permaneció casi constante hasta el final del almacenamiento, mientras que el sistema **E** tuvo un leve incremento en el IB hasta el final del almacenamiento.

Con el propósito de determinar estadísticamente la influencia de las variables tiempo de almacenamiento y tratamiento sobre los parámetros de color  $L^*$ ;  $a^*$   $b^*$  y la función de color IB, se realizó un análisis de varianza siguiendo el procedimiento del Modelo Lineal Generalizado, utilizándose como variable categórica al tratamiento y como variable cuantitativa, al tiempo (ver **Apéndice de Procedimientos Estadísticos, apartado 6.5**).

La **Tabla 4.8.1 a** resume el análisis de varianza de los modelos propuestos para describir la relación existente entre la respuesta ( $L^*$ ;  $a^*$ ;  $b^*$  ó IB) y las variables independientes: tiempo y tratamiento. Los valores de F para la regresión completa variaron entre 5,7 y 18,8 resultando significativos al 5% de nivel de significación, indicando que existe una relación estadísticamente significativa

entre la respuesta y las variables independientes tenidas en cuenta por los modelos. Los valores del coeficiente de determinación ( $R^2$ ), indicaron que entre el 82,6% (IB) y el 94,0% ( $L^*$ ) de la variación en las respuestas han sido explicada por los modelos propuestos.

El análisis de los términos de los modelos revela que, *tiempo de almacenamiento* fue el factor de mayor significación estadística (F parciales muy significativos en todos los casos). La elevada significación de este término resulta predecible, dado que, a medida que transcurre el almacenamiento, proceden distintas reacciones de deterioro en el tejido vegetal que afectan su color. En el caso de los parámetros  $L^*$  y  $b^*$ , la significación del término cruzado *tiempo\*tratamiento* confirma la interacción observada entre estos factores y permite concluir que la evolución de las respuestas ( $L^*$  y  $b^*$ ) en el tiempo de almacenamiento dependió del tratamiento considerado.

No se observaron diferencias significativas debida a los tratamientos en los parámetros  $a^*$ ,  $b^*$  y la función IB a  $\alpha$ -nivel de significación de 5%. Sólo se presentaron diferencias significativas en el parámetro  $L^*$  de los diferentes tratamientos estudiados. Para establecer cuales tratamientos diferían entre sí en cuanto a su luminosidad (parámetro  $L^*$ ), se realizó un test de MDS (Mínima Diferencia Significativa) de Fisher con un  $\alpha$ -nivel de significación del 5%.

La **Tabla 4.8.1 b**, resume los resultados obtenidos. Las rodajas de pera tratadas por el método combinado (sistema **E**) no difirieron en cuanto a la luminosidad ( $L^*$ ) durante el almacenamiento respecto de las rodajas sin tratar (sistema **C**) pero sí ambas, fueron significativamente diferentes de las rodajas irradiadas con luz UV-C (sistema **D**) (**Figura 4.8.3 y Tabla 4.8.1 b**).

**Tabla 4.8.1** a) Resultado del test ANOVA que relaciona las variables tratamiento y tiempo de almacenamiento, para los diferentes parámetros colorimétricos L\*, a\*, b\* y la función de color IB. b) Mínima diferencias significativas de Fisher (MDS) para el parámetro L\*. Sistema C: control; sistema D: UV-C 7,5 min; sistema E: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 min + UV-C 7,5 min.

a)

PARAMETRO	FUENTE	GL	SC	MC	F <sup>a</sup>	α
L*	TRATAM	2	32,59	16,30	8,62 <sup>S</sup>	0,0172
	TIEMPO	1	47,94	47,94	25,34 <sup>S</sup>	0,0024
	TRAT*TIEMPO	2	56,07	28,04	14,82 <sup>S</sup>	0,0048
	ERROR	6	11,35	1,89		
	TOTAL	11	147,95			
a*	TRATAM	2	0,49	0,25	1,65 <sup>NS</sup>	0,2693
	TIEMPO	1	5,44	5,44	36,16 <sup>S</sup>	0,0010
	TRAT*TIEMPO	2	1,45	0,72	4,81 <sup>NS</sup>	0,0567
	ERROR	6	0,90	0,15		
	TOTAL	11	8,28			
b*	TRATAM	2	1,97	0,99	2,3 <sup>NS</sup>	0,1809
	TIEMPO	1	6,12	6,12	14,3 <sup>S</sup>	0,0092
	TRAT*TIEMPO	2	6,16	3,08	7,19 <sup>S</sup>	0,0255
	ERROR	6	2,57	0,43		
	TOTAL	11	16,82			
IB	TRATAM	2	6,65	3,32	1,26 <sup>NS</sup>	0,3481
	TIEMPO	1	27,87	27,87	10,60 <sup>S</sup>	0,0173
	TRAT*TIEMPO	2	10,23	5,12	1,95 <sup>NS</sup>	0,2232
	ERROR	6	15,77	2,63		
	TOTAL	11	60,52			

GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; MC: media de cuadrados; <sup>a</sup>: estadístico Fisher parcial; <sup>b</sup>: estadístico Fisher para la regresión completa. NS: no significativo; S: significativo al 5% de nivel de significación ( $\alpha \leq 0,05$ ).

b)

TRATAMIENTO	PARAMETRO
	L*
Sistema C	a
Sistema D	b
Sistema E	a

Los sistemas con la misma letra no presentaron diferencias significativas;  $\alpha:0,05$ .

Los cambios en el color de las rodajas de pera procesadas y control también pueden apreciarse en la **Figura 4.8.4**. Al final del almacenamiento, las rodajas de pera tratados solo por UV presentaron un mayor pardeamiento superficial con respecto al control, mientras que las tratadas por el método combinado casi no sufrieron cambio cuando se las compara con las muestras control. Otros autores también reportaron cambios en el color producidos por la aplicación de radiación UV-C, en dosis entre 4,5 y 11 kJ/m<sup>2</sup> durante el almacenamiento de rodajas de manzana tratadas con un equipo de idénticas características (Gómez y col., 2010). Erkan y col. (2001) observaron la aparición de pardeamiento en la superficie de rodajas de zapallitos expuestos a dosis UV-C entre 5 y 10 kJ/m<sup>2</sup>. Atribuyeron que el pardeamiento observado podría deberse a una acumulación de compuestos fenólicos inducidos por la radiación UV-C. Fonseca y Rushing (2006) reportaron que la aplicación de luz UV-C en dosis de 13,7 kJ/m<sup>2</sup> en sandías mínimamente procesadas, producían un efecto adverso en el color de la pulpa al inducir la decoloración del tejido.

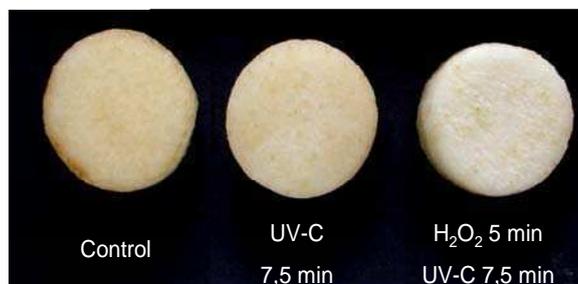
La evolución del color durante el almacenamiento de las rodajas de pera, control y tratadas puede ser apreciada en el diagrama de cromaticidad CIE x-y mostrado en la **Figura 4.8.5**, en donde se observa que la superficie de las peras tratadas se tornaron levemente más pardeadas que las muestras control pero que el corrimiento en el espacio de color fue leve.

**Figura 4.8.4** Cambio de color superficial de las rodajas de pera control y tratadas durante el almacenamiento. a) día 0, b) día 4, c) día 8.

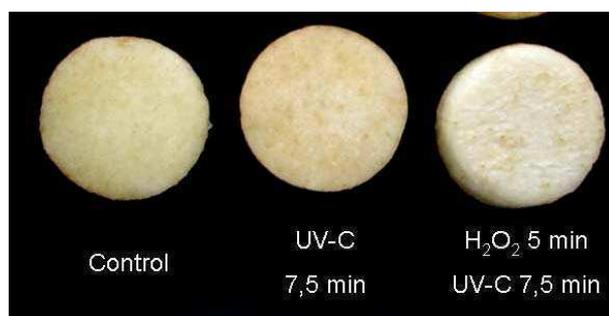
a)



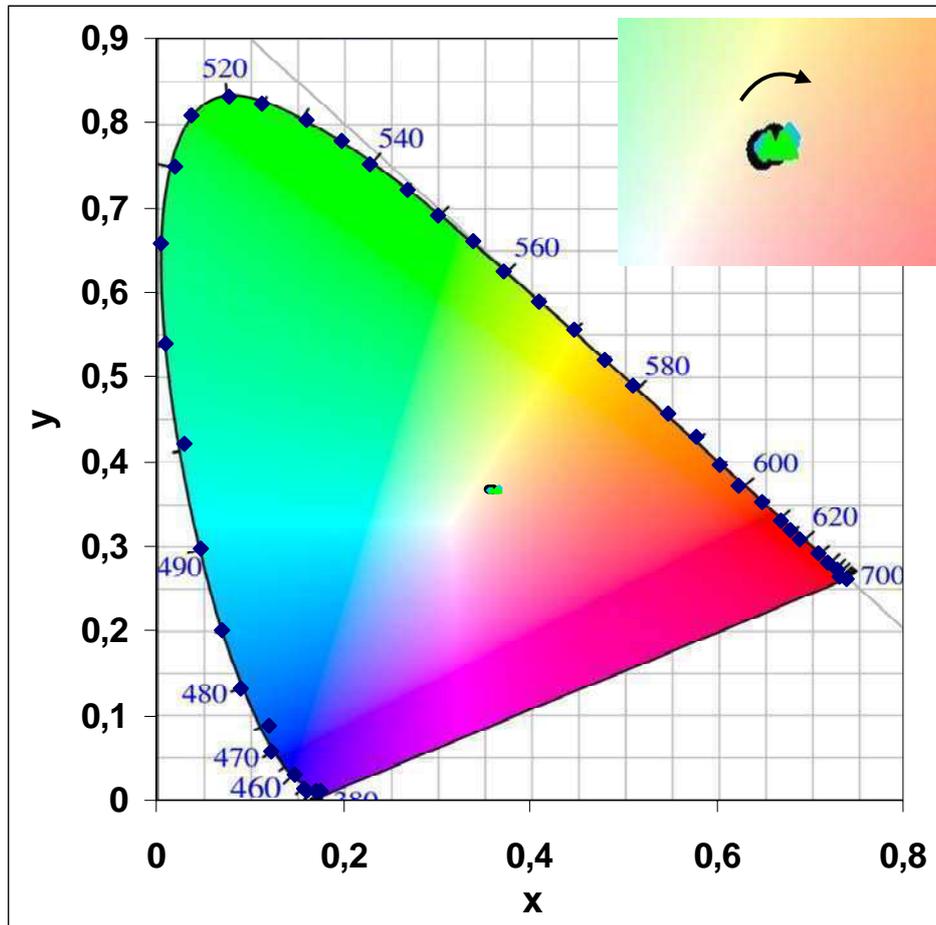
b)



c)



**Figura 4.8.5** Evolución del color en la superficie de rodajas de pera control y tratadas en el diagrama de cromaticidades CIE x-y. (●) Control, (●) UV-C, (●) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV-C.



