



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Industrias

Evaluación de la efectividad del uso de luz ultravioleta de onda corta (UV-C) asistido por temperatura moderada en la preservación de jugos turbios

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

Licenciada Mercedes García Carrillo

Director de tesis: Dra. Sandra Norma Guerrero

Director Asistente: Dra. Mariana Inés Ferrario

Consejera de estudios: Dra. María Florencia Mazzobre

Fecha de defensa: 30 de marzo del 2020

Ciudad de Buenos Aires, 29 de febrero del 2020

Evaluación de la efectividad del uso de luz ultravioleta de onda corta (UV-C) asistido por temperatura moderada en la preservación de jugos turbios

El objetivo general de este trabajo consistió en evaluar la efectividad de un tratamiento aplicando luz UV-C simple (20 °C) o asistida por temperatura moderada (UV-C/T: 40, 45 y 50 °C) para la preservación de un jugo turbio de zanahoria-naranja. Se estudió la cinética de inactivación microbiana de *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 49838 y *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 para el jugo sometido a los distintos tratamientos mediante los modelos de Weibull, Gompertz y Geeraerd y se analizó su idoneidad. Todos los tratamientos causaron moderada a elevada inactivación microbiana según la temperatura aplicada y el microorganismo (2,0-6,0 reducciones logarítmicas), siendo mayores los niveles de inactivación logrados por los tratamientos UV-C/T. Se detectaron efectos sinérgicos en la inactivación de *E. coli* y *P. fluorescens* sometidos a tratamientos UV-C/T (a 45 °C y 50 °C), y efectos aditivos en la inactivación de *P. fluorescens* tratado a 40 °C. Se escogió como tratamiento óptimo al UV-C/T:50 °C por la metodología de superficies de respuesta (MSR). Estudios de citometría de flujo revelaron daño en la membrana plasmática y pérdida de actividad esterasa en células de *S. cerevisiae* tratadas con UV-C simple y UV-C/T:50 °C asistido, mientras que se detectó la presencia de vacuolas expandidas junto a la coagulación o pérdida del contenido celular mediante microscopía electrónica de transmisión. El tratamiento propuesto UV-C/T:50 °C generó 0,3-5,0 reducciones logarítmicas en las poblaciones de mesófilos aerobios, hongos y levaduras, y coliformes totales; previniendo su recuperación a lo largo de 21 días de almacenamiento refrigerado. Se preservaron el color, turbidez, °Brix y pH del jugo tratado con UV-C/T durante su almacenamiento refrigerado. No se detectaron diferencias en la actividad antioxidante total y el contenido de polifenoles entre las muestras no tratadas y las sometidas a los tratamientos (UV-C simple, T:50 °C simple y UV-C/T asistido) inmediatamente tras el procesamiento. La actividad antioxidante total y el contenido polifenólico se mantuvieron casi constantes en todas las muestras a lo largo del almacenamiento (13 días para las muestras no tratadas y las sometidas a los tratamientos simples con UV-C o T:50 °C; 21 días para las muestras tratadas con UV-C/T asistido). Los estudios de análisis sensorial mostraron que los consumidores percibieron al jugo UV-C/T:50 °C como un producto muy “saludable”, existiendo un grupo definido de consumidores que le dio una valoración muy positiva.

Palabras clave: jugos turbios, luz ultravioleta, temperatura moderada, microbiología predictiva, análisis sensorial.

Assessment of the efficacy of the usage of short-wave ultraviolet light (UV-C) assisted by mild temperature for the preservation of turbid juices

The main goal of this study was to assess the efficacy of a treatment applying single UV-C light (20 °C) and UV-C light assisted by mild temperature (UV-C/T: 40, 45 y 50 °C) for the preservation of a turbid carrot-orange juice blend. Microbial inactivation kinetics of *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 49838 and *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 were studied for all treatments using the Weibull, Gompertz and Geeraerd models and their suitability was analyzed. All treatments induced moderate to high microbial inactivation, depending on the temperature and the microorganism under study (2.0-6.0 logarithmic reductions), with the UV-C/T treatments yielding higher inactivation levels. A synergistic effect on the inactivation of *E. coli* and *P. fluorescens* was detected for UV-C/T (45 °C and 50 °C) treatments, while an additive effect was observed on the inactivation of *P. fluorescens* treated with UV-C/T at 40 °C. The UV-C/T:50 °C was chosen as the optimal treatment according to the response surface methodology (RSM). Flow cytometry studies revealed damage in the cell membrane and loss of esterase activity in *S. cerevisiae* cells treated with single UV-C and UV-C/T:50 °C, while expanded vacuoles along with the coagulation or loss of cell content were detected using transmission electron microscopy. The UV-C/T:50 °C treatment produced 0.3-5.0 logarithmic reductions in the aerobic mesophiles, yeast and moulds and total coliforms populations; preventing from their recovery along 21 days of refrigerated storage. Colour, turbidity, °Brix and pH of the UV-C/T juice were preserved during its refrigerated storage. No differences in total antioxidant activity and polyphenolic content were recorded among non-treated and treated (single UV-C, single T:50 °C, and UV-C/T) samples immediately after processing. Total antioxidant activity and polyphenolic content remained almost constant in all samples through storage (13 days for non-treated, single UV-C and single T:50 °C treated samples; 21 days for UV-C/T treated samples). Sensorial analysis studies revealed that consumers deemed the UV-C/T:50 °C juice as a very healthy product, with a cluster of consumers displaying a highly positive impression.

Keywords: turbid juices, ultraviolet light, mild temperature, predictive microbiology, sensorial analysis.

Agradecimientos

A la Universidad de Buenos Aires, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas por brindar todos los recursos necesarios para la realización de esta tesis.

A los integrantes del Departamento de Industrias (DI) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN- UBA), por haberme dado el espacio y los equipos necesarios para la realización de esta tesis.

A mi directora de tesis, la Dra. Sandra Guerrero, por su guía constante en el diseño de las experiencias y por darme la oportunidad y todos los recursos necesarios para realizar las tareas de investigación de este doctorado en su laboratorio. Asimismo, agradezco a las Dras. Guerrero y Ferrario por su rápida respuesta y por los aportes realizados en la etapa de corrección del manuscrito.

A mi directora asistente, Dra. Mariana Ferrario, por su constante asistencia y acompañamiento en la realización de la parte experimental de esta tesis. Además, le agradezco por todos los aportes teóricos realizados.

A la Dra. Marcela Schenk, por su asistencia en la realización de las experiencias de Análisis Sensorial de la tesis. En ese mismo sentido, agradezco a la Dra. Carolina Schebor, por todo el esfuerzo puesto en la realización de los experimentos de DSC.

A mi consejera de estudios, la Dra. María Florencia Mazzobre, por todo el acompañamiento y buena predisposición mostrados a lo largo del proceso de finalización de esta tesis. También, a la Dra. Marcela Tolaba de la Subcomisión de Doctorado del DI, por el seguimiento realizado.

Al Secretario de Posgrado de la FCEyN, el Dr. Gabriel Mindlin, gracias totales por la ayuda brindada y por estar siempre disponible para asistirme, con una gran predisposición y calidez humana.

Al Dr. Matías Blaustein y la Dra. Eva Figuerola, por haberme acompañado, ayudado y escuchado- siempre con una sonrisa, preocupación sincera por todo lo que me sucedía y buenos consejos- en estos últimos meses.

A todos mis compañeros y amigos que trabajan en el DI, que me acompañaron en este camino. En especial, a Gabriela, Eunice, Ángela, Adriana, Sofía y Julieta por todas las horas, risas y carbohidratos compartidos.

A todos mis compañeros y amigos del iB3, por haberme recibido de brazos abiertos. En especial, a mis amigos del 10 por las horas de diversión (y trabajo) compartidas: Juli (gracias totales por la revisión final), Cami, Mari y Cris. También, gracias a todos los que trabajan en el 1 por la buena onda (Anto, Analía, Maru, Gonza, Oliver, Pili, Sofía y Natalia).

A mis amigos, quienes estuvieron a mi lado durante todos estos años- en las etapas felices y en las difíciles: Mau, Solci, Carito, Aye, Cande, Zoe, Emi, Tomi, Marian, Lu, Nuri, Lulu, Euge, Selva, Nadi, Nico, Rubén, Rodri, Krei, Alex, Nati, Ale, Delfi y Vani, entre tantos más.

A mi familia, gracias por estimular mi vocación por el conocimiento científico desde la infancia, ayudándome en empresas divertidas y locas como la Feria de Ciencias.

Finalmente, gracias a las siguientes personas (quienes fueron de ayuda primordial en este proceso): Esteban, Sara, Lucía, Francisco y Federico. No sólo les quiero agradecer por la ayuda que me extendieron a mí, sino por todas las tareas que toman día a día en sus respectivos espacios de intervención.

“Natasha se acerca a la ventana y la abre desde el patio para que entre más aire en mi habitación. Puedo ver la brillante franja de césped verde que se extiende tras el muro, arriba el cielo claro y azul y el sol que brilla en todas partes. La vida es hermosa. Que las futuras generaciones la libren de todo mal, opresión y violencia y la disfruten plenamente.”

L.T., Testamento (3 de marzo de 1940).

A la memoria de mi abuela Tere:

te extraño.

Índice

1. Introducción	13
1.1. Beneficios del consumo de frutas y vegetales en la salud humana	13
1.2. Naranja: producción en Argentina y composición química	15
<i>1.2.1. Producción de naranjas en Argentina</i>	15
<i>1.2.2. Composición química de la naranja</i>	16
1.3. Zanahoria: producción en Argentina y composición química	18
<i>1.3.1. Producción de zanahoria en Argentina</i>	18
<i>1.3.2. Composición química de la zanahoria</i>	19
1.4. Ecología microbiana de frutas y vegetales	20
<i>1.4.1. Características de los microorganismos utilizados en la tesis</i>	23
1.5. Métodos para la preservación de jugos frutihortícolas	25
1.6. Tratamiento térmico	25
1.7. Tecnologías emergentes para la preservación de jugos	27
1.8. Luz Ultravioleta de Onda Corta (UV-C)	29
<i>1.8.1. Usos de la luz UV-C en la industria</i>	30
<i>1.8.2. Efecto germicida de la luz ultravioleta de onda corta (UV-C)</i>	30
<i>1.8.3. Susceptibilidad de los microorganismos a la luz UV-C</i>	32
<i>1.8.4. Determinación de la dosis de UV-C</i>	34
<i>1.8.5. Determinación de la dosis UV-C por biodosimetría</i>	36
<i>1.8.6. Fuentes de luz UV-C comercialmente disponibles</i>	37
<i>1.8.7. Aplicación de la luz UV-C para la preservación de alimentos</i>	39
<i>1.8.8. Ventajas y limitaciones del uso de luz UV-C</i>	40
<i>1.8.9. Diseño de reactores UV-C y equipos disponibles a escala industrial</i>	41
1.9. Tecnología combinada de obstáculos de preservación de alimentos	43
1.10. Evaluación de riesgo microbiano mediante microbiología predictiva	44
<i>1.10.1. Clasificación de los modelos predictivos</i>	46
1.11. Estudio del estado fisiológico y daño microbianos	53
<i>1.11.1. La citometría de flujo como indicadora de la viabilidad microbiana</i>	53
<i>1.11.2. Uso de la microscopía electrónica de transmisión (MET) para evaluar daño microbiano</i>	57
1.12. Evaluación de la calidad físico-química de jugos frutihortícolas	58
<i>1.12.1. Color</i>	58
<i>1.12.2. Antioxidantes</i>	63
<i>1.12.3. Polifenoles</i>	65

1.13. Análisis sensorial de alimentos	66
1.13.1. Jueces sensoriales	67
1.13.2. Selección de un panel de jueces	67
1.13.3. Elección del sitio de evaluación sensorial	68
1.13.4. Sala de cabinas de evaluación sensorial	68
1.13.5. Clasificación de las pruebas de evaluación sensorial	68
2. Objetivos	74
2.1. Hipótesis y objetivo general	74
2.2. Objetivos específicos	75
3. Materiales y Métodos	79
3.1. Materia prima	79
3.2. Reactivos	79
3.3. Medios de cultivo	80
3.4. Microorganismos utilizados en los experimentos	81
3.5. Preparación de inóculos	82
3.6. Obtención de los jugos simples y el jugo mezcla de zanahoria-naranja	82
3.7. Caracterización físico-química de los jugos	84
3.7.1. pH	85
3.7.2. Sólidos solubles (° Brix)	85
3.7.3. Turbidez	85
3.7.4. Coeficiente de absorción UV	85
3.7.5. Tamaño de partícula	85
3.8. Equipo de luz UV-C	87
3.8.1. Cálculo del número de Reynolds	88
3.8.2. Energía eléctrica por orden (E_{EO})	89
3.9. Caracterización de la dosis de UV-C del reactor	90
3.9.1. Determinación de la irradiancia UV-C mediante radiómetro	90
3.9.2. Determinación de la dosis de UV-C absorbida por la muestra por actinometría	90
3.10. Distribución de tiempo de residencia y definición de la biodosis	92
3.10.1. Distribución de tiempos de residencia (DTR)	92
3.10.2. Distribución de dosis de UV-C: Biodosimetría	93
3.11. Estudios de reto microbiano	96
3.11.1. Tratamiento simple de luz UV-C (UV-C)	96
3.11.2. Tratamientos térmicos utilizados	96

3.11.4. Tratamiento de luz UV-C asistida por temperatura (UV-C/T)	97
3.11.5. Recuento microbiano	98
3.11.6. Caracterización de la cinética de inactivación microbiana por modelado predictivo.....	99
3.15. Estudios de daño microbiano causado por los tratamientos UV-C y UV-C/T	101
3.15.1. Estudio del daño microbiano por citometría de flujo (CF).....	101
3.15.2. Estudios del daño microbiano por microscopía electrónica de transmisión (MET).....	104
3.16. Estudios de calidad microbiológica y físico-química de los jugos mezcla de zanahoria-naranja.....	105
3.16.1. Estudios de calidad según la evolución de flora nativa.....	105
3.16.2. Estudios de calidad físico-química del jugo mezcla de zanahoria-naranja	105
3.16.3. Estudios de color de las muestras analizadas	106
3.16.4. Turbidez	107
3.16.5. pH	107
3.16.6. Determinación de polifenoles totales.....	107
3.16.7. Determinación de la capacidad antioxidante por DPPH.....	108
3.17. Estudios sensoriales	108
3.17.1. Área de prueba.....	108
3.17.2. Jueces de los ensayos de análisis sensorial	109
3.17.3. Prueba conjunta	109
3.17.4. Prueba de campo	111
3.17.5. Prueba CATA.....	114
4. Resultados y discusión	119
4.1. Caracterización físico-química de las matrices frutihortícolas.....	119
4.2. Prueba de reto microbiano para el pre-tratamiento térmico del jugo de zanahoria-naranja usado en los experimentos de inactivación microbiana	123
4.3. Determinación del número de Reynolds.....	123
4.4. Determinación de la dosis de UV-C emitida mediante radiometría	124
4.5. Determinación de la dosis de UV-C incidente mediante actinometría.....	124
4.6. Determinación de la distribución de dosis de UV-C mediante biodosimetría.....	126
4.6.1. Determinación de la distribución de tiempos de residencia en el reactor UV-C.....	126
4.6.1. Determinación de la distribución de biodosis	128
4.7. Caracterización de las curvas de inactivación microbiana	130

4.8. Comparación de los modelos empleados de inactivación microbiana	141
4.9. Análisis de componentes principales para la evaluación de los parámetros de los modelos de inactivación	143
4.10. Optimización del tratamiento UV-C asistido por temperatura moderada (UV-C/T) mediante la metodología de superficies de respuesta (RSM)	144
4.11. Determinación de la energía eléctrica por orden (E_{EO})	150
4.12. Estudio del daño en células de <i>S. cerevisiae</i> KE 162 tratadas por luz UV-C asistida por temperatura moderada (UV-C/T).....	152
4.12.1. Estudio del estado fisiológico celular causado por el procesamiento UV-C/T mediante citometría de flujo (CF).....	152
4.12.2. Estudio del daño microbiano por microscopía electrónica de transmisión (MET).....	161
4.13. Evaluación de la calidad microbiológica y físico-química del jugo de zanahoria-naranja procesado con luz UV-C asistida por temperatura moderada (UV-C/T) durante el almacenamiento refrigerado.....	165
4.13.1. Evolución de la flora nativa	165
4.13.2. Evolución del contenido de polifenoles (CPo) y actividad antioxidante (AAT)	169
4.13.3. Evolución del color, pH, ° Brix y turbidez.....	172
4.14. Análisis sensorial.....	177
4.14.1. Estudio conjunto	177
4.14.2. Test de campo	178
4.14.3. Cuestionario CATA (Check-all-that-apply)	180
4.14.4. Análisis de penalización.....	182
5. Conclusiones	185
5.1. Primera parte	185
5.2. Segunda parte.....	186
5.3. Tercera parte	187
5.4. Cuarta parte	188
5.5. Investigaciones futuras.....	189
6. Anexo estadístico	192
6.1. Significación estadística	192
6.2. Análisis de la varianza (ANOVA)	193
6.2.1. Modelo de los parámetros de un análisis de la varianza	194
6.2.2. El análisis de la varianza como un modelo de regresión	195
6.2.3. La prueba F de significación de la regresión.....	196
6.3. Métodos de múltiples comparaciones por mínima diferencia significativa ..	196

6.3.1. <i>Test de mínima diferencia significativa de Fisher (MDS)</i>	197
6.3.2. <i>Prueba de Tukey</i>	197
6.4. Criterios para la comparación de modelos de regresión	198
6.5. Regresión múltiple (RM) y metodología de superficies de respuesta (MSR) 199	
6.6. Análisis multivariado	200
6.6.1. <i>Análisis multivariado de la varianza (MANOVA)</i>	200
6.6.2. <i>Análisis de componentes principales (PCA)</i>	201
6.6.3. <i>Análisis de correspondencias (CA)</i>	202
6.6.4. <i>Análisis de conglomerados</i>	203
6.7. Análisis multivariado de la covarianza (MANCOVA)	205
7. Referencias	208



1. Introducción

1. Introducción

1.1. Beneficios del consumo de frutas y vegetales en la salud humana

Actualmente, las dietas con alto contenido de frutas y vegetales son muy recomendadas gracias a sus propiedades promotoras de la salud. Tanto las frutas como los vegetales poseen un rol importante en la dieta humana debido a sus niveles elevados de vitaminas (A, C, B1, B6, B9, y E, entre otras), minerales (como el magnesio, calcio y potasio), y fitoquímicos (en especial, antioxidantes). Además, se recomienda su consumo como fuente de fibra dietaria (Slavin y Lloyd, 2012).

Cada país posee sus propios lineamientos dietarios en lo que concierne al consumo de frutas y vegetales. En particular, los Dietary Guidelines for Americans (United States Department of Agriculture- USDA, 2010) recomiendan que al menos la mitad de cada comida se componga de frutas y vegetales. Esto representaría unas 9 raciones totales, de las que 4 deberían ser de fruta y las restantes de vegetales.

Según el *“Informe sobre la salud en el mundo”* del año 2007 (Organización Mundial de la Salud- OMS, 2007), las dietas con una baja ingesta de vegetales y de fibra dietaria serían responsables de causar unas 2,7 millones de muertes anuales, representando uno de los 10 factores de riesgo asociados a una mortalidad temprana. En la República Argentina, solamente el 6 % de la población adulta consume las 5 raciones de frutas y vegetales diarias recomendada por la OMS según la Encuesta Nacional de Factores de Riesgo (INDEC, 2018). Por tales motivos, el gobierno argentino impulsó un programa llamado *“Campaña de promoción del consumo de frutas y verduras”* con el objetivo de que estos sean más incluidos en las dietas (Ministerio de Agroindustria, 2017).