#### 4.9- Análisis sensorial

Se evaluaron los cambios sensoriales que los tratamientos con UV y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> combinado con UV introdujeron en las rodajas de pera sin piel. Para ello se llevaron a cabo distintas pruebas sensoriales como se describió en **Materiales y Métodos, apartado 3.17.3**.

##### 4.9.1- Test de diferencia contra control

En esta prueba los panelistas (consumidores) analizaron la magnitud de la diferencia global entre las distintas muestras de pera sin piel como se detalla en **Materiales y Métodos, apartado 3.17.3.1**.

Los sistemas comparados frente al control reconocido como tal (rodaja de pera fresca), fueron:

- Control camuflado (**C**)
- Rodaja de pera irradiada con luz UV-C durante 7,5 min (3,7 kJ/m<sup>2</sup>) (**D**).
- Rodaja de pera tratada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pH 3,0 al 3% durante 5 min., luego irradiada con luz UV-C durante 7,5 min (3,7 kJ/m<sup>2</sup>) (**E**).

Con los resultados obtenidos a partir de la escala numérica y verbal de categorías (desde 1: “ninguna” diferencia hasta 5: “diferencia muy grande”), se calculó la diferencia media correspondiente de cada sistema respecto del control identificado como tal.

Los sistemas **C** y **D** obtuvieron puntuaciones media de 2,32 y 2,20 respectivamente, las cuales corresponden a la categoría próxima a “ligera diferencia”, lo cual permitiría afirmar que los panelistas no percibieron diferencias respecto del control cuando las muestras fueron irradiadas con luz UV-C durante 7,5 minutos. En cambio, en el caso del sistema **E**, se observó una mayor diferencia global, con una media de 2,88; perteneciente a una categoría cercana a “moderada diferencia”. Con el propósito de determinar si existen diferencias significativas entre los sistemas evaluados, se llevó a cabo un análisis de varianza

efectuando un test ANOVA de dos factores: sujeto y muestra; el cual se resume en la **Tabla 4.9.1**.

El mismo indicó que los juicios emitidos por los sujetos no fueron significativamente diferentes ( $F_{\text{sujeto}} < F_{\text{crítico sujetos}}$ ) a un nivel del 5%, por lo que si bien en este test se trabajó con un panel no entrenado, existió coherencia entre sus integrantes, los cuales evaluaron la muestra comportándose como un grupo.

El análisis de varianza también permitió determinar que se manifestaron diferencias significativas entre los sistemas evaluados en cuanto a la diferencia contra control ( $F_{\text{tratamientos}} > F_{\text{crítico muestras}}$ ). Con el propósito de determinar cuales de los tratamientos fueron significativamente diferentes, se procedió a realizar el test de comparaciones múltiples de Dunnett según la **ecuación 6.22** descrita en el **Apéndice Estadístico, apartado 6.6.2**. La diferencia crítica calculada ( $\Delta_{\text{Dunnett}}$ ) fue de 0,36 ( $\alpha:0,05$ ;  $\phi_{\text{error}}:118$ ;  $k:2$ ;  $n=60$ ). Las medias ( $\bar{y}_i$ ) que difirieron de la media del control camuflado **C** ( $\bar{y}_{\text{control}}$ ) excediendo dicho valor, se consideraron estadísticamente diferentes a 5% de significación. La diferencia calculada entre la media correspondiente al sistema **E** y el control ( $\Delta: 0,56$ ) excedió el valor crítico. Con lo cual la inmersión de las rodajas de pera en la solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  podría estar alterando en cierta medida la impresión global que se experimenta al probar la rodaja de pera.

Este estudio puso de manifiesto la importancia de la inclusión de un control camuflado para detectar el efecto placebo, particularmente cuando se trabaja con panelistas no entrenados y dada la variabilidad natural que se manifiesta entre las diferentes rodajas de pera que provienen de un lote de fruta.

Considerando los resultados obtenidos, se concluyó que la irradiación UV-C 7,5 min ( $3,7 \text{ kJ/m}^2$ ) no introdujo cambios sensoriales significativos en las rodajas de pera, mientras que las rodajas tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3%, pH 3,0, 5 min) + UV 7,5 min ( $3,7 \text{ kJ/m}^2$ ) presentaron cambios sensoriales respecto del sistema control que fueron percibidos como “ligeros”.

Posteriormente, se procedió a realizar un test hedónico para verificar si las rodajas de pera sometidas a los tratamientos propuestos tenían aceptación entre los consumidores.

**Tabla 4.9.1** Análisis de varianza para las posiciones asignadas por los participantes a las diferencias encontradas en las muestras de rodajas de pera procesados por UV-C y peróxido de hidrógeno en un test de diferencia contra control.

FUENTE	gl	SUME DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F	F <sub>crítico</sub>
SUJETO	59	78,13	1,32	1,34 <sup>NS</sup>	1,43
MUESTRAS	2	16,03	8,02	8,11 <sup>S</sup>	3,07
ERROR	118	116,63	0,99		
TOTAL	179	210,80			

<sup>S</sup> significativo al 95 % ( $\alpha$ : 0,05)

#### 4.9.2- Test de escala hedónica

Se realizó un test de escala hedónica con consumidores con el objeto de adquirir información sobre la aceptabilidad de gusto o disgusto de los sistemas **D** y **E**.

Cada categoría de la escala hedónica balanceada, utilizada en la evaluación de la aceptabilidad global, fue convertida a una puntuación entre 1 y 9, desde 1: “me disgusta extremadamente” a 9: “me gusta extremadamente”. Se realizó un análisis de varianza (**Tabla 4.9.2**) para ver si había diferencias significativas entre las muestras. Los resultados de la **Tabla 4.9.2** muestran que los participantes evaluaron las muestras comportándose como un grupo, dado que los juicios emitidos por los sujetos no fueron significativamente diferentes ( $F_{\text{sujeto}} < F_{\text{crítico sujetos}}$ ) a un nivel del 5%. Sí se encontraron diferencias significativas entre las muestras dado que  $F_{\text{tratamientos}}$  fue mayor que  $F_{\text{crítico muestras}}$ . La aceptabilidad global promedio, para los 51 jueces, de las rodajas tratadas según el tratamiento con luz UV-C por 7,5 min. (sistema **D**) fue de 6,9 puntos, correspondiente a la categoría “*me gusta moderadamente*”; y de las rodajas tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 5 minutos seguido de luz UV-C por 7,5 minutos (sistema **E**) fue de 6,4 puntos, correspondiente a la categoría “*me gusta algo*”. La **Figura 4.9.1** muestra la distribución de frecuencias de los puntajes asignados por los panelistas, donde se visualiza que para el sistema **E**, uno de los grupos mayoritarios adoptó la categoría 5 “*ni me gusta ni me disgusta*”, mientras que el otro grupo mayoritario escogió la categoría 8 “*me gusta mucho*”. Algunas observaciones al respecto sobre el sistema **E** que colocaron los consumidores fueron:

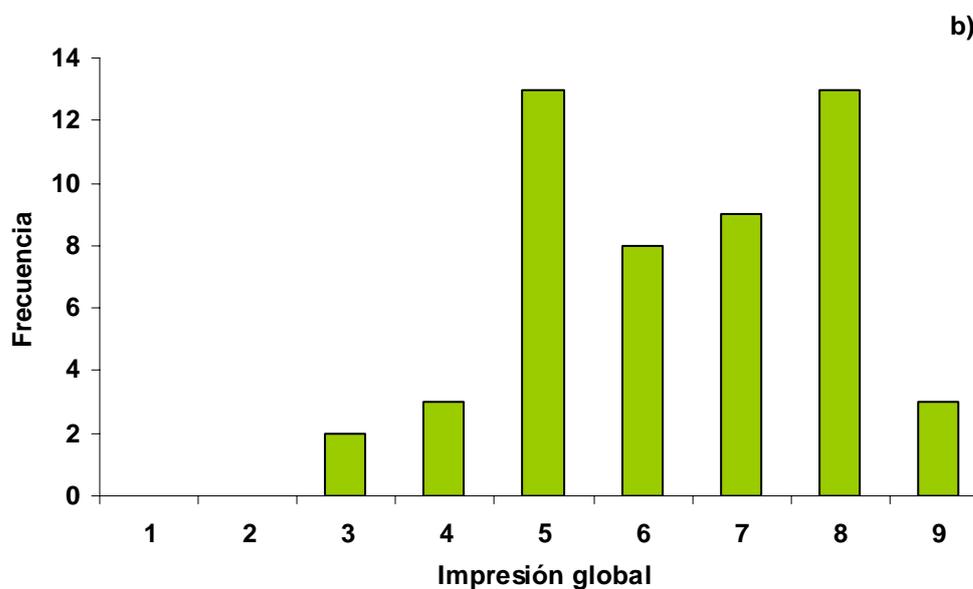
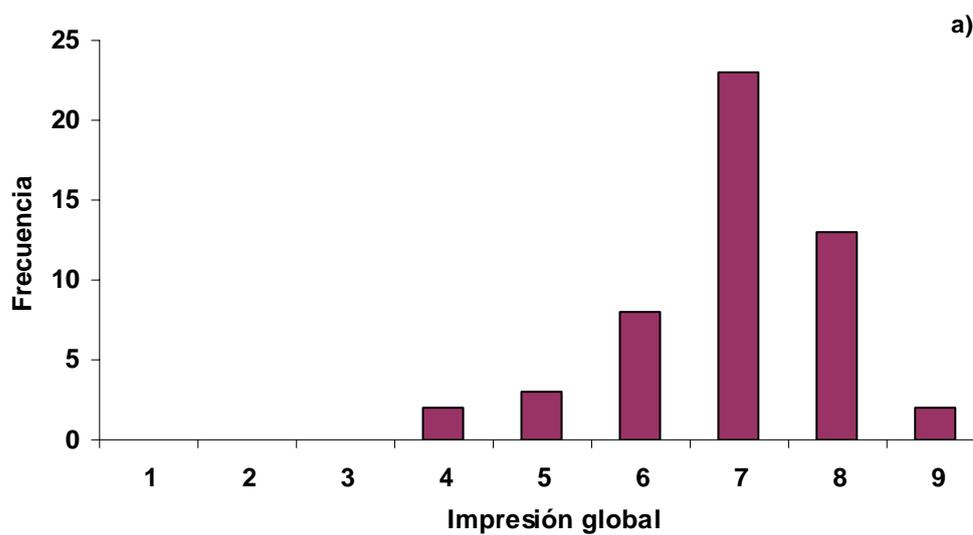
- “*No tiene mucho sabor a pera, sin embargo se siente firme y crujiente*”
- “*Me pareció con buena textura pero menos dulce y algo insípida*”
- “*Tiene un poco más de sabor*”
- “*Más blanda*”