Muchos de los compuestos fitoquímicos de frutas y vegetales son poderosos antioxidantes y serían responsables de reducir el riesgo de enfermedades crónicas por su acción en contra del daño por radicales libres, por detoxificar sustancias carcinogénicas y por influenciar procesos que cambian el destino de las células tumorales (Silva-Dias, 2012). La inclusión de estos alimentos está vinculada a una buena salud general, mejoras en la salud gastrointestinal y la visión, reducción del riesgo de desarrollar algunas formas de cáncer, enfermedad cardíaca, diabetes, anemia, úlceras gástricas y otras enfermedades crónicas (Liu, 2013).

Dado que los fitoquímicos varían mucho en composición y proporción entre las distintas frutas y vegetales y pueden poseer distintos mecanismos de acción, se recomienda consumir diariamente una amplia gama de alimentos derivados de plantas a fin de obtener los máximos beneficios para la salud. Los grupos más estudiados de fitoquímicos con efectos

benéficos para el bienestar humano son los carotenoides (**Fig. 1.1**) y los compuestos fenólicos (Liu, 2004).

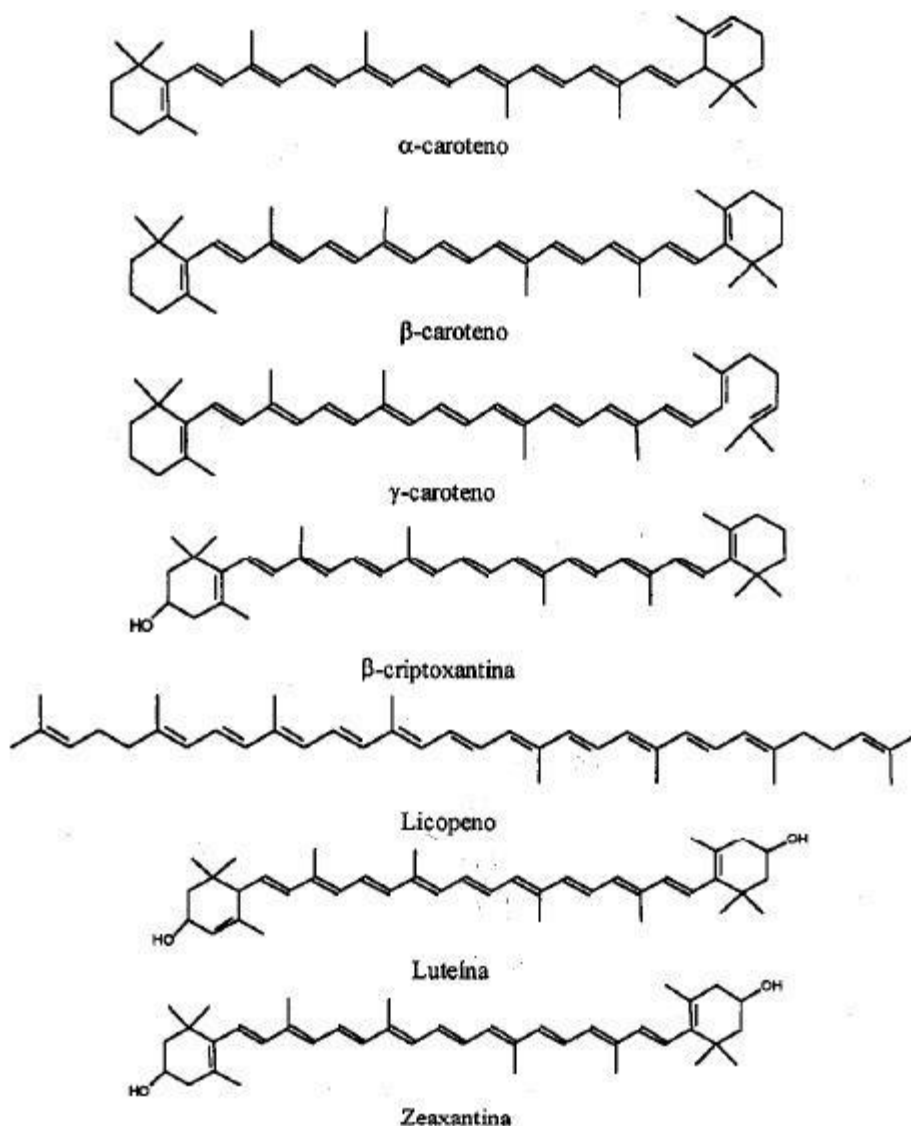


Figura 1.1. Estructura química de los carotenoides.

Dentro de los vegetales de raíz, la zanahoria es conocida por su alto contenido de pigmentos antioxidantes como carotenoides y antocianinas (Silva-Dias, 2014). La zanahoria color naranja -la más consumida- posee elevado contenido de α y β carotenos, siendo rica en provitamina A. Además, presenta la combinación especial de tres flavonoides: quercetina, kaempferol, y luteolina. Estos flavonoides junto a los pigmentos ya mencionados serían responsables de muchos de los beneficios atribuidos al consumo de zanahoria: actividad anticancerígena, actividad inmunoprotectora, capacidad antioxidante,

disminución de los niveles de colesterol y de enfermedad cardiovascular, actividad antihipertensiva, actividad hepato- y renoprotectora, y capacidad de curar heridas.

Respecto a las frutas cítricas, se ha visto que su consumo disminuye las chances de sufrir distintos tipos de cáncer. Se presume que este efecto benéfico se debería a la vitamina C, si bien se han identificado otros compuestos que también serían responsables. Los cítricos, incluyendo naranjas, mandarinas, pomelos, limones y limas, son además fuentes de nutrientes como ácido fólico, fibra dietaria, carotenoides y flavonoides. Estos compuestos también protegerían contra enfermedades degenerativas y cardiovasculares (Silalahi, 2002).

La demanda de los consumidores por frutas y vegetales frescos junto al requerimiento de la conveniencia, debido a los ritmos de vida agitados de la sociedad moderna, ha impulsado el interés por generar productos mínimamente procesados. Estos productos son aquellos que han sido sometidos a distintos pasos de procesamiento (como el pelado, cortado, lavado, desinfección, enjuague, etc.), con el objetivo de estar listos para su consumo y de ser seguros alimentariamente (Artés y Allende, 2014).

1.2. Naranja: producción en Argentina y composición química

1.2.1. Producción de naranjas en Argentina

La República Argentina es el octavo productor de fruta cítrica fresca a nivel mundial, produciendo 3284 miles de toneladas en el período 2017-2018 (Federación Argentina del Citrus- FEDERCITRUS, 2018). La cosecha de limón es la más importante, representando casi el 60 % del total. Es seguida por la de naranja, mandarina y pomelo.

En la República Argentina, la actividad citrícola se concentra en dos regiones: Noroeste (Salta, Jujuy y Tucumán) y Litoral (Buenos Aires, Entre Ríos, Corrientes y Misiones) (FEDERCITRUS, 2018).

La producción de naranja y mandarina está enfocada al mercado de frutas frescas, dado que los elevados costos asociados no permiten la producción de un producto industrializado. Solamente se dirige a la industria aquellas mandarinas y naranjas en condiciones inadecuadas para comercializarse frescas.

Si bien el jugo de naranja es el más consumido a nivel mundial, Argentina solamente elabora un 1 % del total global bajo la forma de jugo concentrado congelado, enfocándose en la obtención de derivados cítricos de limón. Los ingresos por exportaciones de productos cítricos industrializados fueron de unos 1178 millones de dólares en 2017,

correspondiendo 200 millones a la elaboración de jugos concentrados congelados (FEDERCITRUS, 2018).

La variedad Valencia de temporada tardía (**Fig. 1.2**) es la más usada por productores de jugo de naranja dulce por su calidad, rendimiento y color intenso y luminoso, atribuible a su riqueza en carotenoides (Gama y Sylos, 2005). La calidad en el sabor del jugo de esta variedad se relaciona con la proporción de ácidos y sólidos solubles, y con la ausencia de compuestos que den mal sabor, como los metabolitos fermentativos (Pereira y col., 2013).



Figura 1.2. Naranjas (*Citrus x sinensis*) pertenecientes a la variedad Valencia.

1.2.2. Composición química de la naranja

La naranja, *Citrus x sinensis*, es una fruta de bajo contenido calórico y lipídico (Fundación Española de la Nutrición, 2010). Un 88 % de su contenido es agua, siendo los principales sólidos solubles en el jugo de naranja los carbohidratos (cerca del 10 %). Los principales azúcares presentes en el jugo de naranja son: glucosa, fructosa y sacarosa (en relación 1:1:2) (**Tabla 1.1**).

La naranja posee una cantidad importante de pectina (fibra soluble), que se asocia a la disminución de la glucosa y colesterol en sangre junto a un buen desarrollo de la flora intestinal (Henning y col., 2017). Además, la fibra previene ciertos tipos de cáncer. La pectina junto a otras sustancias pécticas son claves en términos de la calidad del jugo al brindarle cuerpo o viscosidad y turbidez. En la naranja, estas sustancias comprenden el 30 % del albedo (la parte blanca de la pulpa) pero están casi ausentes en el jugo (0,01- 0,13 %) (Pao y Fellers, 2003).

Adicionalmente, presenta grandes cantidades de vitamina C (ácido ascórbico), ácido fólico y, en menor cantidad, provitamina A. El jugo de naranja presenta altas concentraciones de vitamina C, con un promedio de 500 mg/L (Aschoff y col., 2015). Se ha

reportado que el consumo de más de 200 mg/día de vitamina C tendría beneficios óptimos para la salud (Frei y col., 2012). La vitamina C posee múltiples beneficios para la salud, incluyendo la mejora de la absorción de hierro. Mientras, el ácido fólico ayuda a prevenir defectos en la formación del tubo neural durante el embarazo (Turner y Burri, 2013).

Tabla 1.1. Composición nutricional de la naranja cada 100 gramos de ración comestible (reproducido de Moreiras y col., 2011).

	Naranja
Energía (kcal)	42
Proteína (g)	0,80
Hidratos de Carbono (g)	8,60
Fibra (g)	2,00
Calcio (mg)	36,00
Hierro (mg)	0,30
Yodo (µg)	2,00
Magnesio (mg)	12,00
Zinc (mg)	0,18
Sodio (mg)	3,00
Potasio (mg)	200,00
Fósforo (mg)	28,00
Selenio (µg)	1,00
Tiamina (mg)	0,10
Riboflavina (mg)	0,03
Equivalentes de Niacina (mg)	0,30
Vitamina B6 (mg)	0,06
Vitamina A (µg)	40,00
Ácido fólico (µg)	37,00
Vitamina C (mg)	50,00

La naranja también posee carotenoides con actividad provitamínica A: α caroteno, β caroteno, y criptoxantina (Abdelaali y col., 2018). También aporta carotenoides sin actividad provitamínica A, como luteína y zeaxantina, que contribuyen a una buena visión y disminuyen el riesgo de padecer cataratas (Rodríguez-Concepción y col., 2018).

Por otro lado, cuenta con ácidos orgánicos como el málico y, sobre todo, el cítrico. El ácido cítrico mejora la actividad de la vitamina C a nivel celular, incrementa la absorción de calcio, y ayuda a remover compuestos tóxicos del organismo. Adicionalmente, se ha visto que los ácidos cítrico y málico tendrían acción antimicrobiana contra *Escherichia coli*

(Raybaudi-Massilia y col., 2009). Además, contiene grandes cantidades de los siguientes ácidos hidroxicinámicos con capacidad antioxidante: ferúlico, cafeico y p-cumárico (Zou y col., 2016).

Es importante recalcar que la naranja es también muy rica en flavonoides como la hesperidina, neohesperidina, naringina, nobiletina, entre otros. Sin embargo, estos flavonoides están presentes en el albedo y se pierden, en buena parte, al elaborar jugo. Los jugos enriquecidos con pulpa tratan de enmendar parcialmente esta situación (Jaffe y Mani, 2018).

Cuando la naranja es consumida en forma de jugo, sus características nutricionales resultan alteradas. El jugo de naranja posee poca fibra en comparación con la fruta entera, y menores cantidades de vitaminas y minerales. Por tal motivo, se recomienda consumirlo lo más fresco posible a fin de evitar las pérdidas nutricionales (Ávila y col., 2009).

1.3. Zanahoria: producción en Argentina y composición química

1.3.1. Producción de zanahoria en Argentina

En nuestro país, se producen entre 200.000 y 240.000 toneladas de raíces de zanahoria por año, ocupando una superficie de 7000-9800 hectáreas (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria- INTA, 2012). La mayoría de la producción se destina al consumo fresco y un reducido porcentaje se deriva a la industria del deshidratado y otros procesos. La zanahoria se sitúa en la sexta posición entre las hortalizas respecto al consumo per cápita argentino (6 kg/ habitante/año).

La exportación de esta hortaliza es más bien reducida (0,5-1,5 % de la producción), siendo los destinos principales: Paraguay, Uruguay y Chile. Los ingresos por exportaciones fueron de aproximadamente 1035000 millones de dólares en el 2011. La mayoría de la producción de zanahoria en Argentina se da en la región de Cuyo (Mendoza y San Juan), seguida por Santiago del Estero, Santa Fe y la zona sudeste de la Provincia de Buenos Aires (INTA, 2012).

En nuestro país, aproximadamente el 50 % de la superficie se halla plantada con zanahorias de la variedad 'Flakkee', un 26 % con zanahorias de la variedad 'Nantes', un 20 % con la variedad 'Criolla' y un 3 % con otras variedades, incluyendo 'Chantenay', 'Danvers' y 'Berlicum'.

La variedad Chantenay (**Fig. 1.3**) es una de las más populares a nivel global, siendo zanahorias relativamente cortas y muy anchas (Sharma y Kumar, 2017). Por eso, resulta especialmente adecuada para producir zanahorias “baby” (Kerr, 2018).



Figura 1.3. Zanahorias (*Daucus carota*) pertenecientes a la variedad Chantenay.

1.3.2. Composición química de la zanahoria

La zanahoria (*Daucus carota*) presenta abundante agua, comprendiendo entre 86 y 89 % de su contenido. Representa una fuente rica en carbohidratos y minerales tales como calcio, fósforo, magnesio y hierro (**Tabla 1.2**).

Tabla 1.2. Composición nutricional de la zanahoria cada 100 gramos de ración comestible (adaptado de Sharma y col., 2012).

	Zanahoria
Energía (kcal)	30
Humedad (%)	88,80
Proteína (%)	0,70
Grasas (%)	0,50
Hidratos de Carbono (%)	6,00
Azúcares totales (%)	5,60
Fibra total (%)	2,40
Calcio (mg)	34,00
Hierro (mg)	0,40
Fósforo (mg)	25,00
Sodio (mg)	40,00
Potasio (mg)	240,00
Magnesio (mg)	9,00
Cobre (mg)	0,02
Zinc (mg)	0,20

Carotenos (mg)	5,33
Tiamina (mg)	0,04
Riboflavina (mg)	0,02
Equivalentes de Niacina (mg)	0,20
Vitamina C (mg)	4,00

La zanahoria es también rica en fibras (celulosa, hemicelulosa y lignina), carotenoides, vitamina C, tocoferol (vitamina E) y compuestos fenólicos como los ácidos cumárico, clorogénico y cafeico (Carunchia y col., 2015).

1.4. Ecología microbiana de frutas y vegetales

Las frutas y vegetales presentan una población microbiana nativa conocida como microflora primaria, dependiente, tanto en cantidad como en características, de varios factores como la región geográfica, la variedad, el clima zonal, los tratamientos con fertilizantes y/o pesticidas, e incluso de la estructura del producto. En oposición, la microflora secundaria consiste en aquellos microorganismos provenientes de fuentes externas a la planta, capaces de contaminar las frutas y vegetales en cualquier punto de su producción, procesamiento, distribución y comercialización.

En el caso de las naranjas, buena parte de su microflora primaria se compone de hongos causantes de deterioro pertenecientes a los géneros *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Fusarium* y *Curvularia* (Aneja y col., 2014). En particular, el deterioro del jugo de naranja se debe principalmente al desarrollo de organismos de la microflora secundaria, incluyendo hongos y levaduras tales como *Pichia*, *Candida*, *Saccharomyces* y *Rhodotorula*. Los géneros de levaduras *Saccharomyces* y *Pichia* son los principales responsables del deterioro de los jugos debido a su capacidad de generar etanol y biofilms (Bevilacqua y col., 2010). Por otro lado, las bacterias ácido-tolerantes pueden prosperar en el jugo de naranja, incluyendo las ácido-lácticas (*Lactobacillus* y *Leuconostoc* spp.), las ácido-acéticas (*Acetobacter* y *Gluconobacter* spp.), y otras tales como *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Propionibacterium cyclohexanicum*, y *Bacillus coagulans* (Bevilacqua y col., 2010). Es importante señalar que, si bien las bacterias ácido-lácticas son las principales responsables del deterioro en jugos frutales, sus recuentos se reducen notoriamente tras la pasteurización, concentración y refrigeración. En cambio, los hongos y levaduras pueden tolerar condiciones de estrés como una alta osmolaridad del medio, bajo pH, y bajas temperaturas, siendo capaces de causar el deterioro en jugos previamente procesados (Arias y col., 2002).

Por su parte, la raíz de zanahoria es altamente susceptible a la podredumbre blanda causada por bacterias tales como *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysantemi*, *Pseudomonas viridiflava*, y *Pseudomonas marginalis*, entre otras (Godfrey y Marshall, 2002). Las lesiones de la podredumbre blanda en zanahoria son de color marrón, y suaves y pegajosas al tacto. Además, las zanahorias desarrollan un olor pútrido como consecuencia de la infección bacteriana. Por otro lado, como la temperatura óptima de crecimiento para las bacterias del género *Erwinia* es de 30 °C, solamente pueden causar daño a temperatura ambiente y no son consideradas una amenaza para las cosechas de zanahoria almacenadas en refrigeración. En cambio, las bacterias del género *Pseudomonas* son capaces de proliferar a temperaturas menores, como es el caso de *P. marginalis* que es capaz de proliferar inclusive a temperaturas de 0-4 °C (Godfrey y Marshall, 2002). En el jugo de zanahoria, se ha identificado a los géneros de bacteria *Bacillus* (*B. subtilis* y *B. cereus*), *Escherichia* (*E. coli*), *Serratia*, *Staphylococcus* (*S. aureus*) y *Lactobacillus* como parte de su flora nativa (Aneja y col., 2014). Por su parte, también se hallaron levaduras de los géneros *Pichia*, *Saccharomyces* y *Rhodotorula* (Aneja y col., 2014). Adicionalmente, se detectaron mohos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, y *Geotrichum* (Tournas y col., 2006).

En las últimas tres décadas, se ha identificado a las frutas y vegetales frescos como los responsables de muchos de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos: ETAs (Scallan y col., 2011; Scharff, 2010). Estas enfermedades representan un riesgo mayor en grupos vulnerables como los infantes, las embarazadas, los ancianos y las personas inmunodeprimidas (Newman y col., 2015).

Se han reportado episodios relacionados a productos como melones, hojas verdes, tomates y brotes (Sapers y Doyle, 2014). Este hecho podría deberse a las recomendaciones de incrementar el consumo de frutas y verduras, lo cual conlleva una mayor producción y distribución de alimentos frescos. El empaquetamiento y corte de estos productos puede ser la fuente de contaminación, aunque también hay que considerar que hay regiones donde el riesgo de contaminación con patógenos humanos es alto. En alimentos procesados térmicamente (por ejemplo, pasteurizados), un tratamiento inadecuado puede no inactivar los patógenos presentes (Paramithiotis y col., 2017).

Adicionalmente, muchos de los brotes de ETAs reportados han sido asociados al consumo de jugos frutihortícolas y bebidas frescas o insuficientemente pasteurizadas, incluso aquellas de acidez elevada (Danyluk y col., 2012). A partir de la década de los 90 en adelante, se han reportado casos de brotes de ETAs vinculados a la presencia de patógenos,

entre los que se incluye a *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* y *Cryptosporidium parvum* (Vojdani y col, 2008). En específico, se han asociado 14 brotes de enfermedades en el período 1922-2010 al consumo de jugo de naranja a nivel global. De este total, 9 brotes se conectaron a jugos no pasteurizados, 4 a jugos concentrados congelados y 1 caso no fue especificado. Los patógenos identificados de los brotes de jugo de naranja no pasteurizado pertenecían principalmente del género *Salmonella* (*S. Typhimurium*, *S. Saintpaul*, *S. Enteritidis*, entre otras), pero también incluyen cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, y un posible virus (Danyluk y col., 2012).

En el caso del jugo de zanahoria, hubo un brote a escala internacional de botulismo (enfermedad causada por las toxinas de *Clostridium botulinum*) en el año 2006, afectando personas en distintas regiones de los Estados Unidos y Canadá (Sheth y col., 2008). Como es sabido, el jugo de zanahoria es un producto de baja acidez, bajo contenido de sales y de azúcares, lo cual lo hace altamente susceptible a la contaminación microbiana durante su almacenamiento. Tras la implementación de tratamientos de preservación al jugo previo a su envasado, se deberían además haber agregado compuestos preservantes (antimicrobianos, por ejemplo), sales (como sorbato de potasio) o azúcares para evitar la contaminación del producto (Sheth y col., 2008).

Estos brotes de enfermedades han colocado la lupa sobre la seguridad microbiológica de los jugos, lo cual condujo a que la U.S. Food and Drug Administration (USFDA) impulsase nuevos controles con el objetivo de reducir la incidencia de enfermedades generadas por el consumo de jugos contaminados (USFDA, 2001). Por ello, se implementó una reglamentación basada en el "Análisis de Riesgos y de Puntos Críticos de Control" (HACCP) para los jugos frutihortícolas y sus productos derivados. Dentro de los requisitos pautados por las normas HACCP, se requiere la intervención de métodos de preservación que permitan alcanzar una reducción de 5 ciclos logarítmicos de un patógeno relevante para la matriz en cuestión (Lynch y col., 2009).

Respecto de los factores que pueden llevar a la contaminación microbiana se encuentran los que se dan durante la precosecha, la cosecha y la postcosecha (etapas de procesamiento, almacenamiento, distribución y comercialización), pudiendo esta contaminación provenir de fuentes humanas, animales o ambientales (Olaimat y Holley, 2012).

Los eventos precosecha son claves en la calidad bacteriológica y la seguridad de los productos alimentarios. Las fuentes de contaminación precosecha más comunes comprenden el suelo, la presencia de heces, la presencia de pesticidas y/o herbicidas en las

tierras agrícolas, la presencia de polvo, los insectos, la presencia de animales en los terrenos, el agua de riego y el manejo por parte de los agricultores (Beuchat, 2002). Un factor relevante es la elección de tierra para la agricultura, siendo los suelos sobre los que vivió ganado o los que recibieron lodos cloacales, posibles reservorios de microorganismos causantes de ETAs (Hoagland y col., 2018). La calidad microbiológica de los suelos es también dependiente del historial de inundaciones, puesto que las aguas de inundación de zonas ganaderas podrían estar contaminadas y llegar a los cultivos agrícolas de regiones cercanas (Castro-Ibañez y col., 2015). Por lo tanto, una forma de evitar las contaminaciones de frutas y vegetales sería evitar emplear terrenos con una historia reciente de ganadería y/o inundación. Otro factor que afecta la calidad de los suelos es el tipo de riego y la calidad del agua usada, ya que las aguas de desecho pueden contaminar los productos (Uyttendaele y col., 2015).

Por otro lado, las prácticas de cosecha introducen contacto humano y mecánico con las frutas y verduras. Muchas veces, los trabajadores implicados en la cosecha pueden no tener prácticas de higiene adecuadas introduciendo así contaminantes. Otro problema es el mantenimiento y lavado incorrecto de equipos, que podría generar la producción de biofilms de bacterias patogénicas (Organización Mundial de la Salud, 2008). Por tal razón, es necesario desarrollar Buenas Prácticas de Manejo (BPM).

Adicionalmente, se puede afectar la seguridad microbiológica de los mínimamente procesados (como las frutas cortadas y envasadas) mediante pasos de manipulación y procesamiento. Estos pasos comprenden el contacto humano, la inmersión en agua, el lavado en agua con agentes desinfectantes y el corte de los productos, pudiendo generar contaminaciones con patógenos y potenciando su desarrollo (Lynch y col., 2009; Zhang y col., 2009; Danyluk y Schaffner, 2011). Nuevamente, esto puede enmendarse con facilidades adecuadas y entrenando a los trabajadores a mantener buenas condiciones de higiene.

Por último, las condiciones a las que son expuestos los productos distribuidos pueden impactar en la seguridad microbiana. La industria de transporte de productos suele ser un paso ignorado en la cadena de seguridad alimentaria, a pesar de su gran influencia sobre los productos (Gorris y col., 2005).

1.4.1. Características de los microorganismos utilizados en la tesis

Se escogieron algunos representantes de los microorganismos más relevantes responsables de contaminación en jugos frutihortícolas para su utilización en los experimentos de reto microbiano y de evaluación del daño microbiano realizado. Los

ensayos de reto microbiano involucran la inoculación intencional de un microorganismo de relevancia en un producto alimenticio, seguida de una incubación bajo condiciones ambientales específicas (Feroz y col., 2013). Es una práctica ampliamente usada en la industria, cuyo objetivo es simular lo que le podría acontecer a un alimento durante su procesamiento, distribución y comercialización.

Dentro de los representantes elegidos, se incluyó una bacteria subrogante de un patógeno típico de alimentos, perteneciente a la especie *Escherichia coli*. Las cepas bacterianas subrogantes no son patogénicas, pudiendo ser empleadas en ensayos de reto microbiano a fin de evitar las preocupaciones vinculadas al manejo de patógenos en el laboratorio (Hu y Gurtler, 2017). Una condición fundamental para el uso de cepas subrogantes en experiencias de reto microbiano es que presenten características de crecimiento y/o cinéticas de inactivación semejantes a la de las patogénicas. Además, se escogieron una levadura causante de deterioro en jugos (*Saccharomyces cerevisiae*), y una bacteria productora de biofilms (*Pseudomonas fluorescens*).

Escherichia coli es una bacteria Gram-negativa responsable de un gran número de infecciones hospitalarias y comunitarias en seres humanos. Es causante de morbilidad, mortalidad y elevados costos de salud para el sistema médico público y privado (Peirano y col., 2013), siendo una de las cepas más peligrosas *E. coli* O157:H7. La misma puede ser transmitida por medio de contacto con animales y su ambiente, por contacto directo entre personas y a través de alimentos y aguas contaminadas, si bien en un principio se la asoció solamente con alimentos contaminados (Heiman y col., 2015). *Escherichia coli* ATCC 35218 es una cepa no patogénica, que puede ser usada como subrogante de *E. coli* O157:H7 (Gurtler y col., 2010).

Saccharomyces cerevisiae es una levadura capaz de producir deterioro en bebidas frutales y vegetales, mediante reacciones de fermentación alcohólica indeseables (Niu y col., 2018). El deterioro generado por levaduras suele darse en aquellos alimentos con bajo pH, baja actividad de agua, o alta concentración de azúcares, que no son favorables para la proliferación de aquellas bacterias patógenas comunes en alimentos. Las consecuencias del deterioro por levaduras son el ablandamiento, mal sabor y olor, entre otros (Krisch y col., 2016). Dentro de las cepas de levadura con las que se contaba, se escogió a *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 ya que fue previamente usada en experimentos de reto microbiano (Schenk y col., 2011; García-Loredo y col., 2015).

Pseudomonas fluorescens es una bacteria Gram-negativa, capaz de formar biofilms sobre superficies abióticas, lo que es causa de preocupación económica severa para los

productores de alimentos a nivel global (Sillankorva y col., 2008). Estos biofilms son capaces de generar contaminaciones recalcitrantes que conduzcan al deterioro de los alimentos. La formación de un biofilm de *Pseudomonas fluorescens* es de especial preocupación para la industria de alimentos, ya que siendo un organismo psicrófilo, puede producir diversas proteasas estables al calor y lipasas a temperaturas reducidas (Myszka y col., 2016).

1.5. Métodos para la preservación de jugos frutihortícolas

En la actualidad, existe una amplia variedad de métodos tradicionales para la preservación de jugos frutihortícolas a escala industrial, que comprende el tratamiento térmico, la concentración, la deshidratación, la refrigeración, el agregado de conservantes químicos y la filtración por membranas. Adicionalmente, se están estudiando múltiples tecnologías emergentes de preservación como campos eléctricos pulsados, ozono, ultrasonido, y luz ultravioleta de onda corta (UV-C) (Rupasinghe y Yu, 2012).

Como consecuencia de la gran diversidad de tecnologías disponibles para la preservación de jugos frutihortícolas, se describirán únicamente el procesamiento térmico tradicional y aquellas tecnologías emergentes más relevantes.

1.6. Tratamiento térmico

El tratamiento térmico es el método para la preservación de jugos más usado gracias a su capacidad de inactivar microorganismos y enzimas responsables de deterioro (Buniowska y col., 2017). El tratamiento térmico de un alimento depende de distintos factores como la resistencia de los microorganismos y de las enzimas al calor, la carga microbiana inicial del alimento, su pH y su estado físico.

La inactivación microbiana provocada por el tratamiento térmico se basa en la desnaturalización irreversible de membranas, de ribosomas y de los ácidos nucleicos de las células. Sobre todo, se ha detectado una marcada disminución en la viabilidad celular generada por la aplicación de calor debido a la desnaturalización de los ribosomas (Lee y Kaletunç, 2002).

Existen distintos tratamientos térmicos para la preservación de jugos, los cuales difieren en la temperatura y tiempo de procesamiento aplicados (**Tabla 1.3**).

Tabla 1.3. Resumen de los tratamientos térmicos más usados para la preservación de jugos frutihortícolas (adaptado de Petruzzi y col., 2017.a).

Tipo de tratamiento	Temperatura-tiempo
Pasteurización a alta temperatura por tiempo prolongado (HTLT)	80-100 °C por lapsos de tiempo superiores a 30 s
Pasteurización a alta temperatura por tiempo breve (HTST)	≥ 80 °C por lapsos de tiempo ≤ 30 s
Ultra pasteurización	138 °C durante 2 s

En particular, la pasteurización se convirtió en un paso de procesamiento esencial para inactivar los patógenos en jugos y diferentes bebidas. Además, permite extender su vida útil disminuyendo la carga de microorganismos deteriorativos (Petruzzi y col., 2017.a). En el caso de los jugos frutihortícolas, se requiere que los procesos de pasteurización generen una reducción de 5 ciclos logarítmicos de los niveles de *Escherichia coli* o del patógeno relevante en el sistema bajo consideración (USFDA, 2001).

La pasteurización HTLT (del inglés, “High Temperature-Long Time”) es el método de preservación más usado en la industria para jugos y bebidas. Es capaz de inactivar microorganismos debido a que la exposición prolongada a temperaturas elevadas podría causar cambios en la fluidez y permeabilidad de la membrana plasmática (Petruzzi y col., 2017.a).

La pasteurización HTST (del inglés, “High Temperature-Short Time”) consiste en someter a los jugos a una temperatura entre 95 y 98 °C durante 15 a 30 segundos, usando equipos con intercambiadores de calor de elevada eficiencia. Gracias a esta tecnología, es posible procesar grandes volúmenes de producto continuamente, y al tratarse de un sistema cerrado, las chances de contaminación son reducidas al emplearse prácticas adecuadas de procesamiento (Char y col., 2009; 2010.a).

La ultra pasteurización (UHT) es una tecnología que utiliza temperaturas aún más elevadas que las otras tecnologías. Se somete a los jugos durante 2 segundos a 138 °C mediante un proceso térmico de flujo continuo. Posteriormente, se enfría el producto (≤5 °C) y se lo envasa de manera no aséptica en recipientes estériles y herméticamente cerrados. Gracias a la ultra pasteurización se inactivan casi todos los microorganismos, enzimas y toxinas termorresistentes generando alimentos seguros para su consumo (Miller y Silva, 2012).

Si bien el tratamiento térmico de jugos frutihortícolas puede asegurar su seguridad microbiológica y prolongar su vida útil, también puede provocar pérdidas a nivel nutricional, físico-químico, reológico y organoléptico (Chen y col., 2013; Tchuenchieu y col., 2018). Por ejemplo, se han reportado cambios en el contenido de polifenoles, carotenoides, vitaminas y otros nutrientes (Alves-Filho y col., 2018). Además, se han detectado cambios perjudiciales sobre las propiedades sensoriales de jugos como el color, el sabor, el aroma y la textura (Picouet y col., 2015). El procesamiento térmico además afecta la oxidación lipídica, la desnaturalización de proteínas, la inactivación enzimática y el pardeamiento no enzimático de las bebidas (Choudhary y Bandla, 2012).

En particular, la inactivación térmica de enzimas asociadas a cambios indeseables en el aspecto de los jugos frutihortícolas, tales como la pectinmetilesterasa, provoca una estabilización de la pulpa en suspensión y un mantenimiento de la turbidez, lo cual es un factor de calidad importante para los consumidores (Sampedro y col., 2009). No obstante, las altas temperaturas requeridas para la inactivación de enzimas resultan perjudiciales sobre las otras características de los jugos (Farnworth y col., 2001).

El daño en las propiedades sensoriales y nutricionales de los jugos procesados con los tratamientos térmicos clásicos ha generado un gran interés en aquellos métodos de preservación no térmicos, y en los que usan temperatura moderada, cuyo fin es alcanzar niveles equivalentes de inactivación microbiana y enzimática sin causar efectos adversos sobre la calidad de los jugos (Jiménez-Sánchez y col., 2017).

1.7. Tecnologías emergentes para la preservación de jugos

Para satisfacer las tendencias actuales de consumo, la industria alimenticia debe generar productos de alta calidad organoléptica, nutricional y funcional más parecidos a los naturales. Con el fin de cumplir con estas demandas, deben efectuarse modificaciones en los procesos tradicionales de conservación. Es así como surgen nuevos procesos no térmicos denominados tecnologías emergentes para la preservación de alimentos, de los que se está evaluando su capacidad para reducir la carga microbiana con el objetivo de lograr una mejor retención del sabor, textura, color y contenido nutricional del producto que los tratamientos tradicionales (Jermann y col., 2015, Guerrero y col., 2016; Guerrero y col., 2017).

Estas tecnologías novedosas son objeto de intensas investigaciones con el fin de evaluar su potencial como procesos alternativos o complementarios a los tradicionales. Entre las tecnologías emergentes que están siendo investigadas para el procesamiento de

jugos se hallan: ultrasonido (Ferrante y col., 2007; Cruz-Cansino y col., 2016), pulsos eléctricos (Carbonell-Capella y col., 2017), pulsos de luz (Muñoz y col., 2013; Ferrario y col., 2013; Ferrario y col., 2015; Ferrario y Guerrero, 2018), ozono (Torlak, 2014; García-Loredo y col., 2015), y luz ultravioleta de onda corta (Tremarin y col., 2016), entre otras.

Por otro lado, la tecnología de altas presiones hidrostáticas (HHP) ha alcanzado el estatus de emergida, siendo ampliamente usada para la pasteurización en frío de jugos y bebidas a base de frutas y vegetales a escala industrial (Gopal y col., 2017). Múltiples estudios han establecido la alta efectividad del procesamiento con HHP a la hora de inactivar microorganismos en jugos frutales y vegetales (Lavinás y col., 2008; Bermúdez-Aguirre y col., 2011; Guerrero-Beltrán y col., 2011). Adicionalmente, se han detectado cambios mínimos en la calidad de jugos vegetales procesados con HHP al compararlos con los frescos (Dede y col., 2007).

Se han realizado grandes avances en el conocimiento de dichas tecnologías en la última década, pero muchas de ellas se hallan aún bajo estudio y su aplicación industrial es todavía incierta (Rajkovic y col., 2010). Un informe de la USFDA llevó a cabo una evaluación crítica de la información científica disponible sobre las tecnologías emergentes de preservación (USFDA, 2000). En el mismo, se analizaron los factores críticos de los distintos procesos y aquellos aspectos más importantes a ser investigados para cada tecnología. Se destacaron la falta de protocolos estandarizados para la obtención de datos cinéticos confiables y el desconocimiento sobre los modos de acción de las tecnologías, incluyendo cuestiones sobre la sinergia, aditividad o antagonismo de la combinación de estos procesos alternativos entre sí o con otros factores tradicionales para la inactivación microbiana. Adicionalmente, el National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF) de los Estados Unidos estableció una serie de requisitos para generar equivalencias de varios de estos métodos alternativos con la pasteurización (NACMCF, 2006).

En particular, existen en la actualidad numerosas aplicaciones comerciales para la producción de jugos frutales y vegetales procesados por altas presiones hidrostáticas (Avomix, Suja, entre otras), la cual ya es reconocida como una tecnología emergida. En menor medida, existen estudios de investigación sobre preservación de jugos por tecnología PEF a escala comercial (Sampedro y col., 2013). En el caso de la luz ultravioleta, hay varias unidades comerciales disponibles para el procesamiento de jugos (CiderSure, Salcor, entre otras). La ventaja de las unidades comerciales Salcor por sobre las CiderSure es que, al

generar flujo turbulento, son más adecuadas para la inactivación microbiana en jugos de frutas y verduras particulados.

1.8. Luz Ultravioleta de Onda Corta (UV-C).

La mayoría de los microorganismos son susceptibles al daño por la radiación ultravioleta. La luz UV es parte de la radiación electromagnética en el rango que va de 100 a 400 nm del espectro (**Fig. 1.4**).

Por cuestiones prácticas, el espectro de UV se subdivide en cuatro regiones (Orlowska y col., 2013):

- **UV de vacío (100-200 nm):** fuertemente absorbida por el agua o el oxígeno del aire. Se absorbe en unos pocos centímetros por el oxígeno del aire y conduce a la producción de ozono (O_3).
- **UV-C (200-280 nm):** es absorbida por el ADN y ARN de los microorganismos, conduciendo a su inactivación. Es la radiación de mayor interés y más usada en el procesamiento de alimentos, debido a su efecto germicida.
- **UV-B (280-315 nm):** es la región perjudicial para el ser humano, puesto que puede causar quemaduras en la piel y daño directo al ADN celular.
- **UV-A (315-400 nm):** constituye el 98,7 % de la radiación solar que alcanza la superficie terrestre. Es capaz de provocar daño indirecto al ADN de las células.

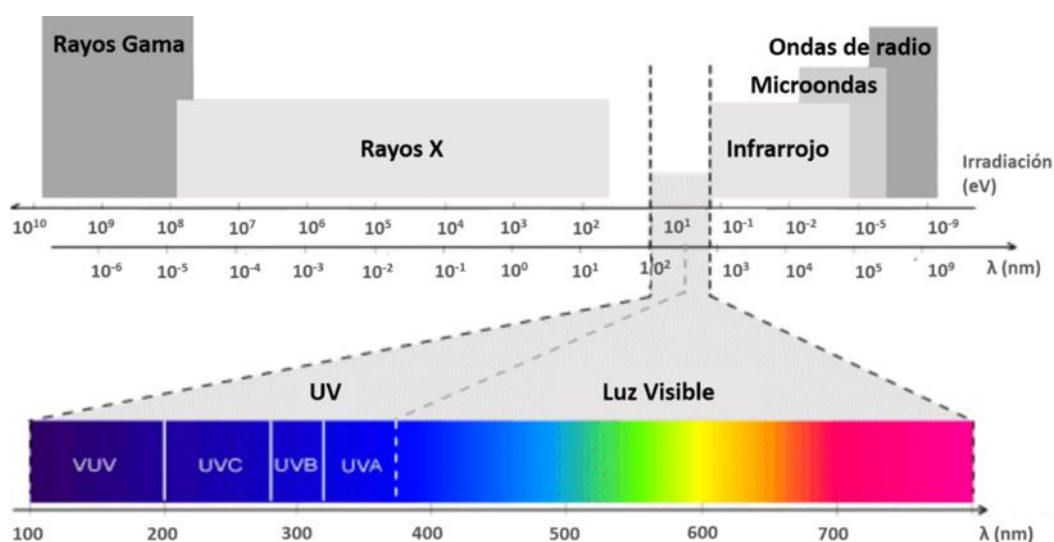


Figura 1.4. Espectro de radiación electromagnética con una división del espectro de luz visible y luz ultravioleta (adaptado de Koutchma, 2009).