**Tabla 4.9.2** Análisis de varianza para las categorías asignadas por los participantes a las diferencias encontradas en las muestras de rodajas de pera procesados por UV-C 7,5 min y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 min seguido de UV-C 7,5 min.

FUENTE	gl	SUME DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F	F <sub>crítico</sub>
SUJETO	50	94,49	1,89	1,07 <sup>NS</sup>	1,60
MUESTRAS	1	8,25	8,25	4,67 <sup>S</sup>	4,03
ERROR	50	88,25	1,77		
TOTAL	101	190,99			

<sup>S</sup> significativo al 95 % ( $\alpha$ : 0,05)

**Figura 4.9.1** Distribución de frecuencias de los puntajes asignados por los panelistas para la evaluación de impresión global de rodajas de pera sin piel procesadas por el tratamiento a) UV-C 7,5 min y b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 min seguido de UV-C 7,5 min.



#### 4.9.3- Análisis sensorial de textura

Para la evaluación sensorial de la textura, los distintos tratamientos fueron evaluados por un panel de jueces entrenados en textura, para poder discriminar posibles cambios en los diferentes atributos analizados. Los tratamientos evaluados fueron los siguientes:

- Rodajas de pera fresca (**C**)
- Rodajas de pera irradiadas con luz UV-C durante 7,5 minutos (sistema **D**)
- Rodajas de pera tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pH 3,0 al 3% durante 5 minutos y luego irradiadas con luz UV-C durante 7,5 minutos (sistema **E**)

Los atributos de textura analizados mediante el método de perfil de textura (IRAM 20013) fueron aquellos que se consideraron más relevantes en este tipo de muestras: dureza, fracturabilidad y jugosidad. Para ello se utilizó una escala con tres anclas para cada atributo de textura, como se detalla en **Materiales y Métodos, apartado 3.17.3.3**.

La **Tabla 4.9.3** muestra los resultados obtenidos. Para el atributo de dureza los jueces actuaron como grupo, y se encontraron diferencias significativas entre las muestras control y las que tuvieron el tratamiento combinado (sistema **E**). Se determinó que el sistema **C** fue el que obtuvo mayor grado de dureza y luego la muestra se vuelve ligeramente más blanda cuando más procesos se le aplican a la misma (**Figura 4.9.2**). Cuando se estudió el atributo fracturabilidad, los juicios resultaron más dispares. Esto puede deberse a la dificultad en la medición sensorial de este atributo, y a la variabilidad biológica que presentaban las muestras recibidas por los sujetos provenientes de peras distintas de un mismo lote.

**Tabla 4.9.3** Análisis de varianza para los puntajes asignados por los participantes a los diferentes atributos de textura. a) dureza, b) Mínima diferencia de Fisher para el atributo: dureza, c) fracturabilidad, d) jugosidad.

a)

FUENTE	gl	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F	$\alpha$
SUJETO	5	3,53	0,71	1,92 <sup>NS</sup>	0,1402
TRATAMIENTO	2	2,86	1,43	3,89 <sup>S</sup>	0,0394
SUJETO* TRATAMIENTO	10	4,26	0,49	1,32 <sup>NS</sup>	0,2900
ERROR	18	6,61	0,37		
TOTAL	35	17,85			

<sup>S</sup> significativo al 95 % ( $\alpha < 0,05$ )

<sup>NS</sup> significativo al 95 % ( $\alpha > 0,05$ )

b)

TRATAMIENTO	ATRIBUTO
	Dureza
Sistema C	a
Sistema D	ab
Sistema E	b

Los sistemas con la misma letra no presentaron diferencias significativas;  $\alpha: 0,05$ .

Tabla 4.9.3 (continuación)

c)

FUENTE	gl	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F	$\alpha$
SUJETO	5	83,93	16,79	29,22 <sup>S</sup>	<0,0001
TRATAMIENTO	2	3,34	1,67	2,90 <sup>NS</sup>	0,0808
SUJETO* TRATAMIENTO	10	23,29	2,33	4,06 <sup>S</sup>	0,0048
ERROR	18	10,34	0,57		
TOTAL	35	120,90			

<sup>S</sup> significativo al 95 % ( $\alpha < 0,05$ )<sup>NS</sup> significativo al 95 % ( $\alpha > 0,05$ )

d)

FUENTE	gl	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F	$\alpha$
SUJETO	5	10,69	2,14	1,77 <sup>NS</sup>	0,1703
TRATAMIENTO	2	1,14	0,57	0,47 <sup>NS</sup>	0,6325
SUJETO* TRATAMIENTO	10	4,35	0,44	0,36 <sup>NS</sup>	0,9487
ERROR	18	21,75	1,21		
TOTAL	35	37,93			

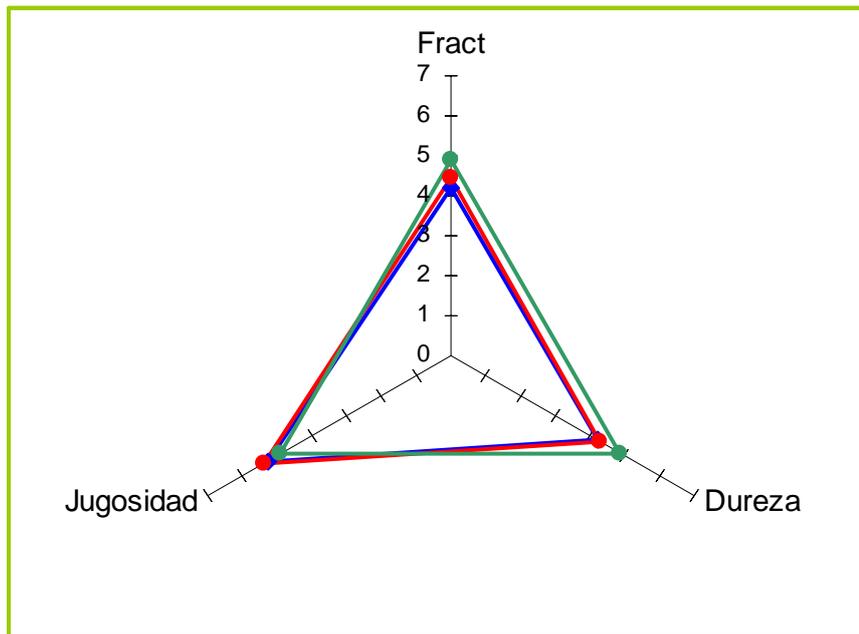
<sup>S</sup> significativo al 95 % ( $\alpha < 0,05$ )<sup>NS</sup> significativo al 95 % ( $\alpha > 0,05$ )

En cuanto al atributo jugosidad no se encontraron diferencias significativas entre los juicios de los participantes, así como tampoco entre los sistemas evaluados, hecho que corrobora que los tratamientos aplicados no afectan la jugosidad de las rodajas de pera.

La **Figura 4.9.2**, muestra el perfil de textura determinado para los sistemas analizados. Se observa una pequeña diferencia entre la dureza del sistema **C** y los sistemas **D** y **E**, mientras que todos los perfiles se superponen para los atributos fracturabilidad y jugosidad.

Se puede concluir entonces que, si bien la pera es una fruta delicada, los tratamientos aplicados, no afectaron notoriamente la calidad sensorial de las rodajas de pera, y podrían proponerse como un procesamiento de conservación de pera mínimamente procesada.

**Figura 4.9.2** Perfil sensorial de los atributos analizados para cada tratamiento evaluado; (●) rodaja de pera fresca (sistema **C**), (●) rodaja de pera irradiada con luz UV-C durante 7,5 min. (sistema **D**) y (●) rodaja de pera tratada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> , pH 3,0 al 3% durante 5 min., luego irradiada con luz UV-C durante 7,5 min. (sistema **E**).





# Conclusione

## S

## Conclusiones

Este estudio permitió aportar información cuantitativa relevante acerca de la influencia de una tecnología de preservación de fruta mínimamente procesada, combinada e innovadora, la cual involucra radiación ultravioleta y peróxido de hidrógeno, sobre el desarrollo de diversos microorganismos de importancia en alimentos. También proveyó valiosa información acerca de la implementación del tratamiento combinado en serie y simultáneo y sus consecuencias en la calidad microbiológica y organoléptica del producto. En particular se puede afirmar que:

- Se diseñó un equipo estanco sencillo, a escala laboratorio de irradiación UV-C para el tratamiento de muestras sólidas. El estudio de la intensidad de luz emitida en cada sector del estante permitió optimizar el funcionamiento del equipo.
- La puesta a punto y utilización de una técnica actinométrica sencilla de medida de la dosis recibida por el sistema irradiado proveyó valiosa información, la cual fue verificada mediante la utilización de un instrumento de medida (radiómetro). El par actinométrico  $I^-/IO_3^-$  fue eficiente a tiempos cortos de tratamiento (inferiores a 5 minutos) aunque presentó saturación en la formación de moles de  $IO_3^-$  a tiempos mayores, obligando a utilizar un método de extrapolación.
- En este estudio se demostró que la efectividad de la radiación ultravioleta utilizada como método decontaminante de frutas depende de manera significativa de las características de la superficie de la matriz irradiada. Este hecho debe ser tenido en cuenta en el diseño de procesos de decontaminación superficial. La matriz (pera ó manzana; con /sin piel) que se expuso a irradiación UV-C, influyó en la inactivación microbiana observada. La presencia de piel en el tejido vegetal también influyó en la efectividad del tratamiento. Dado que este tratamiento es netamente de carácter superficial, la porosidad del tejido vegetal debe tenerse en cuenta ya que puede modificar su acción, teniendo en algunos casos, un efecto protector.

- El patrón de inactivación microbiana observado en todos los sistemas tratados por irradiación con luz UV-C correspondió a curvas algo quebradas con concavidad hacia arriba; sin presencia de hombro y con cola definida. Este tipo de curvas de inactivación, más relacionado a la aplicación de tecnologías noveles obligó a la utilización de un modelo matemático que permitiera una mejor comprensión y cuantificación del modo de acción de la luz UV-C.
- Se observó la presencia de un quiebre en la curva de inactivación de distintos microorganismos en función del tiempo de exposición a la luz UV-C (aproximadamente 7,5 minutos; 3,7 kJ/m<sup>2</sup>) a partir del cual no hubo una inactivación adicional significativa ( $\approx 2$  ciclos log), dejando una fracción sobreviviente. Este hecho ratificó la necesidad de combinar la aplicación de esta tecnología con otras tradicionales o emergentes con el propósito de obtener mayor reducción en la población microbiana y además optimizar la aplicación de la irradiación UV-C evitando el sobretratamiento.
- La irradiación UV-C aplicada en rodajas de pera sin piel que contenían inóculos simples fue más efectiva en inactivar a *L. innocua* ATCC 33090 y *L. monocytogenes* ATCC 19114D, resultando más resistentes *E. coli* ATCC 11229 y *Z. bailii* NRRL 7256. En cambio, en pera con piel resultó más resistente *L. monocytogenes*. Se alcanzó una reducción promedio de la población microbiana de entre 1,8 y 3,4 ciclos log. Cuando se utilizaron poblaciones microbianas mixtas (pooles), *L. innocua* resultó más sensible que su pool en pera con ó sin piel, en cambio en el caso de *L. monocytogenes* dependió de la presencia de piel en la fruta. Escasas diferencias se observaron en la inactivación por luz UV-C de *Z. bailii* y su pool en ambos tipos de matrices.
- La aplicación del modelo matemático de distribuciones de frecuencias de resistencias tipo Weibull, resultó muy útil para explicar de forma más completa la inactivación de los microorganismos estudiados en los distintos sistemas evaluados, brindando información complementaria para la

selección de las combinaciones más efectivas y seguras desde el punto de vista microbiológico. Este modelo caracterizó la inactivación de los distintos microorganismos estudiados por luz UV-C con distribuciones de frecuencias de resistencias que indicaron que la mayor parte de la población microbiana moría a dosis bajas pero dejaba, según la especie considerada y el medio de tratamiento, una fracción de la población resistente al tratamiento.

- La técnica de citometría de flujo reveló que la radiación ultravioleta a determinadas dosis, además de causar daños al ADN, desestabiliza la integridad de la membrana, llegando a causar la muerte celular. También se vió que el mecanismo de inactivación por luz UV-C difirió de un microorganismo a otro. *S. cerevisiae* KE162 fue el microorganismo más sensible no obteniéndose recuento de colonias luego de 2 minutos de tratamiento, mientras que con *E. coli* ATCC 11229 no se obtuvo recuento luego de 8 minutos de tratamiento. *L. innocua* ATCC 33090 fue el microorganismo más resistente, donde se observó una subpoblación viable pero no cultivable. Mediante microscopía electrónica de transmisión se determinó un desorden citoplasmático de las células tratadas tanto con luz UV-C como con peróxido de hidrógeno.
- La aplicación de peróxido de hidrógeno (3%, pH 3,0) en rodajas de pera sin piel mostró ser efectiva en algunos microorganismos estudiados. Se obtuvo una reducción de 1,4 y 2,5 ciclos log en *L. innocua* y *E. coli*, respectivamente. En el caso de *Z. bailii*, la inactivación observada fue muy escasa (0,25 ciclos log).
- La efectividad de los tratamientos combinados ( $H_2O_2$ /UV-C) en la inactivación microbiana, dependió del arreglo experimental en que la irradiación UV-C y la inmersión en peróxido de hidrógeno fueron aplicados (serie ó simultáneo) y también del microorganismo en cuestión. Se consiguió una mayor inactivación cuando los tratamientos se aplicaron en serie y especialmente en *E. coli* (3,7 ciclos log). En el caso de *Z. bailii* se obtuvo una inactivación aditiva (2,7 ciclos log). En el caso de *L. innocua*, si

bien la inactivación fue mayor que aplicando cada tratamiento por separado, no llegó a ser aditiva, obteniéndose una reducción de 2,4 ciclos log.

- El tratamiento combinado en serie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%, pH 3,0, 5 min)/UV-C (3,7 kJ/m<sup>2</sup>) redujo la población microbiana inoculada en rodajas de pera sin piel, sin recuperación posterior de los microorganismos. Este tratamiento también fue efectivo en reducir la flora nativa de las rodajas de pera durante 8 días. No ocurrió así con el tratamiento simple de irradiación con luz UV-C (7,5 min; 3,7 kJ/m<sup>2</sup>), el cuál si bien redujo la flora nativa, ésta fue aumentando a lo largo del almacenamiento refrigerado, resultando así poco satisfactorio.
- En cuanto al color de las rodajas de pera, cuando se aplicó irradiación UV-C (7,5 min; 3,7 kJ/m<sup>2</sup>), se vio que la luminosidad (L\*) fue disminuyendo a lo largo del almacenamiento, mientras que cuando se les aplicó el tratamiento combinado en serie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%, pH 3,0, 5 min)/UV-C (3,7 kJ/m<sup>2</sup>) la luminosidad aumentó, pero fue decayendo durante el almacenamiento. Sin embargo, el corrimiento en el espacio de color fue mínimo, es decir, las rodajas de pera sufrieron una leve pérdida de luminosidad durante los 8 días de almacenamiento, permitiendo afirmar que este tratamiento (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV) fue efectivo en preservar pera en rodajas sin piel almacenada por una semana en refrigeración.
- Las rodajas de pera sin piel tratadas con irradiación UV-C (7,5 min; 3,7 kJ/m<sup>2</sup>) no fueron percibidas por los consumidores como diferentes del control (rodajas de pera sin tratamiento). Sí se encontraron diferencias significativas entre las rodajas procesadas con el tratamiento combinado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%, pH 3,0, 5 min)/UV-C (3,7 kJ/m<sup>2</sup>) y las rodajas de pera sin tratamiento. Según un test hedónico realizado con consumidores el cambio resultó satisfactorio. Los cambios en la textura analizados por jueces entrenados, fueron leves, solo hubo diferencias significativas en el atributo de la dureza mientras que la fracturabilidad y jugosidad de las rodajas de

peras procesadas por el método combinado no se alteraron respecto de las rodajas sin tratamiento alguno.

- Los resultados satisfactorios obtenidos en los estudios microbiológicos; de color y pruebas sensoriales, permitieron afirmar que los cambios organolépticos introducidos en las rodajas de pera procesadas por el tratamiento combinado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%, pH 3,0, 5 min)/UV-C (3,7 kJ/m<sup>2</sup>) fueron leves durante el tiempo de vida útil propuesto, y que el mismo puede considerarse un producto innovador.



# **Apéndice Estadístico**

## 6.1- Conceptos estadísticos generales

### 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

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

Donde:

exp = función exponencial con base e

Y= medición realizada

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

$\sigma$  = desviación estándar

$\sigma^2$  = 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

proporciona 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 ( $\sigma$ ) 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 ( $\sigma^2$ ): 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 aquel 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:

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

$$\text{entonces } \Leftrightarrow \quad gl = Na + Nb - 2$$

donde

Na = número de medidas en el grupo a

Nb = 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  $\alpha$ ) o de aceptar la hipótesis nula cuando la última no es cierta (cometiendo el error tipo II o  $\beta$ ). En la toma de 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, en cambio, al ser superior el número de la tabla la hipótesis nula se tiene que aceptar para dado nivel de significación. Cuanto mayor sea el valor

experimental, más significativo será el resultado y más fuerte será la evidencia de que el resultado no se debe a una mera coincidencia. El nivel de significación es comúnmente representado por el símbolo griego  $\alpha$  (alpha). Cuando se hacen este tipo de comparaciones es importante tener en cuenta si el ensayo es unilateral o bilateral. Por ejemplo si el ensayo es unilateral y se trabaja en un nivel de significación  $\alpha = 0,05$  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  $P \leq 0,95$  y no al tabulado para  $P \geq 0,99$  se indica con (\*); si el valor experimental es mayor que el tabulado para  $P \geq 0,99$  la conclusión es (\*\*) y para  $P \geq 0,999$  (\*\*\*). Cuando:

$VE < VT$	(NS)/(-)
$VE > VT$ (P 0,95)	*
$VE > VT$ (P 0,99)	**
$VE > VT$ (P 0,999)	***

Siendo VE= valor experimental; VT= valor tabulado

Generalmente, en el caso de los alimentos los niveles (\*) y (\*\*) se consideran suficientes.

## 6.2 - Análisis de varianza (ANOVA)

Análisis de varianza (ANOVA) 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  $i$ .

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

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 las variables independientes del experimento. Esta suma de cuadrados tiene asociados  $p-1$  grados de libertad.