1.8.1. Usos de la luz UV-C en la industria

La luz ultravioleta de onda corta es una tecnología de amplio uso en la industria alimenticia, debido a su capacidad germicida. En primer lugar, viene siendo empleada como una opción confiable a los tratamientos de cloración de aguas en Estados Unidos y Europa desde hace más de tres décadas (Orlowska y col., 2013). Por otro lado, la luz UV-C es utilizada para la esterilización de superficies, utensilios, material de empaque y aire en las industrias alimenticia, farmacéutica y en el ámbito de la salud (hospitales, consultorios, etc.).

Por otro lado, la luz UV-C ha sido empleada exitosamente, en los últimos dos décadas, como tratamiento de preservación en matrices alimentarias sólidas (Schenk y col., 2008; Char y col., 2017; Pedrós-Garrido y col., 2018) y líquidas (Alberini y col., 2015; Gopisetty y col., 2019; Saucedá-Gálvez y col., 2019). Con respecto a la preservación de alimentos líquidos, se han obtenido resultados promisorios para los tratamientos con luz UV-C para una diversidad de matrices, entre las que se encuentran: huevo líquido (Gabriel y col., 2017), leche y sus derivados (Gunter-Ward y col., 2018; Vásquez-Mazo y col., 2019), agua de coco (Ochoa-Velasco y col., 2018.a), jugos frutales (Fundo y col., 2019) y jugos vegetales (Riganakos y col., 2017).

Adicionalmente, la luz UV-C es empleada como tratamiento pre y postcosecha en verduras (Gogo y col., 2017; Martínez-Sánchez y col., 2019) y frutas (Pristijono y col., 2019) a dosis menores que las utilizadas con fines germicidas. Esta aplicación a dosis bajas genera lo que se conoce como hormesis, que consiste en la promoción de respuestas deseables en los organismos. En estos casos, se busca incrementar la producción de compuestos fitoquímicos beneficiosos para la salud, aumentar el contenido de pigmentos, estimular las defensas naturales de las plantas y mejorar la firmeza (Urban y col., 2016).

1.8.2. Efecto germicida de la luz ultravioleta de onda corta (UV-C)

Los microorganismos son inactivados por la luz UV-C principalmente como resultado del daño fotoquímico a sus ácidos nucleicos (**Fig. 1.5**). La radiación UV-C es absorbida por los nucleótidos, aquellos bloques constitutivos del ADN y ARN de la célula.

La luz UV-C promueve la formación de fotoproductos debido a la absorción directa de fotones por las bases nucleotídicas de pirimidina y purina (Gayán y col., 2014.a). Si bien ambos tipos de bases absorben fotones de luz UV-C, las pirimidinas absorben 10 veces más luz que las purinas y sus fotoproductos son los más relevantes (Kowalski, 2010). Los

mayores fotoproductos producidos por la luz UV-C son los dímeros ciclobutano pirimidina (CPDs, del inglés “cyclobutane pyrimidine dimers”) y los fotoproductos de 6-4 pirimidin-pirimidona (6-4 PP).

Los CDPs se generan cuando hay dos bases de pirimidina adyacentes y un fotón es absorbido por una de las mismas (**Fig. 1.6**). Las pirimidinas forman enlaces covalentes cuando la saturación del carbono 5 (C5) y el 6 (C6) de bases vecinas produce la formación de una estructura de anillo. Los CDPs se forman entre timinas (TT), citosinas (CC), o citosinas y timinas (CT/TC). Generalmente, los dímeros de timina son los más frecuentes (Rastogi y col., 2010).

Los 6-4 PPs se producen por el ciclado entre el enlace C5-C6 de una pirimidina y el grupo C4 carbonilo o imina (para una timina o citosina, respectivamente) de su base vecina 3'. Los productos resultantes, oxetano y azetidina, son inestables y se rearreglan rápidamente generando los fotoproductos 6-4 PP. Los 6-4 PPs son típicamente de CC y TC, siendo los de TT y CT menos frecuentes (Rastogi y col., 2010).

La proporción de fotoproductos 6-4 PP es mucho menor que la de CDPs, representando cerca de un 25 % del daño al ADN generado por la luz UV-C. Esto podría deberse a que el proceso de dimerización muestra mayor rendimiento para los CDPs. Sin embargo, es esencial resaltar que los 6-4 PPs serían más letales y mutagénicos puesto que la eficiencia de reparación de estos es menor (Mitchell y Nairn, 1989).

La formación de un número suficiente de fotoproductos dentro de un microorganismo genera distorsiones estructurales en el ADN, impidiendo su replicación y transcripción debido a la mutagénesis. Esto pone un freno a su reproducción y conduce a su muerte celular (Sanz y col., 2007).

Si bien el daño principal que causa la radiación UV-C es a nivel del ADN, también puede afectar a las proteínas mediante su oxidación alterando sus funciones básicas dentro de la célula (Schenk y col., 2011; Santos y col., 2013). Además, la luz UV-C produce daño celular por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y por la oxidación de los lípidos de membrana (Gayán y col., 2014.a).

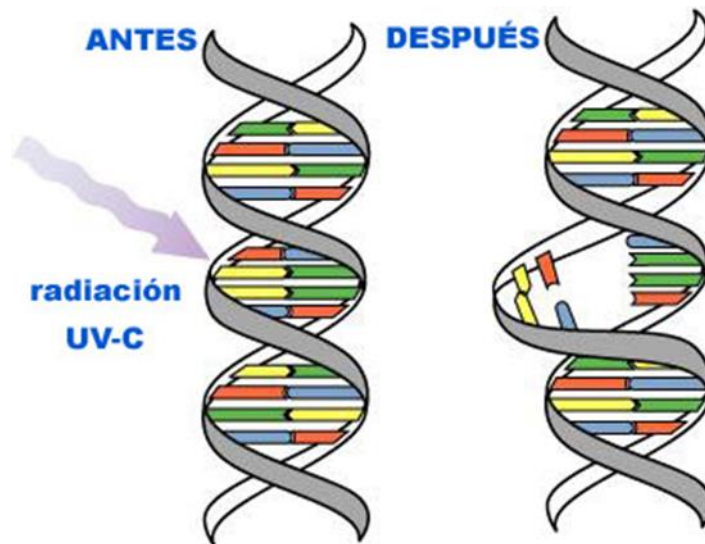


Figura 1.5. Daño al ADN provocado por la radiación UV-C mediante la generación de dímeros de timina (adaptado de Mansoori y col., 2007).

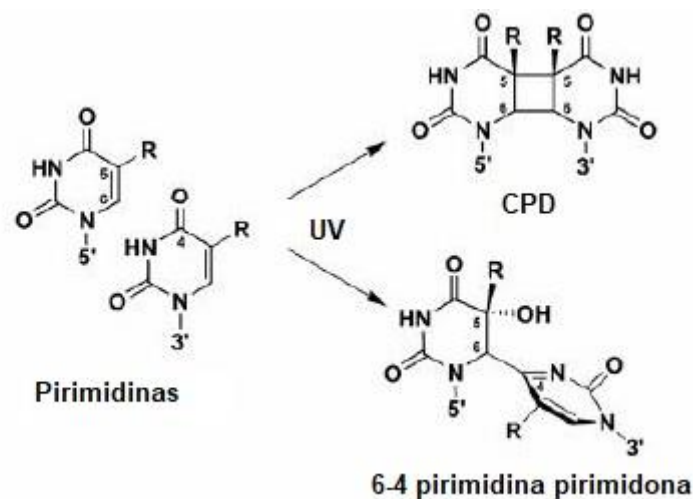


Figura 1.6. Generación de fotoproductos de pirimidina mediante la acción de la luz UV-C (adaptado de Mitchell y Nairn, 1989).

1.8.3. Susceptibilidad de los microorganismos a la luz UV-C

La susceptibilidad de los microorganismos a la luz UV-C depende de la eficacia de sus mecanismos de reparación del ADN y del grado de daño provocado (Guo y col., 2012). El daño causado al ADN también es afectado por distintos factores que pueden actuar antes, durante o después del tratamiento con luz UV-C: microbianos, ambientales y de procesamiento.

En general, la resistencia a la radiación UV-C sigue el siguiente patrón: Enterobacterias < Bacterias formadoras de esporas < Virus < Levaduras < Hongos filamentosos < Protozoos (Koutchma y col., 2009).

Tabla 1.4. Dosis de inactivación UV *D10* (mJ/cm²) determinadas a 253,7 nm para distintos grupos de microorganismos (reproducido de Koutchma y col., 2009).

Tipo de microorganismo	Dosis de UV equivalente D10 (mJ/cm ²)
Enterobacterias	2-8
Cocos y micrococos	1,5-20
Bacterias formadoras de esporas	4-30
Virus entéricos	5-30
Levaduras	2,3-8
Hongos filamentosos	30-300
Protozoos	60-120
Algas	300-600

En general, se observa que las levaduras y los hongos filamentosos son más resistentes a la inactivación por luz UV-C que las bacterias (Gabriel, 2012). Uno de los motivos posibles para explicar la mayor sensibilidad bacteriana a la luz UV-C es su menor tamaño celular (el tamaño promedio de las bacterias es de 0,2-2,0 µm; mientras que el de levaduras es de 3,0-4,0 µm) y mayor proporción de pirimidinas en el ADN, lo cual facilita la generación de dímeros y mutagénesis (Pala y Toklucu, 2013). Además, las levaduras y hongos cuentan con pigmentos que protegen de la luz ultravioleta (Anderson y col., 2000; Moliné y col., 2009).

La reparación del material genético de los microorganismos que emplea la luz es conocida como *foto-reparación*. Este mecanismo necesita de la exposición de las células a la luz visible (rango de 330-430 nm del espectro), y se da gracias a la enzima fotoliasa, la cual se activa en la zona del UV cercano o del azul-violeta de la región visible. La fotoliasa es capaz de romper los dímeros de pirimidina (o purina) formados tras la exposición a radiación ultravioleta (Hu y col., 2012). Este mecanismo de reparación debe ser considerado seriamente en el procesamiento de alimentos, ya que muchas veces los productos se envasan en material transparente, quedando expuestos a la luz visible. Debido a la existencia de la foto-reparación, los alimentos tratados con luz UV-C deben ser almacenados al abrigo de la luz y en condiciones de refrigeración.

Por otro lado, se da la reparación del material genético en oscuridad. Consiste en la capacidad de reparación del ADN de los microorganismos sin la participación de la fotoliasa. Estos procesos reparadores no son exclusivos para el daño provocado por la radiación ultravioleta y permiten evitar los eventos mutagénicos en las células (Guerrero-Beltrán y Barbosa-Cánovas, 2004).

1.8.4. Determinación de la dosis de UV-C

Cuando la luz UV-C monocromática se transmite a través de un medio absorbente líquido, la atenuación de su intensidad puede ser determinada mediante la ecuación de Lambert-Beer (**Ec. 1.1**).

$$(1.1) \quad I = I_0 \exp(\alpha * d)$$

En la cual, I es la intensidad atenuada de la luz UV-C; I_0 es la intensidad UV de la fuente monocromática incidente; d es la profundidad alcanzada por la luz UV; y α es el coeficiente de absorbancia del líquido. Distintos tipos de alimentos líquidos según la estructura de los sólidos disueltos y no disueltos tendrán diferentes capacidades de transmitir la luz UV. Mientras mayor sea el color o la turbidez del medio, menor será la luz que penetre el sistema (o su atenuación resultará mayor).

Para determinar la energía de irradiación recibida por la muestra se calcula la irradiancia y la tasa de fluencia. La irradiancia (E) se define como la energía de irradiación total proveniente de todas las direcciones incidente sobre un elemento infinitesimal de área superficial dS que contiene el punto considerado dividido por dS .

Mientras que la tasa de fluencia (E_0) es calculada como la energía de radiación total incidente que llega de todas direcciones a una esfera pequeña infinitesimal con un área de sección dA , dividido por dA .

La tasa de fluencia es más adecuada para describir la inactivación por UV-C, puesto que el microorganismo puede recibir la irradiación incidente de cualquier dirección (Bolton y Linden, 2003). Las unidades de irradiancia y de la tasa de fluencia son W/m^2 (Sistema Internacional de Unidades), aunque ambas suelen expresarse en mW/cm^2 .

El término dosis de UV es muy empleado en la literatura científica. Se conoce como dosis a la multiplicación de la irradiancia o la tasa de fluencia, si son constantes, por el tiempo de exposición a la radiación (s). En verdad, esto es la fluencia (F) o exposición radiante (J/m^2).

Es importante recalcar que la dosis de UV es un término que en otros contextos es utilizado para dar cuenta de la energía total absorbida (por ejemplo, la dosis de UV requerida para generar quemaduras en la piel humana). En los microorganismos, la mayor parte de la luz ultravioleta incidente atraviesa el organismo y sólo una fracción es absorbida (Bolton y Linden, 2003). Entonces, es más adecuado hablar en términos de fluencia, ya que la misma se vincula con la energía UV incidente en vez de la absorbida.

La determinación de la dosis de UV-C emitida por una lámpara (irradiancia) se realiza usando un radiómetro, que consiste en un dispositivo selectivo que permite aislar la parte del espectro de emisión de interés y que cuenta con un detector sensible a la luz (fotodiodo base de vacío) que convierte la energía incidente en una medida de voltaje o corriente, debiendo funcionar para el rango de 200-300 nm (Diffey, 2002). El radiómetro es un artefacto simple de usar, que permite efectuar mediciones rápidas. Sin embargo, no permite determinar la tasa de fluencia y las mediciones son afectadas por los ángulos de trabajo. Esto conlleva la subestimación de la irradiancia en la zona cercana a la lámpara UV. Los factores que pueden afectar la exactitud de las mediciones de radiometría incluyen: la calibración de la longitud de onda, la radiación residual, la polarización, la dependencia angular, la linealidad y las fuentes de calibración.

Por otro lado, la dosis de UV-C absorbida por una muestra puede cuantificarse mediante la técnica de actinometría. Esta metodología se basa en la medición de la luz UV incidente mediante una reacción fotoquímica. Para esta reacción, la cantidad de moléculas de producto formadas por fotones absorbidos está previamente establecida. La medición del rendimiento químico tras la exposición a la luz UV-C permite determinar la cantidad de fotones incidentes sobre el sistema (Bolton y Cotton, 2011). El actinómetro químico más usado en la literatura científica es el par yoduro-yodato. En este actinómetro, la fluencia UV-C es proporcional a la cantidad de iones triyoduro producidos por la reacción fotoquímica, determinados al medir la absorbancia de la solución actinométrica a 352 nm en un sistema UV-C estanco (Rahn y col., 2007). Este método actinométrico fue adaptado a un sistema de flujo continuo (Char y col., 2010.b).

El método actinométrico resulta ventajoso por su bajo costo y por no necesitar de calibraciones periódicas con respecto a un estándar. Esto se debe a que la eficiencia cuántica de los actinómetros no se modifica para un dado set de condiciones.

1.8.5. Determinación de la dosis UV-C por biodosimetría

1.8.5.a. Distribución de tiempos de residencia (DTR)

Para un material que fluye a través de un espacio volumétrico, el tiempo de residencia es una medida del tiempo que ese material pasa allí. Por ejemplo, una molécula tiene un tiempo de residencia individual, pero aquellos sistemas más complejos presentan una distribución de tiempos de residencia (Müller y col., 2014; Gayán y col., 2011).

Los tiempos de residencia pueden estimarse empleando una inyección de una solución de cloruro de sodio como marcador dentro del flujo del fluido circulante bajo condiciones de flujo estable en la entrada del equipo y midiendo el cambio de la concentración de sal en el tiempo a la salida del reactor. La curva de la distribución de la concentración de sal, $c(t)$, refleja la distribución de tiempos de residencia dentro del reactor (Koutchma y Parisi, 2004).

1.8.5.b. Introducción a la biodosimetría

La dosis de UV-C depende de múltiples factores tales como la absorción y turbidez de la matriz, el diseño del reactor, las características hidráulicas del equipo y el tiempo de residencia de la matriz líquida dentro del reactor, influyendo estos elementos sobre el tiempo de exposición a la luz ultravioleta y sobre la dosis de UV-C acumulada (Koutchma y col., 2007). En consecuencia, la multiplicidad de factores dificulta la estimación de la dosis de UV-C requerida para la inactivación microbiana.

Como ya se mencionó, existen varias herramientas que permiten obtener información distinta sobre la dosis de UV-C. Por un lado, el radiómetro permite estimar la energía emitida por la lámpara (Bolton, 2010). Por el otro, la actinometría permite obtener la energía UV-C incidente sobre la muestra (Kuhn y col., 2004). El problema con estas técnicas es que no dan cuenta de la dosis de UV-C requerida para la inactivación de un dado microorganismo en una matriz líquida determinada bajo condiciones hidráulicas (o sea, de flujo) específicas.

La biodosimetría es una metodología práctica empleada para medir la entrega de dosis de UV por parte de un reactor. El enfoque de esta metodología es biológico, ya que un producto líquido inoculado es circulado a través de un reactor. La inactivación microbiana es determinada al comparar la concentración de microorganismos viables en las muestras extraídas a partir del influjo (N_0) y del eflujo (N_F) de un reactor UV (Koutchma y col., 2009). La biodosimetría permite obtener la respuesta ante una dosis de UV-C aplicada sobre un

dado microorganismo, aportando de este modo información sobre cómo la dosis de UV-C es absorbida dentro de la matriz líquida (Müller y col. 2014).

La técnica de biosimetría permite estimar la dosis de UV equivalente, conocida como *D10*, que es la dosis requerida para inactivar en un orden a la población microbiana presente en la muestra (Koutchma y col., 2009).

El procedimiento de medición comienza con la determinación de la curva de supervivencia (o de inactivación) del microbio escogido (curva de calibración) que son empleados como biosímetros (Koutchma y col., 2009). A continuación, los microorganismos son inoculados y mezclados dentro del reactor UV-C, determinando su concentración al inicio y al término del procesamiento con luz UV. La tasa de supervivencia obtenida junto a la curva de calibración se emplea para calcular la dosis de UV-C aplicada.

La dosis equivalente de UV-C dentro de un reactor depende de la magnitud de la dosis acumulada o absorbida, que es el producto de la distribución de la irradiancia lumínica (DIL) y el tiempo de exposición o distribución de tiempos de residencia (DTR) (Jenny y col., 2014).

El patrón de flujo dentro de un reactor UV influye severamente sobre la dosis total dado que la posición y el tiempo de residencia de los microorganismos en ciertas zonas del campo de irradiación puede variar significativamente. Otro motivo importante para determinar las características de flujo de los reactores es para conocer el comportamiento de mezclado del fluido, y como esto puede afectar la inactivación microbiana. La magnitud del gradiente de irradiación entre la superficie de la lámpara y la pared del reactor depende de la transmisión de la luz UV-C a través del fluido a tratar. Por tal razón, es necesario comprender la transmisión de UV en un líquido con alta absorptividad para poder determinar la eficiencia de la inactivación microbiana. Dado que existe una distribución de la fluencia UV en el medio, hay una distribución de dosis a la cual cualquier microorganismo estará expuesto durante el procesamiento UV-C (Koutchma y Parisi, 2004).

1.8.6. Fuentes de luz UV-C comercialmente disponibles

El éxito del procesamiento UV-C de alimentos depende de escoger la fuente de luz UV adecuada según los requerimientos de la aplicación. La fuente UV adecuada puede incrementar la eficiencia de la inactivación al aumentar la penetración UV en el líquido. Otra alternativa es hacer uso de fuentes pulsadas de luz UV, las cuales emiten radiación de mayor intensidad.

Las lámparas más utilizadas en la industria son las de arco de mercurio de baja y mediana presión (**Fig. 1.7.a**) (Masschelein y Rice, 2016). Estas lámparas resultan fuentes confiables para la mayoría de los tratamientos de desinfección debido a su buena performance, bajo costo y buena calidad.