Dividiendo la SSR por  $p-1$  obtenemos la Media de Cuadrados debida a la Regresión (MSR):

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

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 comúnmente se realiza para verificar la significancia de la regresión es el test F. Si el valor calculado de  $F > F_{tablas}$  nos permite inferir que la variación de la información explicada por el modelo o relación propuestos es significativamente mayor que la variación debida a causas no identificables (residuales) y que el efecto observado no se debió al azar. Es de destacar que el 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:

$$F = t^2 \tag{6.15}$$

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.

$$H_0 = \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_k = 0$$

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

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

Si la hipótesis nula es verdad ( $\beta_j = 0$ ), el valor del estadístico F sigue una distribución con  $(p-1)$  y  $(N-p)$  grados de libertad en el numerador y denominador de la expresión respectivamente:

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

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  $\alpha$  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- Test F parcial

Si existen varios parámetros en el modelo de regresión, dicho modelo puede idearse como la incorporación sucesiva de a un término por vez. Se puede conocer la suma de cuadrados que mide la contribución del término  $\beta$  a la suma de cuadrados de la regresión completa considerando que el mismo es el último término incorporado al modelo. Es decir, todos los parámetros excepto  $\beta$  están en el modelo. Por lo tanto, se mide el valor de adicionarlo al modelo, el cual originalmente no lo incluía. En esta situación la suma de cuadrados debida a  $\beta$  coincide con la suma de cuadrados media debida a  $\beta$  ya que se tiene un grado de

libertad ( $gl = 1$ ). Esta media puede compararse al estimador de la varianza del modelo ( $s^2$ ) mediante el estadístico F (Khuri y Cornell, 1987).

Este test se realiza para cada término del modelo y es muy adecuado para adicionar o remover términos y así seleccionar la mejor ecuación de regresión. Su hipótesis nula establece:

$$H_0 : \beta = 0$$

versus la hipótesis alternativa:

$$H_a : \beta \neq 0$$

### 6.3- Coeficiente de determinación ( $R^2$ )

El coeficiente de determinación nos informa sobre la proporción de la variación que existe entre los valores experimentales y lo propuesto por el modelo. Es un estadístico que evalúa cuán bien se ajusta el modelo estadístico aplicado. En la regresión, en particular, el coeficiente de determinación es una medida de cuánto la línea de regresión se aproxima a los datos experimentales. Su expresión porcentual se da por la fórmula:

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

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 acerquen lo más posible al 100 ya que es una medida del ajuste del modelo. Cabe añadir que por mucho que se acerque el coeficiente de determinación al cien nunca lo será, ya que en este caso se trabajaría sin error.

### 6.4- Análisis de residuales

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

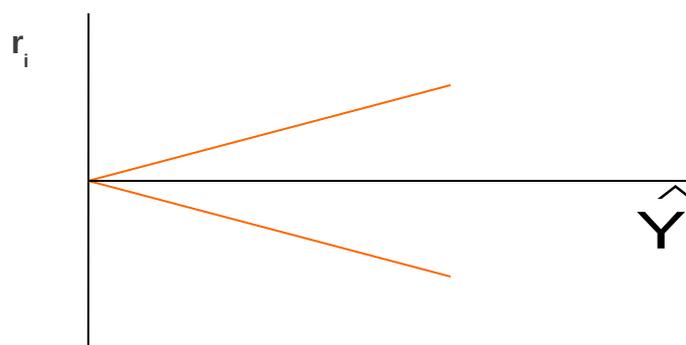
- son normalmente distribuidos con media igual a cero
- tienen varianza constante
- son independientes entre ellos

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

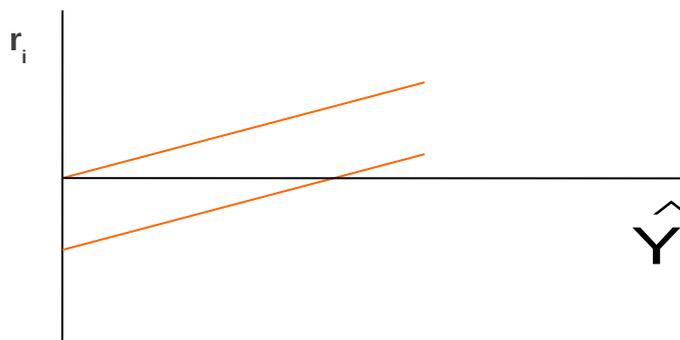
#### 6.4.1- Versus valores predichos, $\hat{Y}_i$

Se grafican los valores de los residuales ( $r_i$ ) versus los valores predichos por el modelo. Dichos residuales no se grafican en función de los valores observados ( $Y_i$ ) debido a que ambos grupos de valores están correlacionados. Debe observarse una distribución uniforme horizontal de los residuales en torno a los valores predichos,  $\hat{Y}_i$  (homocedasticidad). Pueden manifestarse algunos comportamientos anormales tales como los que se describen a continuación.

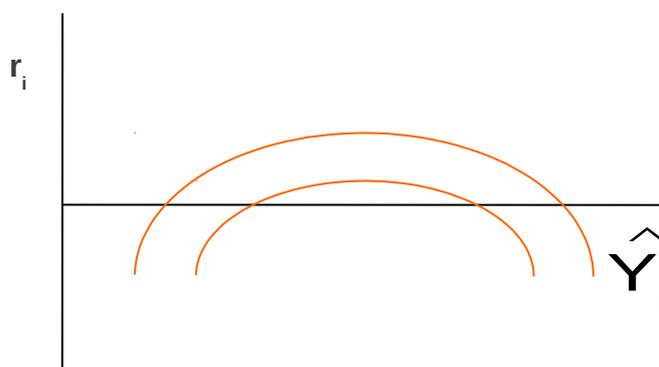
- Si la varianza del modelo no es constante y se incrementa, es necesario realizar un análisis de cuadrados mínimos especial o bien una transformación ( $\ln(Y)$ ;  $\sqrt{Y}$ ;  $1/Y$ ; etc.) en la respuesta de interés:



- Si el término independiente  $\beta_0$  no fue incluido en el análisis, la banda se desplaza:



- Si falta incluir algunos términos lineales y/o cuadráticos en el modelo postulado la banda se curva:



Estas desviaciones, además de detectarse visualmente, pueden medirse mediante parámetros definidos, los cuales no se detallarán en este apéndice (Draper, 1963).

### 6.5- Modelo lineal generalizado

Los Modelos Lineales Generalizados (MLG) son una generalización de los Modelos Lineales. En su caso más simple, el modelo lineal especifica una relación entre la variable respuesta  $Y$  (la cual sigue una distribución normal) y un conjunto de variables predictoras,  $X_k$ :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_k X_k \quad (6.19)$$

Los términos  $\beta_i$  corresponden a los coeficientes de la regresión calculados a partir de los datos. Para gran número de problemas de análisis de datos, las estimaciones a partir de relaciones lineales pueden ser adecuadas para describir los datos y para realizar predicciones razonables.

Pero existen muchas relaciones que no pueden ser resumidas por una simple ecuación lineal principalmente por dos razones:

- La distribución de la variable dependiente: la variable de interés puede no tener una distribución continua, por ejemplo si estudiamos la elección de un comprador entre tres productos (dist. multinomial).
- El efecto de las variables predictoras sobre la variable dependiente puede ser de naturaleza no lineal: por ejemplo, la relación entre el color de un dado sistema y diversos factores de un proceso de preservación de un alimento puede ser no lineal.

Seguramente, alguna clase de función cuadrática o de otro orden sería adecuada para describir esta relación, de manera que un incremento en una variable predictora represente un mayor impacto en la evolución del color del sistema. En otras palabras, el enlace entre las variables independientes y el color se podría describir a partir de una relación no lineal.

Los MLG introducen una función enlace o link:  $G(\bullet)$  donde:

$$Y = G(\beta_i X_k) + \varepsilon \quad (6.20)$$

Por tanto, son una extensión del modelo lineal tradicional siendo más flexibles que este último ya que permiten una dependencia no lineal de  $Y$  con la proyección lineal  $\beta_i X_k$  de las variables predictoras, pero no permite una influencia no lineal individual con las variables  $X_1 \dots X_k$ .

Entre otras ventajas, permiten modelar variables categóricas (sí/no; 0/1; nombre; etc) y variables continuas tradicionales (tiempo, temperatura, concentración, etc.).

Asimismo, es posible analizar estadísticamente relaciones no lineales entre variables dependientes e independientes. Por otro lado, no es necesario el

supuesto de varianza constante. Los MLG asumen que la varianza de Y es función de su valor esperado, exigiendo sólo que sea conocido el modo en que la varianza depende de aquel.

## 6.6- Métodos por comparaciones múltiples

Un análisis de varianza solo informa si existen diferencias entre medias pero no informa acerca de cuales medias son las que difieren. Una vez que el ANOVA ha demostrado, mediante el test F, que existen diferencias significativas se recurre a los test de comparaciones múltiples (Zar, 1999).

Cuando se desean hacer comparaciones entre las medias desarrolladas en un experimento que involucra más de dos muestras se origina un problema porque se alteran las probabilidades. A medida que aumenta el número de medias, aumenta la probabilidad que la diferencia entre las medias mayor y menor sea igualada o excedida solamente por el azar.

Hay varias maneras de enfrentar esta situación incluyendo la de despreciar este efecto y simplemente realizar el test t (Student) entre cualquiera de dos medias que se comparan. Pero esto no es muy recomendable si bien es lo más rápido.

Todos los procedimientos de comparaciones múltiples se basan en calcular un rango el cual es comparado con la diferencia entre medias. Si el rango es mayor, no existe diferencia significativa entre las medias.

La diferencia entre los mismos reside en como calcular el rango crítico y de ello resultan procedimientos más o menos conservativos y poderosos, según determinen rangos críticos más o menos estrechos. Algunos de ellos se enumeran aquí, de más a menos conservadores (O'Mahony, 1986):

- Test Sheffé
- Test Tukey (HSD)
- Test Newman-Keuls
- Test de rango múltiple de Duncan
- Test Fisher (MDS)
- Test de Dunnett

Se describirán los test que se utilizaron en esta tesis.

### 6.6.1- Mínima diferencia significativa de Fisher (MDS)

Es un test muy potente ya que de todos los test de comparaciones múltiples es el que determina el rango más estrecho de valores, hecho que facilita encontrar diferentes a dos medias, resultando ser uno de los test menos conservativo. Debe utilizarse para comparar pocas medias ya que como es realmente un test t-Student modificado existe el riesgo de cometer error tipo I. Antes de ser aplicado debe verificarse que existan diferencias significativas entre medias mediante test F de un ANOVA.

Se calcula:

$$MDS = t_{\alpha/2, gE} \cdot \sqrt{\frac{2MSE}{n}} \quad (6.21)$$

donde:

$t_{\alpha/2, gE}$  = mayor  $\alpha/2$  por ciento de puntos que siguen la distribución t-Student con gE grados de libertad.

gE = grados de libertad del residual obtenido en ANOVA.

n = número de medidas.

Cualquier par de medias cuya diferencia exceda a dicho valor para  $\alpha$ -nivel de significación es considerado estadísticamente diferente.

### 6.6.2- Test de Dunnett

El test de Dunnett se aplica al caso especial donde uno de los tratamientos es un control y se desea saber cual de las muestras difiere significativamente respecto del control.

Se desea comparar las medias de varios grupos de tratamientos con la media de un grupo control.

Define un estadístico  $d = d(\alpha; \Phi_{\text{error}}; k-1)$

$$\Delta_{\text{Dunnett}} = d(\alpha, \Phi_{\text{error}}) \cdot S_{\text{error}} \cdot (2/n)^{1/2} \quad (6.22)$$

La **Tabla 6.3** muestra los valores de d para  $\alpha$  nivel de significación,  $\nu$  grados de libertad del error ( $\phi_{\text{error}}$ ) y k tratamientos, siendo  $s = \sqrt{\text{MSE}}$  y  $n =$  número de comparaciones.

$$H_0: \tilde{y}_i = \tilde{y}_{\text{control}} \quad \text{para } i \neq \text{control}$$

$$H_1: \tilde{y}_i \neq \tilde{y}_{\text{control}}$$

Si  $|\tilde{y}_i - \tilde{y}_{\text{control}}| \geq \Delta_{\text{Dunnett}} \rightarrow$  las medias difieren al nivel de significación  $\alpha$

**Tabla 6.3** Valores críticos del test de Dunnett

$\alpha = 0,10$											
$\frac{K}{f}$	1	2	3	4	5	6	8	10	12	15	20
3	2,35	2,91	3,23	3,45	3,62	3,76	3,96	4,12	4,24	4,39	4,58
4	2,13	2,60	2,86	3,05	3,19	3,30	3,47	3,60	3,70	3,82	3,98
5	2,02	2,43	2,67	2,83	2,96	3,06	3,21	3,32	3,42	3,52	3,66
6	1,94	2,33	2,55	2,70	2,82	2,91	3,05	3,15	3,24	3,34	3,47
7	1,90	2,26	2,47	2,61	2,72	2,81	2,94	3,04	3,12	3,22	3,34
8	1,86	2,22	2,41	2,55	2,65	2,73	2,86	2,96	3,03	3,12	3,24
9	1,83	2,18	2,37	2,50	2,60	2,68	2,80	2,89	2,97	3,06	3,17
10	1,81	2,15	2,34	2,46	2,56	2,64	2,76	2,84	2,92	3,00	3,11
11	1,80	2,13	2,31	2,43	2,53	2,60	2,72	2,81	2,88	2,95	3,06
12	1,78	2,11	2,29	2,41	2,50	2,57	2,69	2,77	2,84	2,92	3,03
15	1,75	2,07	2,24	2,36	2,44	2,51	2,62	2,70	2,77	2,85	2,95
20	1,73	2,03	2,19	2,30	2,39	2,46	2,56	2,64	2,70	2,77	2,87
25	1,71	2,00	2,17	2,27	2,36	2,42	2,52	2,60	2,66	2,73	2,82
30	1,70	1,99	2,15	2,25	2,34	2,40	2,50	2,57	2,63	2,70	2,79
40	1,68	1,97	2,12	2,23	2,31	2,37	2,47	2,54	2,60	2,67	2,75
60	1,67	1,95	2,10	2,21	2,28	2,34	2,44	2,51	2,57	2,63	2,72
$\infty$	1,65	1,91	2,06	2,16	2,23	2,29	2,38	2,45	2,51	2,58	2,67

$\alpha = 0,05$											
$\frac{K}{f}$	1	2	3	4	5	6	8	10	12	15	20
3	3,18	3,87	4,26	4,54	4,75	4,92	5,18	5,37	5,53	5,72	5,95
4	2,78	3,31	3,62	3,83	4,00	4,13	4,33	4,48	4,61	4,75	4,94
5	2,57	3,03	3,29	3,48	3,62	3,73	3,90	4,03	4,14	4,26	4,42
6	2,45	2,86	3,10	3,26	3,39	3,49	3,64	3,76	3,86	3,97	4,11
7	2,36	2,75	2,97	3,12	3,24	3,33	3,47	3,58	3,67	3,78	3,91
8	2,31	2,67	2,88	3,02	3,13	3,22	3,35	3,46	3,54	3,64	3,76
9	2,26	2,61	2,81	2,95	3,05	3,14	3,26	3,36	3,44	3,53	3,65
10	2,23	2,57	2,76	2,89	2,99	3,07	3,19	3,29	3,36	3,45	3,57
11	2,20	2,53	2,72	2,84	2,94	3,02	3,14	3,23	3,30	3,39	3,50
12	2,18	2,50	2,68	2,81	2,90	2,98	3,09	3,18	3,25	3,34	3,45
15	2,13	2,44	2,61	2,73	2,82	2,89	3,00	3,08	3,15	3,23	3,33
20	2,09	2,38	2,54	2,65	2,73	2,80	2,90	2,98	3,05	3,12	3,22
25	2,06	2,34	2,50	2,61	2,69	2,75	2,85	2,93	2,99	3,06	3,15
30	2,04	2,32	2,47	2,58	2,66	2,72	2,82	2,89	2,95	3,02	3,11
40	2,02	2,29	2,44	2,54	2,62	2,68	2,77	2,85	2,90	2,97	3,06
60	2,00	2,27	2,41	2,51	2,58	2,64	2,73	2,80	2,86	2,92	3,00
$\infty$	1,96	2,21	2,35	2,44	2,51	2,57	2,65	2,72	2,77	2,83	2,91



# **Bibliografía**

## 7- Bibliografía

**Abadias, M.; Usall, J.; Anguera, M.; Solsona, C. y Viñas, I.** (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123: 121–129.

**Adams, M. y Moss, M.** (1995). *Food Microbiology*; The Royal Society of Chemistry: U.K.

**Aguayo, E.; Escalona, V. y Artés, F.** (2001). Industrialización del melón procesado fresco. *Horticultura*, 155: 48-60.

**Alzamora, S.** (1997). Preservación I. Alimentos conservados por factores combinados". En *Temas en Tecnología de Alimentos*. Ed. J.M. Aguilera p. 45-88. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

**Alzamora, S.; Tapia, M. y López-Malo, A.** (2000). Overview. En *Minimally Processed Fruits and Vegetables: Fundamental Aspects and Applications*. Eds. S.M. Alzamora, M.S. Tapia y A. López-Malo. Aspen Publishers Inc., Maryland, USA.

**Alzamora, S.; Gerschenson, L.; Cerrutti, P. y Rojas, A.** (1989). Shelf-stable pineapples for long-term non refrigerated storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 22: 233-236.

**Alzamora, S.; 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. Welte-Chanes p. 463-492. Technomic Publication, Pennsylvania, USA.

**Ananta, E. y Knorr, D.** (2009). Comparison of inactivation pathways of thermal or high pressure inactivated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 by flow cytometry analysis. *Food Microbiology*, 26: 542-546.

**Anellis, A. y Werkowski, S.** (1968). Estimation of radiation resistance values of microorganisms in food products. *Applied Microbiology*, 16: 1300–1308.

**Aronsson, K.; Ronner U. y Borch, E.** (2005). Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to membrane permeabilization and subsequent leakage of intracellular compounds due to pulsed electric field processing, *International Journal of Food Microbiology*, 99: 19-32.

**ASTM** (1968). Manual of sensory testing methods. ASTM Special Technical Publication p 434, USA.

**Baldry, M.** (1983). The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *Journal of Applied Bacteriology*, 54: 417–423.

**Baranyi, J. y Roberts, T.** (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23: 277-294.

**Barnett, B.; Schwartze, M.; Sweat, D.; Lea, S.; Taylor, J.; Lierce, G. y Hendricks, K.** (1995). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7, Waco, Texas. Epidemic. Intelligence Service 44<sup>th</sup> Annual Conference, CDC, Atlanta, GA.

**Barroca, M.; Guiné, R.; Pinto, A.; Gonçalves, F. y Ferreira, D.** (2006). Chemical and microbiological characterization of portuguese varieties of pears. *Institution of Chemical Engineers*, 84: 109-113.

**Bayliak, M.; Semchyshyn, H. y Lushchak, V.** (2006). Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzyme activities in *Saccharomyces cerevisiae* is strain specific. *Biochemistry*, 71: 1013-1020.

**Beuchat, L.** (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*, 4: 413–423.

**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.

**Block, S.** (2000). *Disinfection, sterilization and preservation*, 5<sup>th</sup>, New York, USA: Lippincott, Williams and Wilkins.

**Block, S.** (2001). Peroxygen compounds. En *Disinfection, sterilization and preservation*. Eds Lippincoytt Williams and Wilkins, Philadelphia, USA.

**Bolton, J.** (2001). *Ultraviolet application handbook*. Ed. J.R. Bolton Photosciences, Inc; Ayr, Ontario, Canada.

**Bolton, J.** (2003). Standardization of methods for fluence (UV dose) determination in bench-scale UV experiments. *Journal of Environmental Engineering*, 129: 209-215.

**Brackett, R.** (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.

**Brackett, R.** (1999). Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens on produce. *Postharvest Biology and Technology*, 15: 305-311.

**Brandt, M.; Skinner, L. y Coleman, J.** (1963). Texture profile method. *Journal of Food Science*, 28: 404–409.

**Buchanan, R.** (1995). The roles of microbiological criteria and risk assessment in HACCP. *Food Microbiology*, 12: 421-424.

**Buchanan, R. y Phillips, J.** (1990). Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 35: 370-376.

**Buchanan, R. y Whiting, R.** (1996). Risk assessment and predictive microbiology. *Journal of Food Protection*, 59: 31-36.

**Bunthof, C.; Bloemen, K.; Breeuwer, P.; Rombouts, F. y Abee, T.** (2001). Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2326-2335.