La lámpara de arco de mercurio (**Fig. 1.7.b**) consiste en un tubo de sílice vítreo conteniendo transmisores de UV, herméticamente cerrado y presentando electrodos en sus dos extremos. Este tubo es llenado con mercurio y un gas inerte, frecuentemente argón. Por otro lado, los electrodos están integrados por tungsteno junto a una mezcla de metales de alcalinos con el fin de formar el arco en el interior de la lámpara. La descarga de gas se consigue por medio de la aplicación de un voltaje elevado a través de los electrodos. La luz UV es emitida cuando el vapor de mercurio, que se excitó por la descarga, vuelve a su nivel de energía basal. El argón sirve para encender la lámpara, prolongar la vida útil del electrodo, y disminuir las pérdidas térmicas, si bien no contribuye per se a la emisión de luz UV (Koutchma, 2009).



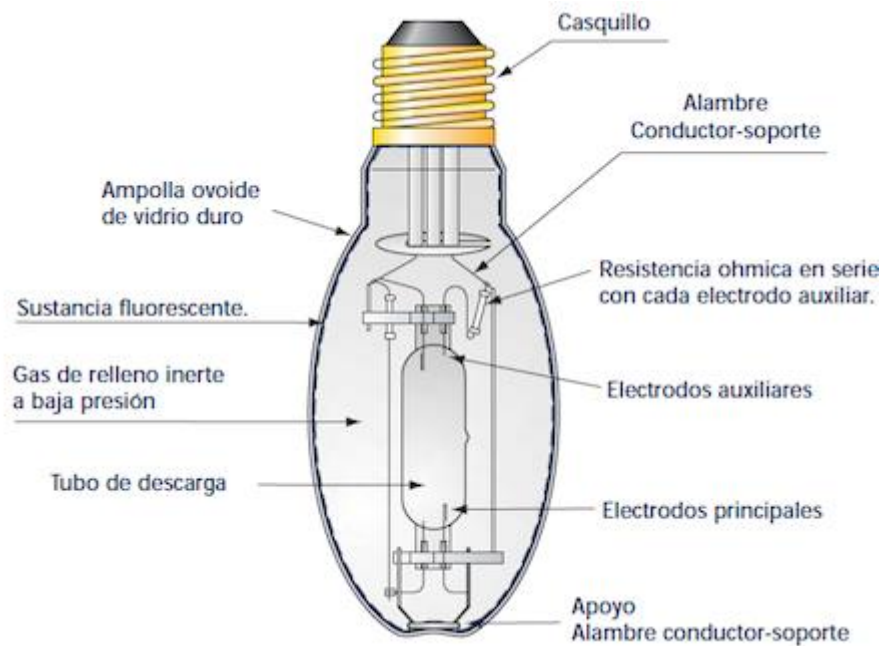


Figura 1.7. (a) Lámparas de luz UV-C; **(b)** Componentes de una lámpara de arco de mercurio (adaptado de Gupta y Agarwal, 2017).

1.8.7. Aplicación de la luz UV-C para la preservación de alimentos

Si bien la luz ultravioleta de onda corta (UV-C) es ampliamente usada para la descontaminación de agua, aire y superficies, la industria alimenticia se ha interesado recientemente en su aplicación para la inactivación microbiana (Cebrián y col., 2016). Múltiples estudios dan cuenta de que, mediante la aplicación de esta tecnología, se pueden obtener productos seguros con mínimos cambios en sus atributos sensoriales y nutricionales.

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, a través del National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF), ha concluido que el uso de luz UV-C para el procesamiento de alimentos es seguro, aprobando su uso como un aditivo, siendo una alternativa no térmica para la inactivación de patógenos y microorganismos deteriorativos en agua y jugos claros (NACMCF, 2006). El criterio definido por la USDA para aprobar el tratamiento con luz UV-C de una matriz líquida es la reducción en 5 ciclos logarítmicos de un patógeno relevante.

Dentro de los factores considerados como críticos para un tratamiento UV-C eficiente se incluyen las propiedades de absorptividad del alimento líquido, la configuración geométrica del reactor, el arreglo físico de las fuentes de luz UV-C, entre otros (Koutchma, 2009). Asimismo, la aplicación de la irradiación UV-C se encuentra limitada a aquellos jugos frutales y vegetales claros, puesto que la alta cantidad de compuestos coloreados y

partículas en suspensión y disueltas presentes en muchos jugos frutihortícolas, dificulta su penetración en el medio líquido (Kaya y Unluturk, 2019).

1.8.8. Ventajas y limitaciones del uso de luz UV-C

El procesamiento con luz UV-C presenta múltiples ventajas como su efectividad para la inactivación de microorganismos patógenos y deteriorativos, su imagen positiva ante los consumidores y su menor costo de implementación en comparación con otras tecnologías emergentes como campos eléctricos pulsados (Lavilla y Gayán, 2018). También resulta una tecnología limpia ya que no genera contaminantes, ni radioactividad residual. Además, no requiere de un elevado gasto energético para su aplicación y es de bajo costo de instalación y de fácil intercalación en línea (Rodríguez-González y col., 2015).

Otra de sus ventajas es que al ser un procesamiento no térmico (dado que se realiza a bajas temperaturas), no conlleva las pérdidas de color, aromas y nutrientes asociadas a los jugos frutihortícolas procesados térmicamente (Gopisetty y col., 2018).

Respecto a las limitaciones de la luz UV-C, hay que considerar que la inactivación microbiana depende de factores como la dosis empleada, la configuración geométrica del reactor, la potencia eléctrica del equipo, el arreglo espacial de las lámparas UV, la longitud del camino recorrida por la luz UV-C, y la composición y transmitancia de la matriz líquida (Shah y col., 2016).

Es importante señalar que la luz UV-C presenta menor penetración en matrices opacas y/o conteniendo sólidos disueltos o en suspensión (Antonio-Gutiérrez y col., 2019.a). La baja transmitancia UV-C puede deberse a una elevada concentración microbiana inicial, la presencia de partículas y/o a un intenso color de la matriz alimentaria (Franz y col., 2009). Las partículas presentes en los jugos serían las responsables, en buena medida, de disminuir el proceso de desinfección debido a la reducción en la transmisión de la luz junto al hecho de que actúan como escudo de los microorganismos, evitando que la radiación UV-C los alcance (Gayán y col., 2013.a). Además, se debe considerar la posible reparación de los efectos germicidas del UV-C en los microorganismos mediante los mecanismos ya mencionados.

Para lograr un proceso de pasteurización por luz UV-C exitoso, resulta clave entender cómo la luz UV-C absorbida es afectada por factores como el coeficiente de absorción de la matriz líquida, la interferencia generada por las partículas, por los sólidos solubles y en suspensión (Shah y col., 2016). Factores como la composición de la bebida, su contenido de sólidos, su color y características químicas influyen sobre su coeficiente de

absorción, en consecuencia, afectando la efectividad de la inactivación por UV (Mansor y col., 2014). Para jugos frutihortícolas con distinta turbidez, sólidos solubles totales y niveles de pH junto a diferentes viscosidades, deben aplicarse distintas estrategias para lograr un tratamiento UV-C efectivo. Los sólidos en suspensión no solo atenúan la dosis de UV-C por dispersión de la radiación, sino que también brindan un sitio para la agregación de los microorganismos a las partículas del jugo (Koutchma, 2009).

Por los motivos expuestos, la luz UV-C resulta adecuada para el tratamiento de bebidas claras, pero no tanto para el de bebidas turbias (Kaya y Unluturk, 2016). Para el tratamiento de estas últimas, debería combinarse el uso de luz UV-C junto a otras tecnologías preservantes para conseguir los mejores resultados en términos de reducción microbiana y retención de la calidad nutricional y sensorial (Caminiti y col., 2012; Gayán y col., 2014.b; Ochoa-Velasco y col., 2018.a).

En lo que concierne a la calidad de los jugos frutales procesados con UV-C, los mismos se podrían ver afectados negativamente en sus contenidos de vitamina C, vitamina A y fructosa (Shah y col., 2016). También se ha señalado que las vitaminas B2, B12, D, E, K, los carotenos, el ácido fólico, el triptófano y los ácidos grasos no saturados son sensibles a la luz y pueden degradarse si son expuestos a la luz UV-C (Spikes, 1981). Por otro lado, los pigmentos presentes en frutas y verduras pueden ser sensibles a la luz UV-C (Falguera y col., 2011).

Con respecto a la evaluación sensorial de aquellos jugos tratados con luz UV-C, no suelen diferir respecto de los mismos jugos frescos, pero resultan muy distintos a aquellos procesados con calor. Sin embargo, en algunos estudios se han reportado aromas y sabores indeseables para aquellos jugos procesados con UV-C (Pala y Toklucu, 2011; Halim y col., 2012).

1.8.9. Diseño de reactores UV-C y equipos disponibles a escala industrial

Dado el interés por la tecnología de luz UV-C, es clave diseñar reactores adecuadamente para mitigar los efectos de la absorbancia UV-C y la viscosidad de alimentos líquidos, y para mejorar los niveles de inactivación microbiana. Un buen diseño de reactores permitiría que cada elemento del líquido residiese en el reactor por el mismo lapso y que todos los microorganismos recibieran una dosis de UV equivalente (si la irradiancia UV fuese igual en todos los puntos).

El costo estimado de un reactor UV-C de escala industrial se halla entre los 10000 y 15000 dólares americanos, en comparación con los costos más elevados de los equipos de

pasteurización térmica que están en los 20000-30000 dólares (Shah y col., 2016). Además, los costos de energía por procesamiento con UV-C son menores que los del procesamiento térmico.

En la actualidad, hay una amplia gama de equipos UV-C estáticos y de flujo continuo que han sido validados para tratar desde jugos tropicales hasta productos más comunes como el jugo y la sidra de manzana. Existen 3 tipos de reactores de tipo continuo en base al flujo generado en su interior: de flujo laminar, de flujo turbulento y de flujo de Dean (Koutchma, 2009).

Los reactores de flujo laminar son aquellos que se caracterizan por presentar un número de Reynolds, Re_h , menor a 2000. En los mismos, el fluido circula por una fina lámina en contacto con las lámparas UV-C con el fin de disminuir los problemas asociados a la falta de penetración UV. Estos reactores de lámina fina se caracterizan por su flujo laminar con un perfil de velocidades parabólicas (**Fig. 1.8**). La máxima velocidad del líquido en circulación es detectada en el centro, siendo del doble que la promedio (Koutchma y col., 2009). En un reactor UV laminar, los microorganismos no son todos introducidos al mismo tiempo, ni lo abandonan al mismo tiempo debido a la diferencia en velocidades dentro del reactor, por lo que no todos reciben la misma dosis UV (procesamiento no uniforme). Dentro de este tipo de reactores, se incluyen las unidades comerciales CiderSure y el reactor de flujo de Taylor-Couette. Éste último es una modificación de un equipo anular de flujo laminar que genera vórtices de líquido a fin de mejorar la exposición a la luz UV-C (Forney y col., 2004).

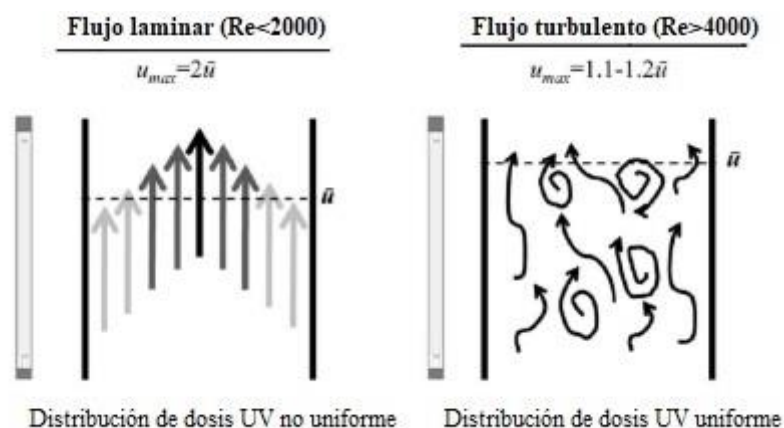


Figura 1.8. Patrones de flujo en reactores de luz UV-C (adaptado de Koutchma y col., 2009).

Los reactores de flujo turbulento se basan en aumentar la turbulencia interna para aproximar a todos los elementos del líquido a la luz UV-C durante el procesamiento,

presentando valores de Re_h superiores a 4000. Las tasas de flujo más altas alcanzadas generan mayor homogeneidad del flujo cuando la partícula que se mueve más rápido va 1,1-1,2 veces más rápido que la partícula promedio en volumen, y teóricamente, cada elemento de volumen del alimento líquido a tratar sería expuesto a la radiación UV. Pero al aumentar la turbulencia, cae la presión a través del reactor, y la mayor tasa de flujo necesaria para asegurar la turbulencia se aparea con un tiempo de residencia del fluido menor (Koutchma y col., 2009). Este hecho podría traer complicaciones en el escalado de los procesos. Las unidades comerciales Aquionics y PureUV presentan este tipo de flujo.

Los reactores del tipo de flujo de Dean presentan un tubo helicoidal en contacto con lámparas por dentro y fuera de la hélice, lo que incrementa la irradiancia UV del líquido a tratar y la uniformidad en el procesamiento. El tubo helicoidal promueve la generación de turbulencia y de un efecto de flujo secundario llamado efecto de Dean, que resulta en una velocidad de circulación y un distribución de tiempos de residencia más uniformes. Las unidades comerciales para el procesamiento UV-C de líquidos conocidas como Salcor operan empleando el flujo de Dean.

1.9. Tecnología combinada de obstáculos de preservación de alimentos

En las últimas dos décadas, la demanda de los consumidores por alimentos de mayor calidad y microbiológicamente seguros ha provocado un gran interés en aquellas tecnologías de preservación de alimentos emergentes y no térmicas capaces de inactivar microorganismos y enzimas. En estas tecnologías, las temperaturas empleadas son menores que las usadas por el procesamiento térmico por lo que se esperan mínimos cambios en la calidad de los productos. Además de mantener la calidad, las tecnologías emergentes deben generar niveles de inactivación equivalentes o mayores a las térmicas tradicionales (Raso y Barbosa-Cánovas, 2003; Guerrero y col., 2017).

Un inconveniente de las tecnologías no térmicas de preservación es que no siempre logran inactivar enzimas y/o esporas bacterianas y fúngicas. Con el fin de ampliar el uso de estas tecnologías emergentes en la industria, se ha venido investigando, durante las últimas tres décadas, su aplicación en combinación entre sí o junto con las tradicionales (Pinela y Ferreira, 2017).

Este enfoque de combinación de métodos de preservación de alimentos se conoce como tecnología combinada de obstáculos (“hurdle technology”, en inglés). Bajo esta perspectiva, se aplican sucesiva o simultáneamente varios tratamientos individuales (Khan y col, 2017). Los tratamientos combinados resultan convenientes, sobre todo porque los

tratamientos individuales no son lo suficientemente buenos para asegurar la seguridad y estabilidad alimentaria. Además, en algunos casos los tratamientos combinados permiten hacer una aplicación más suave de los individuales, lo cual mejora la calidad de los productos.

El efecto total de preservación usando combinaciones de tecnologías puede resultar indistinto o aditivo, pero en términos de seguridad alimentaria se persiguen efectos de tipo sinérgicos (Berdejo y col., 2019). Sin embargo, podrían darse efectos adversos indeseables por la combinación conocidos como antagónicos.

Para la tecnología de preservación de alimentos, el efecto sinérgico se da cuando dos o más métodos (obstáculos) son aplicados simultánea y/o sucesivamente, lográndose un efecto germicida mayor que el obtenido por los métodos de preservación individualmente (Singh y Shalini, 2016). Si bien muchos de los esfuerzos por lograr efectos sinérgicos se han enfocado a la combinación de varias tecnologías emergentes de preservación, la mayoría de los sinergismos se dan cuando se combina una tecnología emergente junto a la aplicación de temperaturas moderadas (Alzamora y col., 2005; Alzamora y col., 2016.a, b; Berdejo y col., 2019).

La combinación de los métodos emergentes de preservación junto a otras tecnologías emergentes o tradicionales puede resultar en: **(1)** un incremento en los niveles de inactivación microbiana; **(2)** una merma en la severidad de los tratamientos no térmicos necesaria para lograr un dado nivel de inactivación; y **(3)** la prevención de la proliferación de individuos resistentes tras el procesamiento (Raso y Barbosa-Cánovas, 2003; Alzamora y col., 2016.a, b).

Dentro de los casos de combinaciones efectivas de tecnologías emergentes de preservación de derivados frutales, podemos mencionar la combinación de ultrasonido con luz pulsada para el tratamiento de jugo de manzana (Ferrario y col., 2015), la aplicación de luz ultravioleta y peróxido de hidrógeno para la inactivación microbiana en rodajas de pera (Schenk y col., 2012), el uso de luz ultravioleta con calentamiento óhmico para inactivar patógenos en jugo de tomate (Kim y col., 2019), entre otras.

1.10. Evaluación de riesgo microbiano mediante microbiología predictiva

La evaluación del riesgo microbiano es un paso clave en referencia a la seguridad alimentaria (Alzamora y col., 2005; Tenenhaus-Ariza y Ellouze, 2015).

La disciplina de la microbiología predictiva emplea modelos matemáticos para predecir el crecimiento, la supervivencia y la respuesta de inactivación de distintos microorganismos sujetos a distintas condiciones ambientales y de procesamiento (Alzamora y col., 2010; Lianou y col., 2016). Los modelos predictivos consisten en ecuaciones que permiten la información del crecimiento o inactivación de microorganismos sujetos a distintas condiciones como pH, calor, actividad de agua, etc. A partir de los datos generados, se puede predecir, mediante diferentes modelos matemáticos, la respuesta de crecimiento o de inactivación bajo condiciones no evaluadas específicamente por las experiencias originales (Petruzzi y col., 2017.b). La microbiología predictiva puede ser aplicada para evaluar los efectos del procesamiento, composición, condiciones de almacenado y otros factores sobre la tasa de contaminación final de un alimento al momento de ser consumido.

La aplicación de diversas tecnologías, emergentes y/o tradicionales, para la preservación de alimentos trae aparejada la necesidad de contar con datos científicos sobre la respuesta microbiana a fin de optimizar los procesos (Alzamora y col., 2010). En específico, los modelos predictivos y sus parámetros derivados son relevantes para diseñar tratamientos de preservación microbiológicamente seguros (McMeekin, 2007). Los parámetros provenientes de los modelos predictivos permiten comparar la eficiencia de distintos tratamientos para reducir la carga microbiana de los alimentos.

Una adecuada predicción de las curvas de inactivación por parte de los modelos es de gran utilidad para la industria alimentaria a la hora de escoger las combinaciones óptimas de agentes letales, condiciones ambientales y tiempos de procesamiento a fines de obtener los niveles de inactivación requeridos junto a bajos costos de producción y una retención de la calidad nutricional y sensorial de los alimentos. En consecuencia, la microbiología predictiva brinda las herramientas para comparar la influencia de distintos factores sobre las reducciones microbianas alcanzadas. Además, permite entender el comportamiento de los sistemas alimenticios, generando modelos capaces de explicar la conducta microbiana desde una perspectiva molecular y celular (Alzamora y col., 2010).

La existencia de una herramienta cuantitativa para predecir la inactivación o el crecimiento microbiano es de gran utilidad para los sistemas de Análisis de Riesgo por Puntos de Control Críticos (HACCP). Este sistema es reconocido por muchas instituciones públicas y probablemente sea incorporado a la estandarización de las prácticas de control de la calidad alimentaria internacionales (Baron y Brule, 2016; Guerrero y col., 2017).

1.10.1. Clasificación de los modelos predictivos

Los modelos microbiológicos predictivos suelen clasificarse en modelos de crecimiento o de inactivación/supervivencia. Dentro de ambas categorías, se distinguen los modelos de tipo primario, secundario y terciario.