**Busch, S. y Donnelly, C.** (1992). Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 14-20.

**Cartier, R.; Rytz, A.; Lecomte, A.; Pobrete, F.; Krystlik, J.; Belin, E. y Martin, N.** (2006). Sorting procedure as an alternative to quantitative descriptive analysis to obtain a product sensory map. *Food Quality and Preference*, 17: 562-571.

**Chang, J.; Ossoff, S.; Lobe, D.; Dorfman, M.; Dumais, C.; Qualls, R. y Johnson, J.** (1985). UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 49: 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.

**Char, C.; Mytilinaki, E.; Guerrero, S. y Alzamora, S.** (2008). Inactivation of *E. coli* and *S. cerevisiae* in fruit juices processed by non-thermal emerging technologies. International Conference of Agricultural Engineering (4th CIGR Section VI International Symposium On Food And Bioprocess Technology), Foz do Iguazu, Brasil.

**Char, C., Guerrero, S. y Alzadora, S.** (2009). Survival of *Listeria innocua* in thermally processed orange juice as affected by vanillin addition. *Food Control*, 20: 67-74.

**Chen, J.; Wang, Z.; Wu, J.; Wang, Q. y Hu, X.** (2007). Chemical compositional characterization of eight pear cultivars grown in China. *Food Chemistry*, 104: 268-275.

**Civille, G. y Szczesniak, A.** (1973). Guidelines to training a texture profile panel. *Journal of Texture Studies*, 4: 204–223.

**Clark, S.; Warner, H.; Rodríguez, J.; Olivas, G.; Sepúlveda, D.; Bruins, R. y Barbosa-Cánovas, G.** (2002). Residual gas and storage conditions affect sensory quality of diced pears in flexible retortable pouches. *Food Quality and Preference*, 13: 153-162.

**Corte, F.; de Fabricio, S.; Salvatori, D. y Alzamora, S.** (2004). Survival of *L. innocua* in apple juice as affected by vanillin or potassium sorbate. *Journal of Food Safety*, 24: 1-15.

**Costell, E.** (2002). A comparison of sensory methods in quality control. *Food Quality and Preference*, 13: 341-353.

**Crowe, K.; Bushway, A.; Bushway, R.; Davis-Dentici, K. y Hazen, R.** (2007). A comparison of single oxidants versus advanced oxidation processes as chlorine-alternatives for wild blueberry processing (*Vaccinium angustifolium*). *International Journal of Food Microbiology*, 116: 25-31.

**Deliza, R.; Rosenthal, A.; Abadio, F.; Silva, C. y Castillo, C.** (2005). Application of high pressure technology in the fruit juice processing: benefits perceived by consumers. *Journal of Food Engineering*, 67: 241-246.

**Del Rosario, B. y Beuchat, L.** (1995). Survival and growth of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cantaloupe and watermelon. *Journal of Food Protection*, 58: 105-107.

**Dong, X.; Wrolstad, R. y Sugar, D.** (2000). Extending shelf life of fresh-cut pears. *Journal of Food Science*, 65: 181-186.

**Doyle, M.** (1991). *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 12: 289 – 302.

**Draper, N.** (1963). Ridge Analysis of response surfaces. *Technometrics*, 5: 469-472.

**Erkan, M.; Wang, C. y Krizek, D.** (2001). UV-C irradiation reduces microbial populations and deterioration in Cucurbita pepo fruit tissue. *Environmental and Experimental Botany*, 45: 1-9.

**Falik, E.; Aharoni, Y.; Grinberg, S.; Copel, A. y Klein, J.** (1994). Postharvest hydrogen peroxide treatment inhibits decay in eggplant and sweet red pepper. *Crop Protection*, 13: 451-454.

**FDA** (2001). Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition Analytical Bacteriological Manual. FDA editions.

**FDA** (2002). Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. Guidance for Industry.

**Ferrante, S.** (2004). Utilización combinada de ultrasonido y antimicrobianos naturales para inhibir el desarrollo de *Listeria monocytogenes* en jugos frutales. Tesis de Grado. Universidad Católica Argentina.

**Ferrante, S.; Guerrero, S. y Alzamora, S.** (2007). Combined use of ultrasound and natural antimicrobials to inactivate *Listeria monocytogenes* in orange juice. *Journal of Food Protection*, 70: 1850–1856.

**Fonseca, J. y Rushing, J.** (2006). Effect of ultraviolet-C light on quality and microbial population of fresh-cut watermelon. *Postharvest Biology and Technology*, 40: 256-261.

**Friedly, E.; Crandall, P.; Ricke, S.; O'Bryan, C.; Martin, E. y Boyd, L.** (2008). Identification of *Listeria innocua* surrogates for *Listeria monocytogenes* in hamburger patties. *Journal of Food Science*, 73: 174-178.

**Ganesh, K. y Anand, S.** (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Internacional Journal of Food Microbiology*, 42: 9-27.

**Gardner, D. y Shama, G.** (1999). UV intensity measurement and modelling and disinfection performance for irradiation of solid surfaces with UV light. *Transactions of the Institution of Chemical Engineers, part C*, 77: 232-242.

**Gibson, A. y Hocking A.** (1997). Advances in predictive modeling of fungal growth in food. *Trends in Food Science and Technology*, 8: 353-358.

**Gómez, P.; Alzamora, S.; Castro, M. y Salvatori, D.** (2010). Effect of ultraviolet-C light dose on quality of cut-apple: Microorganism, color and compression behavior. *Journal of Food Engineering*, 98: 60-70.

**Gould, G.** (1995). Homeostatic mechanisms during food preservation by combined methods. En *Food Preservation by Moisture Control. Fundamentals and Applications*. ISOPOW PRACTICUM II. G.V. Eds. G. Barbosa-Cánovas y J. Welti-Chanes p. 397-410. Technomic Publication. Pennsylvania, USA.

**Gray, N.** (1994). *Drinking water quality. Problems and solutions*. Ed. N.F. Gray. Wiley, Chichester, USA.

**Guerrero-Beltrán, J. y Barbosa-Cánovas, G.** (2004). Review: Advantages and limitations on processing food by UV light. *Food Science Technology International*, 10: 137-146.

**Guerrero, S.; Tognon, M. y Alzamora, S.** (2005). Modeling the response of *Saccharomyces cerevisiae* to the combined action of ultrasound and low weight chitosan. *Food Control*, 16: 131–139.

**Guerrero, S.; Alzamora, S. y Gerschenson, L.** (1994). Development of a shelf-stable banana purée by combined factors: microbial stability. *Journal of Food Protection*, 57: 902 – 907.

**Hadjok, C.; Mittal, G. y Warriner, K.** (2008). Inactivation of human pathogens and spoilage bacteria on the surface and internalized within fresh produce by using a combination of ultraviolet light and hydrogen peroxide. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 1014-1024.

**Hartmann, H.; Kester, D. y Davies, F.** (1990). *Plant Propagation: Principles and Practices*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs. NJ.

**Heinz, V. y Knorr, D.** (1996). High pressure inactivation kinetics of *Bacillus subtilis* cells by a three-state-model considering distributed resistance mechanisms. *Food Biotechnology*, 2: 149–161.

**Hewitt, C.; Boon, L.; McFarlane, C. y Nienow, A.** (1998). The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on *Escherichia coli* W3110 during continuous cultivation in an agitated bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 59: 612-620.

**Hewitt, C. y Nebe Von Caron, G.** (2001). An industrial application of multiparameter flow cytometry: assessment of cell physiological state and its application to the study of microbial fermentations. *Cytometry*, 44: 179-187.

**Hewitt, C. y Nebe Von Caron, G.** (2004). The application of multi-parameter flow cytometry to monitor individual microbial cell physiological state. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 89: 197-223.

**Hoffmans, C.; Fung, D. y Kastner, C.** (1997). Methods and resuscitation environments for the recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*: a review. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. 5: 249-268.

**Hough, G. y Contarini, A.** (1994). Training a texture profile panel and constructing standard rating scales in Argentina. *Journal of Texture Studies*, 25: 45-57.

**Hutchings, J.** (2002). The perception and sensory assessment of colour. En *Colour in Food. Improving Quality*. Ed. Douglas B. MacDougall, Boca Ratón, New York.

**IRAM 20005-1** (1996). Análisis sensorial, guía para la selección, entrenamiento y seguimiento de los evaluadores. Parte I: evaluadores seleccionados. Instituto Argentino de Normalización.

**IRAM 20005-2** (1996). Análisis sensorial, guía para la selección, entrenamiento y seguimiento de los evaluadores. Parte II: expertos. Instituto Argentino de Normalización.

**IRAM 20013.** (2001). Análisis sensorial, metodología. Perfil de textura. Instituto Argentino de Normalización.

**Jagger, J.** (1967). *Introduction to research in Ultraviolet Photobiology*. Eds J. Jagger. Englewood Cliffs. Prentice-Hall Inc., New Jersey, USA.

**Janisiewicz, W.; Conway, W.; Brown, M.; Sapers, G.; Fratamico, P. y Buchanan, L.** (1999). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut apple tissue and its potential for transmission by fruit flies. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:1-5.

**Jellinek, G.** (1985). *Sensory evaluation of food, theory and practice*. Ellis Horwood, Londres, Gran Bretaña.

- Juven, B. y Pierson, M.** (1996). Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation. *Journal of Food Protection*, 59: 1233-1241.
- Katsuragi, T. y Tani, Y.** (2000). Screening for microorganisms with specific characteristics by flow cytometry and single-cell sorting. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89: 217-222.
- Kelly, K.** (1943). Color designations for lights. *Journal of the Optical Society of America*, 33: 627-631.
- Khuri, A. y Cornell, J.** (1987). *Response surface. Designs and Analysis*. Interscience, Londres y Nueva York.
- Klapes, N. y Vesley, D.** (1990). Vapor-phase hydrogen peroxide as a surface decontaminant and sterilant. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 503-506.
- Kleyn, D.** (1985). U.S. standards for cheeses. *Dairy Food*, 5: 375-379.
- Koutchma, T.** (2009). Advances in ultraviolet light technology for non-thermal processing of liquid foods. *Food and Bioprocess Technology*, 2: 138-155.
- Lawless, H. y Heymann, H.** (1999). *Sensory Evaluation of Food. Principles and Practices*. Ed. H.T. Lawless y H. Heymann. Aspen Publishers, Maryland, USA.
- Leistner, L.** (1992). Food preservation by combined methods. *Food Research International*, 25: 151-158.
- Leistner, L.** (1995). Principles and Applications of Hurdle Technology. En *New Methods of Food Preservation*. Ed. G.W. Gould, p. 1-21. Blackie Academic and Professional, Glasgow, Escocia.

**Lin, C.; Moon, S.; Doyle, M. y McWatters, K.** (2002). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serotype enteritidis and *Listeria monocytogenes* on lettuce by hydrogen peroxide and lactic acid and by hydrogen peroxide with mild heat. *Journal of Food Protection*, 65: 1215-1220.

**Link, A.; Carmack, E. y Yates III, J.** (1997). A strategy for the identification of proteins localized to subcellular spaces: application to *E. coli* periplasmic protein. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 160: 303-316.

**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. 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.

**Lozano, R.** (1978). *El color y su medición*. Ed America Lee, Buenos Aires.

**Manresa González. A. y Vicente, I.** (2007). *El color en la industria de los alimentos*. Ed. Universitaria, Ciudad de La Habana.

**McMeekin, T.; Olley, J.; Ross, T. y Ratkowsky, D.** (1993). *Predictive Microbiology: Theory and Application*. Research Studies Press Ltd. y John Wiley and Sons Inc., Gran Bretaña.

**Meilgaard, M.; Civille, G. y Carr, B.** (1999). *Sensory Evaluation Techniques*. 3<sup>ra</sup> edición CRC Press, Inc., Florida, USA.

**Mendonça, A.** (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. y Barreiro, J.** (1982). Microflora in pasteurized fruit juices in Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 32: 617-629.

**Miller, M. y Bassler, B.** (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55: 165–199.

**Monsalve-González, A.; Barbosa-Cánovas, G. y Cavalieri R.** (1993). Mass transfer and textural changes during processing by combined methods. *Journal of Food Science*, 58: 1118-1124.

**Mytilinaki, E.** (2008). Utilización de luz ultravioleta de onda corta como tecnología de preservación de jugos frutales. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

**Neighbor, N.; Newberry, L.; Bayari, G.; Skeeles, J.; Beasley, J. y McNew, R.** (1994). The effect of microaerosolized hydrogen peroxide on bacterial and viral poultry pathogens. *Poultry Science*, 73: 1511-1516.

**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.

**Norris, V y Manners, B.** (1993). Deformations in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* direct the synthesis of peptidoglycan. *Biophysical Journal*, 64: 1691-1700.

**O'Mahony, M.** (1986). *Sensory Evaluation of Food: Statistical Methods and Procedures*. Ed. O'Mahony. Marcel Decker, Nueva York, USA.

**Oteiza, J.** (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.

- Padron, M.** (1995). Egg dipping in hydrogen peroxide solution to eliminate *Salmonella typhimurium* from eggshell membranes. *Avian Disease*, 39: 627-630.
- 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.** (1997). Modeling microbial populations with the original and modified version of the continuous and discrete logistic equations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37: 471-490.
- Peleg, M.** (1999). On calculating sterility in thermal and non-thermal preservation methods. *Food Research International*, 32: 271–278.
- Peleg, M. y Cole, M.** (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science*, 38: 353-380.
- Pereyra Gonzales, A.; Burin, L. y Buera, M.** (1999). Color changes during storage of honeys in relation to their composition and initial color. *Food Research International*, 32: 185-191.
- Piyasena, P.; Liou, S. y McKellar, R.** (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.
- Raffellini, S.** (2009). Inactivación de *Escherichia coli* en desarrollo planctónico y en biofilms mediante peróxido de hidrógeno: cuantificación del efecto de la concentración, el pH y la temperatura. Tesis de Doctorado, Universidad de Buenos Aires.
- Raffellini, S.; Guerrero, S. y Alzamora, S.** (2008). Effect of hydrogen peroxide concentration and pH on inactivation kinetics of *Escherichia coli*. *Journal of Food Safety*, 28: 514-533.

**Rhan, R.** (1997). Potassium iodide as a chemical actinometer for 254 nm radiation: use of iodate as an electron scavenger. *Photochemistry and Photobiology*, 66: 450-455.

**Riera, N., Galassi, N. y Felippo, M.** (2008). Introducción a la citometría de flujo. Curso de la Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.

**Roberts, T. 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.

**Rojas, R.; Quintero, J.; Rojas, J. y Coronado, B.** (1994). Conservación de puré de mango mediante factores combinados envasado en grandes recipientes sin adición de sacarosa. *Boletín Internacional de Divulgación CYTED*, N 2, p. 45, Universidad de las Américas, Puebla, México.

**Sajur, S.** (1985). Preconservación de duraznos por métodos combinados. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Mar del Plata.

**Salvatori, D.** (1997). Deshidratación osmótica de frutas: cambios composicionales estructurales a temperaturas moderadas. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, España.

**Salvatori, D.; Andrés A.; Chiralt, A. y Fito, P.** (1998). The response of some properties of fruits to vacuum impregnation. *Journal of Food Process Engineering*, 21: 59-73.

**Sapers, G. y Miller, R.** (1998). Browning inhibition in fresh-cut pears. *Journal of Food Science*, 63: 342-346.

**Sapers, G. y Sites, J.** (2003). Efficacy of 1% hydrogen peroxide wash in decontaminating apples and cantaloupe melons. *Journal of Food Science*, 68: 1793-1797.

**Sastry, S.; Datta, A. y Worobo, R.** (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.** (2008). Response of some microorganisms to ultraviolet treatment on fresh-cut pear. *Food and Bioprocess Technology*, 1: 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.

**Shama, G. y Peter, A.** (2005). UV hormesis in fruits: a concept ripe for commercialisation. *Trends in Food science and Technology*, 16: 128-136.

**Soliva-Fortuny, R. y Martín-Belloso, O.** (2003). New advances in extending the shelf-life of fresh-cut fruits: a review. *Trend in Food Science and Technology*, 14: 341-353.

**Stone, H. y Sidel, J.** (1993). *Sensory Evaluation Practices*, 2ª ed., Academic Press Inc.

**Summerfelt, S.** (2003). Ozonation and UV irradiation. An introduction and examples of current applications. *Aquacultural Engineering*, 28: 21-36.

**Szczesniak, A.** (2002). Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference*, 13: 215-225.

**Talens, P.; Martínez-Navarrete, N.; Fito, P. y Chiralt, A.** (2002). Changes in optical and mechanical properties during osmodehydrofreezing of kiwi fruit. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3: 191-199.

**Toepfl, S.; Heinz, V. y Knorr, D.** (2007). High intensity pulsed electric fields applied for food preservation. *Chemical Engineering and Processing*, 46: 537-546.

**Ueckert, J.; Breeuwer, P.; Abee, T.; Stephens, P.; Nebe Von Caron, G. y Ter Steeg, P.** (1995). Flow cytometry applications in physiological study and detection of foodborne microorganisms, *International Journal of Food Microbiology*, 28: 317-326.

**UNE** (1979). Análisis sensorial. Guía para la instalación de una sala de cata, UNE 87-004-79. Madrid, Asociación Española de Normalización (AENOR).

**van Boekel, A.** (2002). On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 139–159.

**van Oirschot, Q.; Rees, D. y Aked, J.** (2003). Sensory characteristics of five sweet potato cultivars and their changes during storage under tropical conditions. *Food Quality and Preference*, 14: 673-680.

**Vidal Aragón de Olives, M. y Bernalte García, M.** (2003). La IV gama de la fruta. *Horticultura*, 173: 44-50.

**Vives-Rego, J.; Lebaron, P. y Nebe-Von Caron, G.** (2000). Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 429-448.

**Wang, J. y Toledo, R.** (1986). Sporicidal properties of mixtures of hydrogen peroxide vapor and hot air. *Food Technology*, 40: 60-67.

**Waters, C. y Bassler, B.** (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21: 319-346.

**Wei, H.; Wolf, G. y Hammes, W.** (2005). Combination of warm water and hydrogen peroxide to reduce the numbers of *Salmonella typhimurium* and *Listeria innocua* on field salad (*Valerianella locusta*). *European Food Research and Technology*, 221: 180-186.

**Westland, S.** (2002). Models of colour perception and colour appearance. En *Colour in Food. Improving Quality*. Ed. Douglas B. MacDougall, Boca Ratón, New York.

**Whiting, R.** (1995). Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35: 467- 494.

**Yaun, B.; Summer, S; Eifert, J. y Marcy, J.** (2004). Inhibition of pathogens on fresh produce by ultraviolet energy. *International Journal of Food Microbiology*, 90: 1-8.

**Yousef, A. y Marth, E.** (1988). Inactivation of *Listeria monocytogenes* by ultraviolet energy. *Journal of Food Science*, 53: 571-573.

**Yuste, J. y Fung, D.** (2002). Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A 49594 in apple juice supplemented with cinnamon. *Journal of Food Protection*, 65: 1663-1666.

**Zar, J.** (1999). *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River, New Jersey, USA.

**Zuang, R. y Beuchat, L.** (1996). Effectiveness of trisodium phosphate for killing *Salmonella montevideo* on tomatoes. *Letters in Applied Microbiology*, 22: 97-100.

### 7.1- Páginas web

**EPA.** (1999). Environmental Protection Agency. Ultraviolet Radiation. Alternative disinfectants and oxidants guidance manual. pp. 8.1 – 8.25 [Internet, WWW], ADDRESS: [http://www.epa.gov/safewater/mdbp/pdf/alter/chapt\\_8.pdf](http://www.epa.gov/safewater/mdbp/pdf/alter/chapt_8.pdf). Febiger. Philadelphia, PA.

**FDA** (2000a). FDA approves the use of ultraviolet radiation for juice. Food Safety Initiative. Center for Food Safety and Applied Nutrition. En: <http://www.foodsafety.gov/~dms/fsiupd22.html>

**FDA** (2000b). Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. En: <<http://vm.cfsan.fda.gov/~comm/ift-toc.html>>.

**Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación**, Ministerio de Producción, República Argentina. Mercados Frutihortícolas.  
<<http://www.sagpya.mecon.gov.ar/>>