Los modelos primarios son aquellos que exponen modificaciones en la conducta microbiana en un dado ambiente de acuerdo con el tiempo. El modelo puede expresarse en términos de las unidades formadoras de colonias (UFC) por mL o gramo, o de la producción o degradación de un compuesto (determinaciones directas del crecimiento) o en términos de densidad óptica (determinaciones indirectas del crecimiento). Al obtener la curva de crecimiento o de inactivación microbiana, se aplica una función matemática para dar cuenta del cambio en la respuesta en función del tiempo. Típicamente, se distinguen cuatro tipos de curvas de inactivación para los tratamientos térmicos y no térmicos: curvas lineales (cinética de primer orden), curvas con una fase lag inicial u hombro, curvas con una cola y curvas sigmoideas conteniendo hombro y cola (Alzamora y col., 2010).

Es importante recalcar que existen dos perspectivas diferentes respecto para dar explicar la inactivación microbiana:

- ❖ **Mecanística:** la inactivación se da mediante mecanismos de tipo molecular o físicos (por ejemplo, una reacción enzimática). Esta perspectiva es de tipo determinista y asume que todas las células se comportan del mismo modo y que la muerte de una célula individual se debe a un evento letal individual.

- ❖ **Vitalística:** este enfoque asume que los microorganismos individuales en una población no poseen iguales resistencias y que la sensibilidad a los agentes letales presenta una distribución variable. La ocurrencia de hombros y colas se debería a las reacciones fisiológicas de los microbios a las condiciones letales.

El modelo primario más empleado es el log-lineal, que corresponde a procesos de inactivación microbiana que se ajustan adecuadamente a una cinética de primer orden (**Fig. 1.9**). Este modelo asume que todas las células o esporas microbianas presentan la misma resistencia a un agente letal, por lo que cada microorganismo posee la misma probabilidad de morir (Van Boekel, 2002). El modelo log-lineal ha sido empleado con éxito para describir la inactivación provocada por tratamientos de preservación térmicos y no térmicos (Bhullar y col., 2018).

Si N_0 es el número inicial de microorganismos de una muestra y $N(t)$ el número transcurrido un dado tiempo, t , de tratamiento, entonces se puede obtener la tasa de inactivación bajo condiciones constantes de procesamiento (**Ec. 1.2**).

$$(1.2) \quad \frac{dN(t)}{dt} = -k'(T)N(t)$$

Siendo $k'(T)$ una tasa de tipo exponencial dependiente de la temperatura. Al integrar y transformar la **Ec. 1.2** a un logaritmo de base diez, es posible calcular el tiempo de reducción decimal, D (**Ec. 1.3**).

$$(1.3) \quad \text{Log} \left(\frac{N_0}{N(t)} \right) = \frac{t}{D(T)}$$

Siendo N_0 el número inicial de microorganismos, N el número de microorganismos a un tiempo t , mientras que $D(T)=2,303/k(T)$ es el recíproco de la constante k dependiente de la temperatura (**Ec. 1.2**).

El valor de D da cuenta del tiempo, comúnmente expresado en minutos, necesario para reducir una población microbiana en un factor de 10. Este valor es considerado como una medida de la resistencia de un microorganismo al tratamiento letal aplicado en un determinado medio (Peleg, 2006).

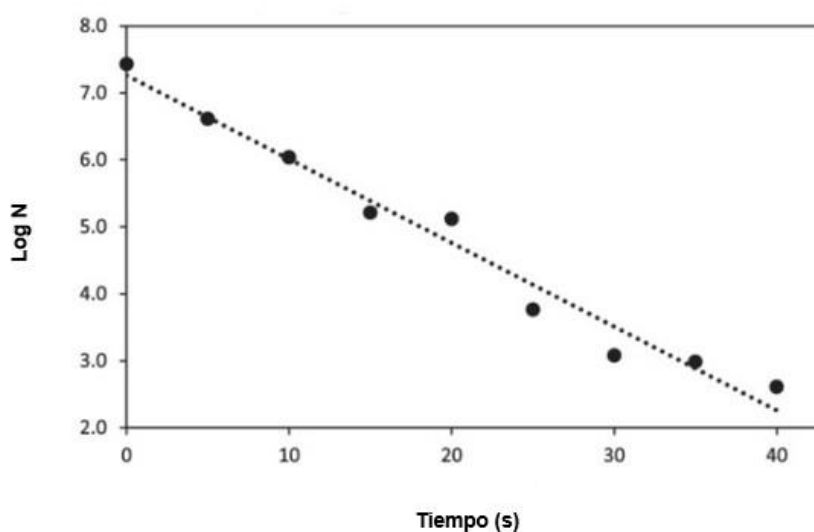


Figura 1.9. Ejemplo de curva de inactivación log-lineal para *Salmonella Typhimurium* tratada térmicamente a 58 °C en caldo acidificado a pH=4,5 (reproducido de Dufort y col., 2017).

Si bien el modelo log-lineal es ampliamente utilizado, muchos procesos de inactivación no obedecen una cinética de primer orden (Peleg, 2006). El hecho de tratar de ajustar una curva de inactivación semilogarítmica cóncava hacia arriba o hacia abajo a una

recta, puede conducir a una sobre o subestimación -respectivamente- de la resistencia del microorganismo a un tratamiento y, en consecuencia, resultar en el sobreprocesamiento o subprocesamiento de los alimentos. Por tal motivo, ha surgido una amplia variedad de modelos para describir curvas de inactivación no lineales y se ha impuesto el uso del número de reducciones logarítmicas alcanzadas, en vez del valor D clásico, para dar cuenta de la performance de los procesos de preservación de alimentos (Alzamora y col., 2010).

Dentro de los modelos primarios no lineales, el modelo derivado de la función de distribución de Weibull considera la variación biológica y es empleada para describir el espectro de resistencias de la población microbiana a un agente letal bajo distintas condiciones (Peleg y Cole, 1998). Este modelo resulta simple de aplicar y presenta la ventaja de poder modelar aquellas curvas de inactivación lineales y las que poseen hombro o cola (Mafart y col., 2002).

A diferencia del modelo log-lineal, el modelo de Weibull considera que un evento letal es probabilístico, en vez de determinístico. El mecanismo de inactivación puede diferir de célula a célula, por lo que es improbable que todas las células pertenecientes a una población se porten igual, siendo entonces de perspectiva vitalística. En consecuencia, existe una distribución de tiempos de inactivación y la curva generada no debe ser pensada en términos cinéticos sino como la forma acumulativa de la distribución temporal de eventos letales (Peleg, 2006). Si cada organismo de la población es inactivado a un determinado tiempo (t_{ci}) y se considera que t_{ci} presenta una distribución continua, la fracción de sobrevivientes (**Ec. 1.4**), conocida como $S(t)$, puede expresarse como:

$$(1.4) \quad S(t) = \int_0^1 f[t, t_c(\phi)] d\phi$$

En la que t_c es el tiempo de muerte del microorganismo, $S(t)$ es el cociente entre el número de células a un tiempo t y el número de células inicial: N/N_0 , mientras que $f[t, t_c(\phi)]$ es una función del tiempo de exposición t y la fracción de microorganismos ϕ que comparten un mismo t_c .

Si se asume que t_c presenta una distribución weibulliana, se obtiene la siguiente expresión (**Ec. 1.5**):

$$(1.5) \quad \frac{d\phi}{dt_c} = bnt_c^{n-1} \exp(-b't_c^n)$$

A partir de la **Ec. 1.5**, es posible determinar la forma acumulativa de la distribución de Weibull (**Ec. 1.6**).

$$(1.6) \quad S(t) = \left(\frac{N}{N_0} \right) = \exp(-b't^n)$$

Al transformar la ecuación de la forma cumulativa (**Ec. 1.6**) a un logaritmo de base 10, se obtiene la variante más utilizada del modelo de Weibull (**Ec. 1.7**).

$$(1.7) \quad \text{Log } S(t) = \text{Log} \left(\frac{N}{N_0} \right) = -bt^n$$

En la que el parámetro conocido como b resulta equivalente a $b=b'/\log_e 10$. El modelo de Weibull posee dos parámetros: el parámetro de escala b (de dimensiones: tiempo^{-n}), y el parámetro de forma adimensional n , que indican la inclinación total y la forma de las curvas, respectivamente. Las curvas de inactivación pueden ajustarse empleando la variante logarítmica del modelo (**Ec. 1.7**), obteniendo los parámetros weibullianos n y b para las distintas condiciones experimentales (**Fig. 1.10**).

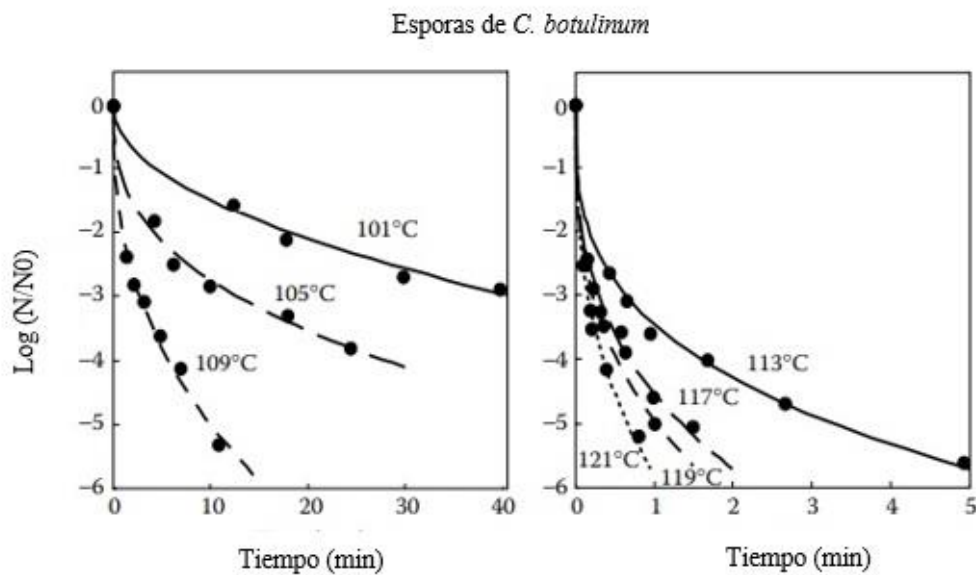


Figura 1.10. Ejemplo de un ajuste de curvas de supervivencia al modelo de Weibull para datos de inactivación de esporas de *Clostridium botulinum* procesadas térmicamente (reproducido de Peleg, 2006).

De acuerdo con el modelo de Weibull, el gráfico del logaritmo de $S(t)$ posee concavidad hacia abajo para valores de $n > 1$ y concavidad hacia arriba para $n < 1$, mientras que si $n = 1$ la curva de inactivación es lineal y la distribución weibulliana se reduce a una exponencial (Hilton y col., 2017). Un coeficiente de sesgo mayor a uno indica un sesgo a la derecha, mientras que uno menor a uno a la izquierda. Una distribución con un sesgo igual a uno resulta simétrica (Alberini y col., 2015).

A pesar de que el modelo de Weibull es de tipo empírico, es posible establecer un nexo con los cambios fisiológicos implicados en el proceso de inactivación mediante la interpretación de la concavidad de las curvas obtenidas (Van Boekel, 2002). En el caso de que $n < 1$, eso significa que las células remanentes presentarían una menor probabilidad de morir o que serían capaces de adaptarse al estrés del medio. Si $n > 1$, se estaría dando un daño de carácter acumulativo y las células remanentes se tornarían crecientemente más sensibles al procesamiento. Para el caso de que $n = 1$, la probabilidad de muerte no dependería del tiempo de tratamiento. Resulta interesante señalar que existe la chance de que ambos tipos de eventos de inactivación, con daño acumulativo y con generación de supervivientes robustos, se den al mismo tiempo (Peleg, 2006). Si ambos tipos de eventos se diesen de modo balanceado, las curvas de inactivación resultarían lineales. Mientras que, si primero predomina una clase de evento y después la otra, se obtendrían curvas de inactivación sigmoideas.

Otro modelo primario ampliamente utilizado es el de Gompertz modificado, aplicado para la caracterización de curvas de crecimiento o de inactivación microbianas no lineales (Chatterjee y col., 2015). La siguiente versión de la ecuación de Gompertz (**Ec. 1.8**) es empleada para modelar curvas de inactivación microbiana:

$$(1.8) \quad \text{Log} \left(\frac{N}{N_0} \right) = C \times e^{-e(A+B \times t)} - C \times e^{-e(A)}$$

En la cual, $\text{Log}(N/N_0)$ corresponde a la fracción logarítmica de microorganismos sobrevivientes, mientras que los tres parámetros estimados (A , B y C) representan las distintas zonas de la curva de inactivación: **(i)** A representa el hombro inicial [min]; **(ii)** B corresponde a la tasa máxima de muerte [min^{-1}]; y **(iii)** C representa el cambio total en el número de sobrevivientes (-).

El modelo de Gompertz resulta particularmente útil para describir curvas de inactivación sigmoideas, caracterizadas por presentar una fase lag u hombro, una fase de inactivación exponencial y una fase final asintótica o cola (**Fig. 1.11**) (Hossain y col., 2019). El modelo también resulta adecuado para describir aquellas curvas con hombro o cola. Una característica relevante del modelo de Gompertz es la propiedad de que la probabilidad de supervivencia de las células no se torne igual a cero cuando el tiempo se aproxima a infinito (Juneja y Marks, 2003).

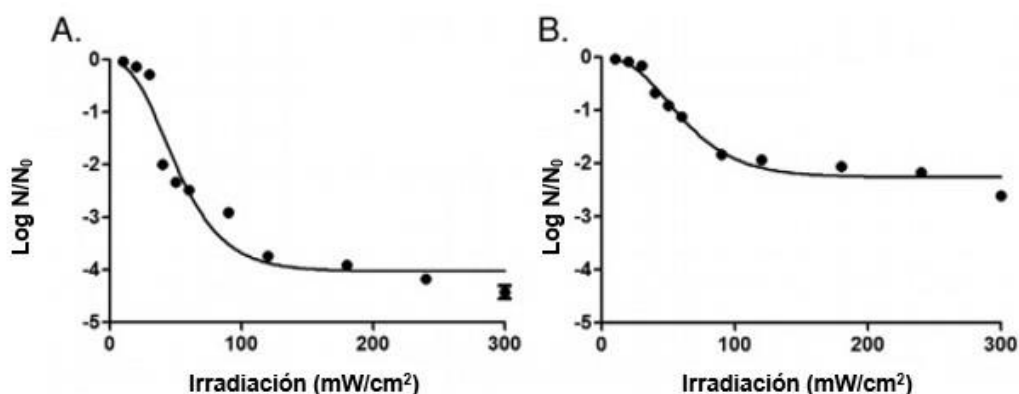


Figura 1.11. Curvas ajustadas según el modelo de Gompertz para la inactivación UV-C de los virus MNV-1 (A) y HAV (B) presentes sobre una superficie de acero inoxidable (0-300 mW/cm²) (reproducido de Park y col., 2015).

Es menester aclarar que el modelo de Gompertz no cuenta con la validación necesaria para generar una explicación biológica de sus parámetros. Esto es debido al hecho de que al no ser de tipo mecanístico, no considera aquellas variables intrínsecas y extrínsecas que gobiernan la inactivación a nivel celular. Otra limitación de este modelo es la sobreestimación del parámetro C (cambio total en el número de sobrevivientes) para aquellas curvas de inactivación que no presentan fase cola final (Gonzales-Barron, 2012).

Un tercer modelo primario frecuentemente usado para describir curvas de inactivación no lineales es el de Geeraerd, que es de tipo dinámico (**Fig. 1.12**). Este modelo considera la dependencia según el tiempo de las condiciones ambientales a las cuales los microorganismos son sometidos (Geeraerd y col., 2000).

El modelo de Geeraerd es una extensión del modelo log-lineal que da cuenta de la presencia de hombro y/o cola mediante el uso de dos factores de ajuste. Comúnmente, se emplea la expresión logarítmica del modelo (**Ec. 1.9**).

$$(1.9) \quad \text{Log}(N) = \text{Log} \left[\left(10^{\text{Log}(N_0)} - 10^{\text{Log}(N_{res})} \right) \cdot e^{-k_{max} \cdot t} \cdot \left(\frac{e^{k_{max} \cdot SL}}{1 + (e^{k_{max} \cdot SL} - 1) \cdot e^{-k_{max} \cdot t}} \right) + 10^{\text{Log}(N_{res})} \right]$$

En donde: k_{max} es la máxima tasa de muerte [min^{-1}], SL es la duración del hombro [min], $\text{Log}(N_0)$ representa la población microbiana inicial, mientras que $\text{Log}(N_{res})$ representa la población sobreviviente determinada al término del tratamiento. Las distintas versiones de este modelo corresponden a los casos en los que $N_{res}=0$ (modelo log-lineal con hombro), o aquellos en los que $SL=0$ (log-lineal con cola).

El modelo de Geeraerd es capaz de simular independientemente una iniciación suave (fase hombro) y/o una saturación (fase cola) durante el transcurso de los tratamientos y ofrece una posible interpretación, desde una perspectiva mecanística, sobre la inactivación microbiana y la ocurrencia del fenómeno de cola (Gonzales-Barron, 2012).

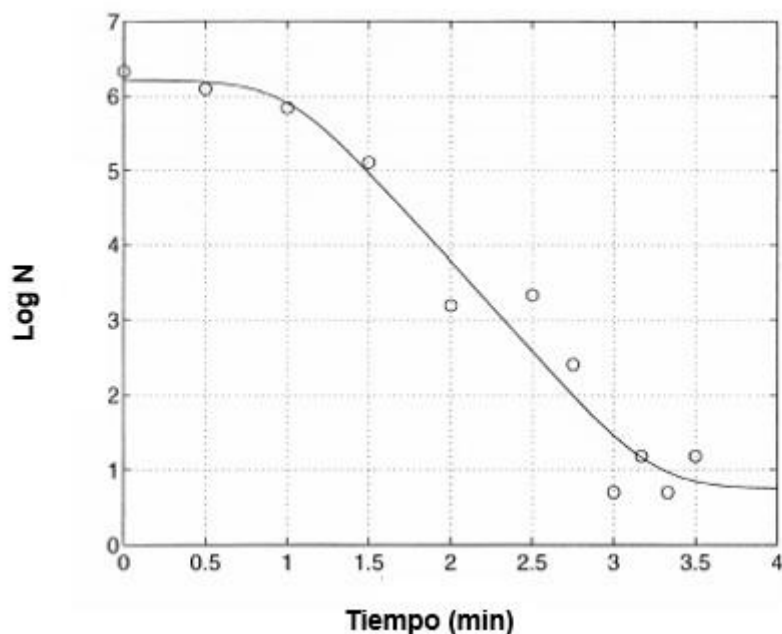


Figura 1.12. Ejemplo de una curva de inactivación modelada por la variante del modelo de Geeraerd con hombro, fase log-lineal y cola de *Listeria monocytogenes* en carne picada tratada térmicamente a 50 °C (reproducido de Geeraerd y col., 2000).

Los modelos secundarios permiten caracterizar las respuestas de los parámetros provenientes de los primarios frente a modificaciones en uno o varios factores ambientales (pH, actividad de agua, temperatura). Dentro de los mismos, se incluyen el modelo de Arrhenius, el modelo de Bělehrádek (también conocido como de la raíz cuadrada), y los polinómicos. Los modelos de Arrhenius y Bělehrádek permiten caracterizar la dependencia de los parámetros respecto de la temperatura del ambiente (Gonzales-Barron, 2012).

Los modelos terciarios consisten en programas informáticos que permiten aplicar los modelos primarios y secundarios de manera simple. Mediante los mismos, es posible estimar las respuestas microbianas ante condiciones que no fueron analizadas inicialmente, contrastar el efecto de distintas condiciones o comparar la conducta de diferentes microorganismos. La aplicación de estos programas informáticos predictivos sería de gran utilidad a la industria alimenticia a la hora de elaborar planes de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) y lineamientos de manejo de los alimentos a lo largo de

la cadena de distribución y comercialización. Dentro de este tipo de programas, se encuentra el reconocido “Integrated Pathogen Modeling Program” (IPMP) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Li y col., 2017).

1.11. Estudio del estado fisiológico y daño microbianos

1.11.1. La citometría de flujo como indicadora de la viabilidad microbiana

Con el fin de determinar viabilidad en cultivos microbianos, el método de recuento en placa es el más empleado. Sin embargo, es un hecho conocido que una fracción de la población microbiana puede no ser cultivada a pesar de ser metabólicamente activa. Se conoce a esa fracción como células viables, pero no cultivables (VBNC, del inglés “viable but non culturable cells”).

Las células VBNC pueden representar un peligro grave a lo largo de la vida útil de un alimento dado que, bajo condiciones favorables, podrían recomponerse gracias al fenómeno conocido como “resucitación” y recuperar su cultivabilidad y su infectividad, en caso de ser patogénicas (Díaz y col., 2010). El ingreso al estado VBNC suele atribuirse a la resistencia celular ante distintos tipos de estrés como el shock térmico, shock químico, estrés osmótico, deshidratación, entre otros.

Por otro lado, la técnica de recuento en placa no brinda información con respecto a la integridad celular y las actividades metabólicas de las poblaciones microbianas (Li y col., 2016). Otro inconveniente es que muchos de los microorganismos presentes en los alimentos (como también en muestras de agua, suelo, sedimentos, etc.) no pueden ser cultivados en los medios típicamente usados, por lo cual esta técnica podría estar subestimando la población microbiana (Spilimbergo y col., 2010). Adicionalmente, la técnica de recuento tiene las desventajas de tener que preparar medio de cultivo, inocular e incubar las placas, contar las colonias y de requerir personal entrenado para llevar a cabo la tarea, lo que determina que sea costosa en términos de labor y tiempo (Ruysen y col., 2007).

La citometría de flujo (CF) ha evolucionado como una de las técnicas más poderosas y versátiles para describir poblaciones microbianas, dando lugar a un sinnúmero de aplicaciones bioindustriales. Esta técnica permite determinar el número de células de una muestra y brinda información sobre el estado bioquímico y fisiológico de las mismas, lo que permite caracterizar muestras heterogéneas. La misma es una técnica analítica cuantitativa que permite caracterizar las poblaciones celulares a nivel individual, puesto que todas las células de la muestra son iluminadas por un rayo láser. La técnica correlaciona la intensidad

de las señales ópticas generadas por la CF, que son de dispersión y/o de fluorescencia (si se emplean tinciones fluorescentes) con parámetros celulares funcionales y/o estructurales (Díaz y col., 2010).

Una de las características claves de los citómetros de flujo es que son capaces de detectar un gran número de células/partículas (entre 5000 y 10000 células, según el artefacto usado) a la par que determinan varios parámetros sobre las células individuales. De este modo, es posible separar células/partículas en poblaciones o incluso se pueden identificar células raras basándose en las diferencias estadísticas para alguna de las variables determinadas a la vez (Bunthof y col., 2001).

Existen citómetros de flujo que permiten separar físicamente subconjuntos de células basándose en sus características citométricas (sorting). Estos equipos más complejos, denominados cell-sorters, son capaces de aislar células individuales o subpoblaciones con propiedades similares dentro de una población mixta para las aplicaciones subsiguientes (Nebe-von-Caron y col., 2000). Es importante señalar que el sorting puede realizarse bajo condiciones estériles, en caso de ser necesario.

Un citómetro con prestaciones básicas es un equipo por el cual circulan células o partículas en suspensión que son sometidas a una presión positiva y llevadas hacia una cámara de flujo. Una vez en la cámara, se genera un flujo gracias a la circulación de corrientes líquidas que dirige a la muestra hacia su centro e impulsa a las células a pasar de una por el haz lumínico del CF (generado por un láser de argón). Cuando un fotón incide sobre la célula/partícula atravesando el equipo, la misma se excita emitiendo un fotón de menor energía. Estos fotones son detectados por fotodiodos, atravesando filtros que seleccionan longitudes de onda de interés y son convertidos en señales eléctricas, amplificadas y almacenadas para analizar los datos (**Fig. 1.13**) (Longobardi-Givan, 2013).

El haz lumínico aplicado es desviado en todas las direcciones. La dispersión lumínica en ángulos cerca de los 0° es detectada por un fotodiodo situado en la misma dirección que la fuente de luz. La magnitud de tal dispersión resulta directamente proporcional al tamaño celular y se conoce como “dispersión hacia adelante” o FSC (del inglés, “forward scatter”) (**Fig. 1.14**). En oposición, la luz desviada lateralmente y detectada por un fotomultiplicador a 90° se relaciona con la granularidad o complejidad interna celular. Esto se denomina “dispersión angular” o SSC (“side scatter”, en inglés) (Li y col., 2016).

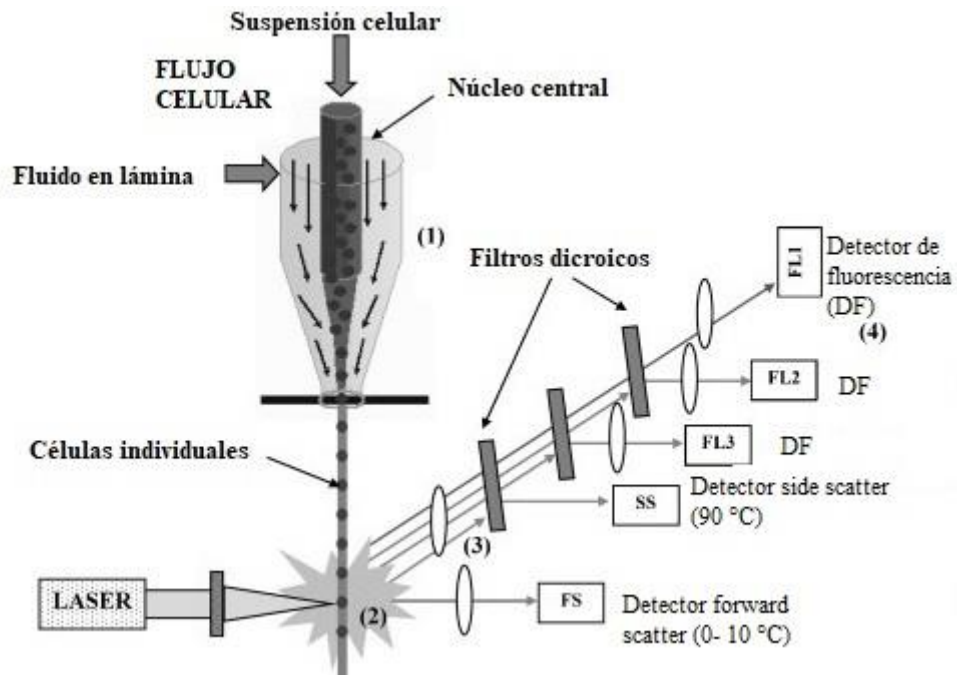


Figura 1.13. Esquema de un citómetro de flujo (adaptado de Díaz y col., 2010). **(1)** El enfoque hidrodinámico origina un flujo individual de células; **(2)** Las células son impactadas por un haz de láser y emiten señales conectadas a distintos parámetros celulares; **(3)** Las emisiones fluorescentes y de dispersión de cada partícula son separadas por un grupo de filtros y espejos; **(4)** Las señales son recogidas por el sistema de detección, los detectores de dispersión y los detectores fluorescentes. Los datos son enviados a un ordenador para su análisis.

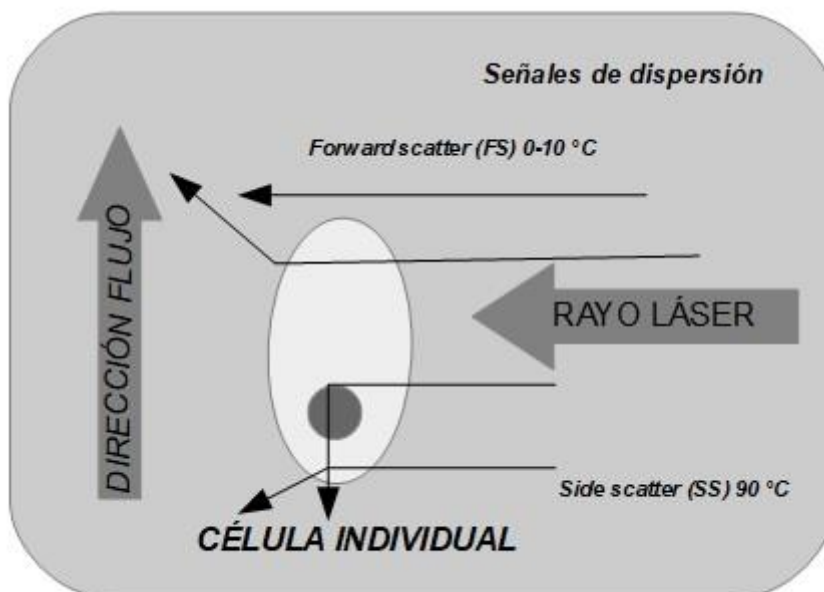


Figura 1.14. Fracciones de luz dispersadas por una célula individual excitada (adaptado de Díaz y col., 2010).

En general, para determinar viabilidad celular mediante CF se aplica un procedimiento de doble tinción con fluoresceína diacetato (FDA) y yoduro de propidio (PI). El FDA es un precursor no fluorescente que difunde con facilidad a través de las membranas celulares. Es usado para la evaluación de la actividad enzimática celular e integridad de membrana. Dentro de las células metabólicamente activas, el FDA sufre la hidrólisis por las enzimas esterasa generando fluoresceína, un compuesto verde fluorescente incapaz de difundir hacia fuera de las células. En oposición, el PI es un tinte que se une a nucleótidos y se usa para evaluar la integridad de membrana ya que solamente ingresa en células con membranas dañadas (permeabilizadas). Una vez que la membrana resulta dañada, el PI difunde dentro de la célula tiñendo de rojo al ADN (Zhou y col., 2014).

Los datos obtenidos de una doble tinción con FDA y PI pueden expresarse en un gráfico de densidad de fluorescencia de cuatro regiones (cuadrantes). Los cuadrantes dividen la distribución de la intensidad en zonas de células no marcadas con ningún tinte (doble negativo), células marcadas con ambos (doble positivo) y células marcadas por solamente uno de los tintes fluorescentes (Ananta y Knorr, 2009). En consecuencia, el análisis de los cuadrantes permite distinguir cuatro subpoblaciones con características propias (**Tabla 1.5**).

Tabla 1.5. Clasificación de los cuadrantes de los gráficos de densidad de las células con doble tinción de FDA y PI.

Número de cuadrante	Fluorescencia exhibida en cada cuadrante	Mecanismo celular posiblemente involucrado
I	F ⁺ PI ⁻	Actividad esterasa, membrana intacta
II	F ⁺ PI ⁺	Actividad esterasa, membrana con daño
III	F ⁻ PI ⁻	No se detecta actividad esterasa (o F fue extruido de la célula), membrana intacta
IV	F ⁻ PI ⁺	No se detecta actividad esterasa, membrana dañada

1.11.2. Uso de la microscopía electrónica de transmisión (MET) para evaluar daño microbiano

El uso de la técnica de microscopía electrónica de transmisión (MET) permite comprender mejor los mecanismos de inactivación microbiana por los tratamientos de preservación aplicados.

La información visual provista por MET es útil en proveer perspectivas sobre la microestructura y morfología celular. Además, permite caracterizar el tipo y la magnitud de los cambios que se dan a nivel estructural en respuesta a un dado tratamiento e incrementa nuestra comprensión de por qué un tratamiento resulta efectivo contra un microorganismo particular. Además, esta información visual puede afectar la selección del medio de cultivo elegido para la enumeración microbiana o para estudios de resucitación celular (Hajmeer y col., 2006).

Mediante la técnica de MET, se enfocan electrones para penetrar un espécimen cortado muy fino y generar una imagen mediante el uso de lentes apropiados (**Fig. 1.15**). El enfoque de electrones se basa en el hecho de que los mismos, además de presentar carácter de onda, se comportan como partículas negativamente cargadas y pueden ser desviados en consecuencia por campos eléctricos o magnéticos (Egerton, 2016).

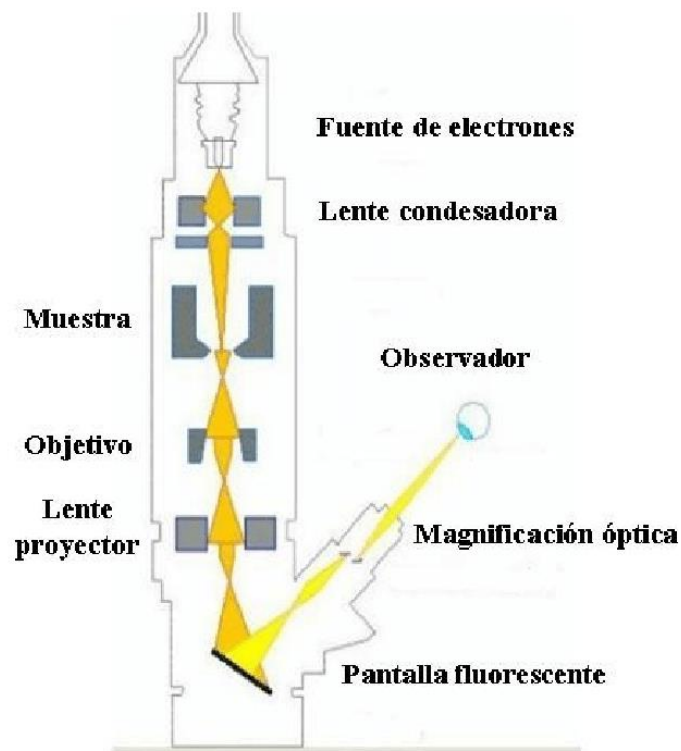


Figura 1.15. Representación del funcionamiento del microscopio electrónico de transmisión (reproducido de Resta y col., 2007).

1.12. Evaluación de la calidad físico-química de jugos frutihortícolas

La evaluación de la calidad físico-química de los jugos frutihortícolas procesados con luz UV-C implica la medición de distintos parámetros clave, incluyendo la medición espectrofotométrica del color, pH, turbidez, contenido de vitaminas, actividad enzimática, actividad antioxidante, entre otros (Kouchma y col., 2009).

A continuación, se describen brevemente los parámetros de calidad estudiados en esta tesis y las técnicas empleadas a tal fin.

1.12.1. Color

La calidad organoléptica de los jugos frutihortícolas es un factor clave para su consumo y puede determinarse empleando medidas objetivas o subjetivas. Entre las propiedades que se pueden analizar se hallan la apariencia, la textura y el flavor (que representa la suma del aroma y sabor del producto).

La percepción visual del color es el principal atributo de apariencia en jugos frutihortícolas y se da por la activación de la retina del ojo en la región visible del espectro electromagnético (390-760 nm). Es la primer evaluación de calidad efectuada por los consumidores antes de analizar los otros como el flavor (Echeverría y López, 2014).

El color es un indicador de la calidad de los jugos ya que permite determinar si se dieron reacciones de deterioro que generan un feo aspecto y cambios en la calidad nutricional. Es importante señalar que el color de los alimentos está afectado por los cambios químicos, bioquímicos, microbianos y físicos que ocurren durante el crecimiento, maduración, manejo post-cosecha y procesamiento.

El color depende de la percepción del observador y de las condiciones de observación. El color de un material se hace visible cuando la luz de una fuente ilumina su superficie (Sahin y Sumnu, 2006).

Los jugos y otras bebidas pueden clasificarse según su comportamiento frente a la luz en opacos, translúcidos o transparentes. Por tal razón, requieren diferentes técnicas e instrumentos para la medición del color.

❖ **Líquidos opacos:** poseen un alto contenido de sólidos, son impenetrables por la luz y presentan un alto valor de °Brix (sólidos solubles).

❖ **Líquidos traslúcidos:** tienen un contenido de sólidos intermedio y un valor °Brix bajo. La luz puede atravesarlos, pero de manera difusa, por lo que los objetos del otro lado no pueden ser identificados de modo claro.

❖ **Líquidos transparentes:** poseen un contenido muy bajo o igual a cero de sólidos y permiten el paso de la luz a través de ellos sin interrupción o distorsión, por lo que el objeto al otro lado puede ser visto.

Varios atributos psicológicos permiten caracterizar el color de una muestra ante la luz:

- **Claridad:** atributo que atañe a cada color un equivalente en la escala de grises. Esta cualidad psicológica se corresponde con la magnitud psicofísica *luminosidad*.

- **Tono/matiz:** atributo que otorga al color una cualidad del tipo rojo, naranja, amarillo, verde, azul, púrpura o alguna combinación de ellos. Esta cualidad psicológica se relaciona con la magnitud psicofísica *longitud de onda dominante*.

- **Saturación:** este atributo caracteriza al color por su semejanza con un color espectral puro (fijado el tono). Mientras más se parece al color puro, más saturado está. La magnitud psicofísica asociada es la *pureza*.

1.12.1.a. Espacios de color

La medición objetiva de un color se obtiene del análisis de su espectro visible, por transmisión o reflexión, mediante un espectrofotómetro. Este color puede describirse mediante múltiples sistemas de coordenadas de color (Pathare y col., 2013). Algunos de estos sistemas son el RGB (rojo, verde y azul), Hunter L a b, CIE L*a*b*, CIE XYZ, entre otros.

Estos sistemas difieren en la simetría del espacio de color y en el sistema de coordenadas utilizadas para definir puntos dentro de ese espacio. Según los conceptos CIE, el ojo humano posee tres receptores de color: rojo, verde y azul (primarios), siendo los otros colores combinaciones de éstos.

El espacio de color más usado es el CIE XYZ. Se fundamenta en el principio tricromático, pero en vez de usar colores reales primarios (que requieren de pareo negativo), emplea primarios imaginarios positivos: X, Y, y Z. Este sistema utiliza el diagrama de cromaticidad para designar los distintos colores (**Fig. 1.16**). El primario Y, denominado reflectancia luminosa o transmitancia, contiene el estímulo luminoso entero. La aplicación de una ponderación a una curva de reflectancia genera los valores triestímulo: **X, Y, y Z**. Estos

valores son después empleados para calcular las coordenadas de cromaticidad, llamadas con las letras x (rojo), y (verde), y z (azul). El valor de x se calcula mediante la siguiente expresión:

$$(1.10) \quad x = \frac{X}{(X+Y+Z)}$$

Mientras que los valores de y junto a los de z pueden determinarse al reemplazar X con Y o con Z , respectivamente, en el numerador de la **Ec. 1.10**. Los espacios de cromaticidad se suelen expresar en términos de las coordenadas x, y .

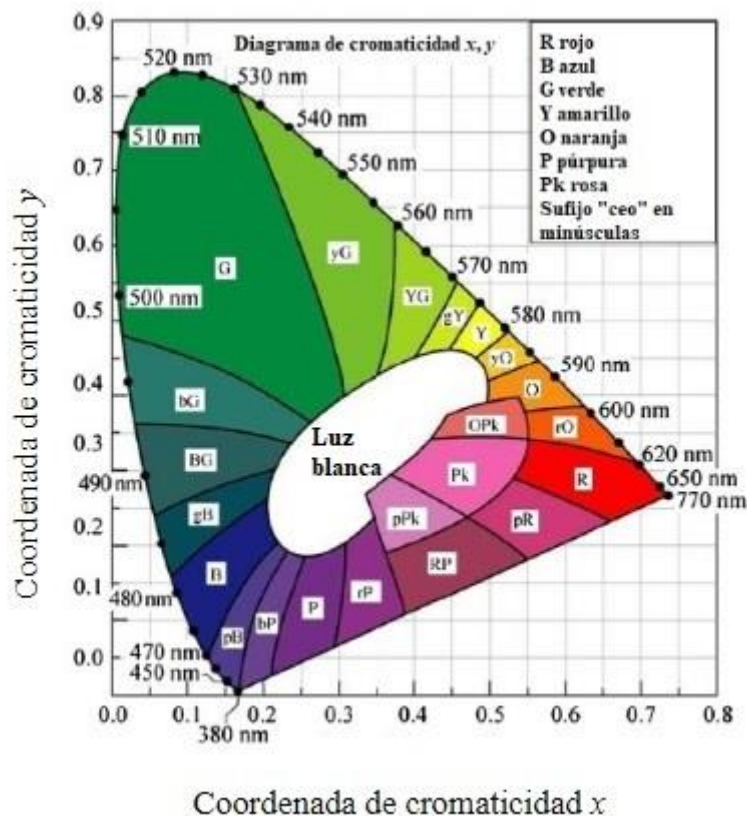


Figura 1.16. Espacio de cromaticidad CIE de coordenadas x, y en el que el centro corresponde a la luz blanca (adaptado de Pathare y col., 2013).

El sistema Hunter $L a b$ y el espacio de color CIE $L^*a^*b^*$ (**Fig. 1.17**) brindan diferencias de colores más uniformes en relación con la percepción humana de las mismas.

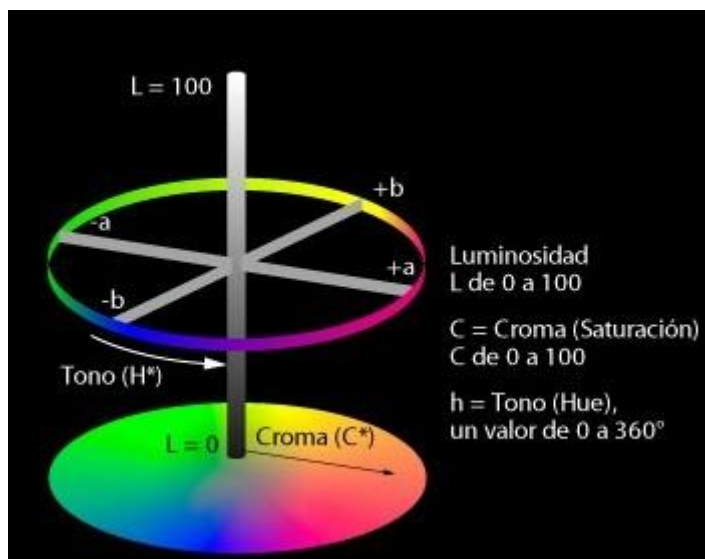


Figura 1.17. Espacio de color CIE L*a*b* (adaptado de Pathare y col., 2013).

Para poder detectar la presencia de color se necesita un objeto, una fuente lumínica (iluminante) y un observador. La fuente lumínica puede prenderse/apagarse y se la emplea para mirar el objeto. Mientras que, el iluminante es una descripción matemática de la fuente lumínica usada. En 1931, la CIE (Commission Internationale de l'Eclairage's) propuso tres iluminantes estándar. El primero, llamado iluminante A, corresponde a la luz proveniente de una lámpara incandescente. El B corresponde a la luz solar directa, mientras que el C representa la luz diurna promedio proveniente del cielo en general. En 1966, se sugirió un cuarto tipo de iluminantes denominados D, que representan la luz diurna con más precisión que los iluminantes B y C. Mientras que, en 1986, la CIE recomendó una serie de iluminantes E para denotar las lámparas fluorescentes (MacDougall, 2002).

En la colorimetría de alimentos suele emplearse el iluminante C (luz diurna promedio) con un ángulo de 2 °C en el espectrofotómetro o colorímetro, con el fin de poder observar las muestras con mayor detalle.

Los sistemas Hunter L a b y el sistema modificado CIE L*a*b* son lo más empleados en la industria alimenticia.

En el espacio CIE L*a*b* existen dos coordenadas de color, a^* y b^* , como también un índice psicométrico de luminosidad llamado L^* . La coordenada a^* adopta valores positivos para los colores rojizos y negativos para los verdosos, mientras que b^* presenta valores positivos para los colores amarillos y valores negativos para los azulados. L^* corresponde a una medida de la luminosidad, una propiedad según la cual cada color puede ser

considerado como un integrante de la escala de grises comprendidas entre el blanco y el negro (Granato y Masson, 2010).

El parámetro Cromo, denotado como C^* , es el atributo cuantitativo de la saturación del color. Este parámetro es empleado para establecer el grado de diferencia de un ángulo de tono (o "Hue", en inglés) en comparación con un color gris con la misma luminosidad (**Ec. 1.11**). Mientras más elevados sean los valores de C^* , mayor es la intensidad de color de las muestras detectadas por las personas.

$$(1.11) \quad C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

El ángulo de tono, h^* , tiene en cuenta los atributos cualitativos del color, que son por los cuales los colores han sido definidos clásicamente como rojizos, verdosos, etc. Se emplea para definir la diferencia de un dado color con respecto a un color gris con la misma luminosidad (**Ec. 1.12**). El ángulo de tono se vincula a las diferencias en absorbancia de la luz a distintas longitudes de onda. Un mayor ángulo de tono representa muestras menos amarillas.

$$(1.12) \quad h^* = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right)$$

Un ángulo de 0° o de 360° se corresponde a un matiz/tono rojo, mientras los ángulos de 90° , 180° y 270° representan matices amarillos, verdes y azules, respectivamente.

Las funciones de color del espacio CIE $L^*a^*b^*$ son determinaciones obtenidas a partir de la combinación matemática de los valores triestímulo y permiten caracterizar los distintos atributos del color (**Ec. 1.13-15**):

$$(1.13) \quad L_{ab}^* = 116 \times \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - 16$$

$$(1.14) \quad a^* = 500 \times \left[\left(\frac{X}{X_n} \right)^{1/3} - \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} \right]$$

$$(1.15) \quad b^* = 200 \times \left[\left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - \left(\frac{Z}{Z_n} \right)^{1/3} \right]$$

L_{ab}^* es el parámetro correspondiente a la luminosidad, que va desde 0 (negro) hasta 100 (blanco). El parámetro a^* expresa el eje rojo-verde, mientras que el b^* el eje amarillo-azul, adoptando valores entre -120 y 120. X_n , Y_n , Z_n son los valores pertenecientes al iluminante (en muestras opacas) o a la referencia (en muestras transparentes).

1.12.2. Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos que previenen la oxidación de otros reactivos, brindando una protección clave a las células al neutralizar los efectos dañinos de los radicales libres (Jiang y Xiong, 2016). Los radicales libres son especies químicas formadas cuando se genera oxígeno dentro de una célula, que presentan un electrón de la última capa no apareado. Por tal motivo, son especies altamente reactivas capaces de robar un electrón a cualquier molécula estable cercana como las de ácidos nucleicos (ADN y ARN), lípidos, proteínas y carbohidratos. Cuando la molécula atacada pierde su electrón, se transforma en un nuevo radical libre capaz de generar una reacción en cadena (Baradinath y col., 2010).

Dentro de la variedad de compuestos antioxidantes existentes, se hallan aquellos que secuestran radicales libres, los extintores de oxígeno singlete, los que inactivan peróxidos y otras especies reactivas de oxígeno, quelantes de iones de metal, e inhibidores de enzimas oxidativas, entre otras. Estos compuestos ejercen su actividad inhibidora de la oxidación mediante distintos mecanismos, clasificándose en antioxidantes primarios y secundarios (Shahidi y Zhong, 2015).

Los antioxidantes primarios como ciertos compuestos fenólicos y los tocoferoles inhiben la reacción en cadena de la oxidación actuando como donantes de hidrógeno o aceptores de radicales libres, generando radicales más estables (Tsao, 2015).

Los antioxidantes secundarios previenen o retrasan la oxidación al suprimir aquellos promotores de la oxidación, incluyendo iones metálicos, oxígenos singlete, enzimas oxidativas y otros oxidantes. Los agentes reductores pueden reducir los peróxidos lipídicos y los agentes oxidantes a través de reacciones de óxido-reducción. Algunos antioxidantes secundarios como el ácido ascórbico regeneran los primarios al cederles un nuevo hidrógeno. Otros antioxidantes secundarios promueven la descomposición de hidroperóxidos en especies no radicales, o absorben la radiación UV protegiendo a los lípidos de la foto-oxidación (Shahidi y Zhong, 2010).

La actividad antioxidante de un alimento no puede ser determinada directamente, sino determinando el efecto del antioxidante en controlar la extensión de una reacción oxidativa. En consecuencia, existe una amplia variedad de metodologías para medir la actividad antioxidante de una muestra (Alam y col., 2013). Dentro de los métodos de determinación de actividad antioxidante in vitro, pueden distinguirse aquellos que hacen uso de técnicas espectrométricas, cromatográficas y electroquímicas.

Los técnicas espectrométricas para la determinación de la actividad antioxidante de una muestra se basan en la reacción de un radical (radical catión o complejo) con una molécula antioxidante capaz de donar un átomo de hidrógeno (Pisoschi y Negulescu, 2011). Existen múltiples ensayos basados en este tipo de reacción, dentro de los cuales se incluyen el de DPPH, ABTS, ORAC y FRAP (**Tabla 1.6**).

Tabla 1.6. Principales técnicas espectrométricas usadas para la determinación de la actividad antioxidante total.

Ensayo de actividad antioxidante total	Principio del ensayo	Determinación del producto final de la reacción
DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)	Reacción antioxidante con un radical orgánico	Colorimetría
ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)	Reacción antioxidante con un radical catión orgánico	Colorimetría
FRAP	Reacción antioxidante con un complejo Fe(III)	Colorimetría
CUPRAC	Reducción de Cu(II) a Cu(I) por acción de los antioxidantes	Colorimetría
ORAC	Reacción antioxidante con radicales peroxilo, inducida por AAPH (2,2'-azobis-2-amidino-propano)	Pérdida de fluorescencia
TRAP	Capacidad antioxidante de secuestrar radicales derivados del luminol, generados por descomposición del AAPH	Freno de la quimioluminiscencia
Fluorimetría	Emisión de luz por una sustancia que ha absorbido luz u otra radiación electromagnética	Registro de la excitación/ espectro de emisión de la sustancia

En particular, la técnica de determinación de actividad antioxidante total por DPPH es el más utilizado en aquellos trabajos en los cuales se mide la capacidad antioxidante de los alimentos (Alam y col., 2013). En este ensayo, interviene la molécula de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo. Esta molécula se caracteriza por ser un radical libre estable, gracias a la

deslocalización del electrón en toda la molécula, lo que previene su dimerización como sucede con los demás radicales libres (Alam y col., 2013). La deslocalización de este electrón además da origen a un color violeta intenso, caracterizado por una banda de absorción alrededor de los 517 nm en una solución de etanol. Cuando la solución conteniendo DPPH se mezcla con la del sustrato con capacidad antioxidante, se genera la forma reducida de este reactivo y se pierde la coloración violeta (**Fig. 1.18**).

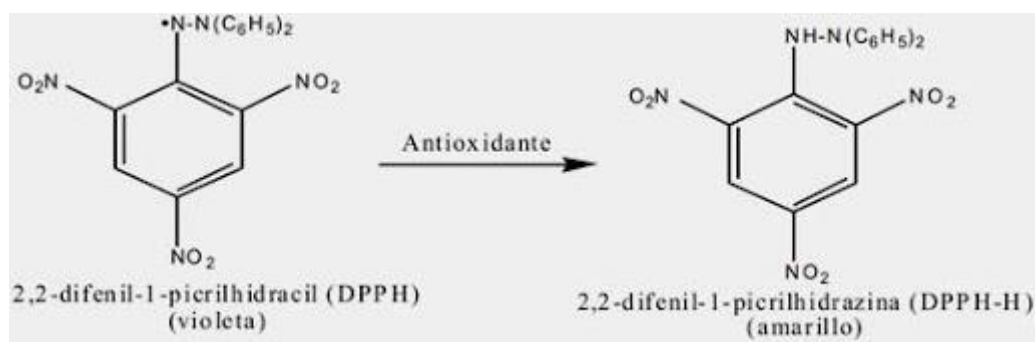


Figura 1.18. Reacción química entre el radical estable DPPH y un agente antioxidante (reproducido de La Rosa-Toro y col., 2011).

Dentro de las limitaciones de muchas de las técnicas para determinar la capacidad antioxidante de los alimentos, se encuentra la falta de un único sustrato en específico a reducir. La combinación de todos los enfoques con sus distintos métodos de determinación da cuenta de la amplia variedad de modos en los que se reporta la actividad antioxidante. Además, la determinación de las actividades antioxidantes, en sistemas en los que podría haber una mezcla de compuestos con tal actividad, no puede ser evaluada satisfactoriamente mediante un único ensayo. Por tal razón, se debería recurrir a múltiples métodos de determinación para evaluar la capacidad antioxidante en los alimentos (Antolovich y col., 2001).

1.12.3. Polifenoles

Los polifenoles son un grupo diverso de sustancias de origen vegetal, caracterizados por la presencia de uno o más anillos bencénicos hidroxilados. Las dos clases principales de polifenoles son los ácidos fenólicos y los flavonoides (García-Guzmán y col., 2015).

El ensayo de Folin-Ciocalteu (F-C) es típicamente usado para determinar el contenido de polifenoles totales de una variedad de frutas y vegetales (Lester y col., 2012).

El reactivo de F-C consiste en una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico de color amarillo, que permite detectar indirectamente la presencia de compuestos fenólicos. La reacción implicada se realiza en condiciones básicas (pH=10), con el objetivo de generar el anión fenolato. Luego, se da una reacción de óxido-reducción entre el fenolato y la solución de F-C, en la que el molibdeno atraviesa una reducción y se forma un complejo de Mo(V) de color azul medible por espectrofotometría a una longitud de 765 nm (Granato y col., 2016).

Los productos frutihortícolas y sus extractos derivados presentan una amplia variedad de compuestos químicos no fenólicos, que son capaces de interactuar con el reactivo de Folin-Ciocalteu dando lugar a una sobreestimación de la cantidad de polifenoles de una muestra (Muñoz-Bernal y col., 2017). Entre los compuestos capaces de reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu se hallan azúcares reductores como glucosa y fructosa, dióxido de azufre, ácidos orgánicos como el ascórbico y ciertos aminoácidos (Margraf y col., 2015).

1.13. Análisis sensorial de alimentos

El análisis sensorial de los alimentos permite evaluar la calidad organoléptica de los alimentos e implica la descripción, medición e interpretación de las características de productos percibidas por los órganos sensoriales. En este caso, el ser humano actúa como una herramienta de medición comparable a los artefactos de laboratorio. Es empleado en una gran variedad de áreas como el mejoramiento y desarrollo de productos, el control de calidad, los estudios de almacenamiento y el desarrollo de procesos (Watts y col., 1989).

Puesto que los seres humanos están a cargo de la medición, se deben controlar las condiciones de los ensayos con el fin de evadir los sesgos fisiológicos, psicológicos y culturales. También hay que controlar la influencia de factores ambientales que modifiquen la percepción y aquellos factores propios de los alimentos.

Con el objetivo de emplear el análisis sensorial como una metodología de análisis es necesario cumplir con estos puntos (Lawless y Heymann, 2010):

- ❖ Los resultados se deben obtener y reportar de manera tal que las conclusiones obtenidas de los experimentos sean comparables con las de otras experiencias.
- ❖ Se deben poder establecer los límites de sensibilidad y validez de los resultados.

1.13.1. Jueces sensoriales

El instrumento básico para efectuar el análisis sensorial es el panel de jueces que han sido elegidos (y, en algunos casos, entrenados) para efectuar las tareas específicas de la evaluación (Ramírez-Navas, 2012). Los paneles de jueces se clasifican en tres grupos:

✓ **Panel entrenado:** consiste en individuos especialmente escogidos y formados en las propiedades sensoriales del alimento a evaluar. Deben poder determinar la intensidad de una característica sensorial y dar la apreciación general del alimento. El entrenamiento sirve como pauta para definir la calidad de los productos. Los evaluadores entrenados usan un lenguaje formal y conocen científicamente las propiedades a analizar. Debido a su alta formación y su entrenamiento en el producto, se emplea una cantidad baja de ellos (≤ 10 individuos).

✓ **Panel semi-entrenado:** consiste en individuos que están familiarizados con las características del producto a evaluar. Son capaces de detectar diferencias, medir intensidad de atributos en escalas y evaluar globalmente el alimento. La variación individual puede controlarse empleando una mayor cantidad de jueces (25-40).

✓ **Panel de consumidores:** no poseen entrenamiento alguno. Son escogidos azarosamente considerando que son consumidores del alimento a evaluar. Son idóneos para valorar la calidad de un producto, siendo capaces también de evaluar la intensidad de distintos atributos en escalas sencillas.

1.13.2. Selección de un panel de jueces

Las reglas para escoger un panel de jueces para analizar un producto no son muy rígidas. Los panelistas, tanto para los paneles entrenados como para los paneles de consumidores, pueden tomarse del personal o de aquellos que se acercan a la organización o institución donde se efectúa la investigación. Los panelistas estarán más dispuestos a participar de la evaluación si creen que su aporte al estudio es relevante y se encuentran motivados (Meilgaard y col., 2007).

Es importante determinar antes de la selección de jueces cuáles son sus gustos y disgustos en términos de alimentos, y también preguntar si poseen alguna alergia alimentaria. Usualmente, se enlista el triple de panelistas de los necesarios. Esto responde a la necesidad de contar con suplentes y porque puede ser que no todos los jueces sean adecuados para la prueba en cuestión.

Cuando se realizan ensayos de aceptabilidad de un producto por los consumidores, no se requieren jueces entrenados. Es suficiente elegir aquellas personas capaces de detectar los sabores más importantes en el producto a evaluar, explicando adecuadamente las pruebas a realizar (Drake, 2007).

En los casos donde se necesita percibir algún componente raro en el alimento o es necesario obtener un perfil de sabores, se requieren panelistas entrenados, capaces de seguir pruebas de selección secuenciales.

1.13.3. Elección del sitio de evaluación sensorial

El análisis sensorial no necesita de facilidades complejas, pero se debe cumplimentar con ciertas condiciones para realizar las evaluaciones de modo eficiente y confiable. Si bien los recintos especialmente diseñados para la evaluación sensorial son mejores, es posible adaptar el espacio de laboratorio disponible.

Los requisitos esenciales para todos los sitios de evaluación sensorial son: **(1)** un área para la preparación de alimentos; **(2)** un área de discusión separada para los panelistas (para que el encargado explique y dé instrucciones sobre la evaluación); **(3)** un área de cabinas separadas para los panelistas; **(4)** una mesada para el encargado de la prueba; y **(5)** elementos para preparar y servir las muestras (Lawless y Heymann, 2010).

1.13.4. Sala de cabinas de evaluación sensorial

El área de cabinas para los panelistas debería poseer compartimientos individuales donde los panelistas pueden evaluar las muestras sin la influencia de otros integrantes del panel, que pueden introducir errores de apreciación o distracciones (ISO 8589:1988). El área de cabinas de evaluación debe estar aislada del área de discusión y los dos eventos no deben darse a la par.

Cada cabina debe poseer una repisa, una silla o banco, una abertura para recibir las muestras del área de preparación y luces individuales.

1.13.5. Clasificación de las pruebas de evaluación sensorial

Existe una gran variedad de pruebas de evaluación sensorial, que se escogen en base a los fines del análisis y los materiales y panelistas disponibles. Los métodos de análisis más usados se clasifican en tres grupos (Meilgaard, 2007):

❖ **Pruebas discriminativas:** establecen si dos o más muestras son perceptiblemente diferentes (en general, respecto de un control).

❖ **Pruebas descriptivas:** describen minuciosamente al producto según sus atributos y/o fallas sensoriales. Brindan una descripción entera del producto, permite identificar ingredientes/variables del procesamiento, y establecer qué atributos son claves para su aceptación.

❖ **Pruebas afectivas:** su fin es evaluar la aceptabilidad global de un alimento usando consumidores. Las pruebas afectivas suelen ser posteriores a las discriminativas y descriptivas. Las escalas de medida de los atributos sirven para expresar la intensidad de los atributos. Se realizan antes de los estudios de mercado.

1.13.5.a. Pruebas afectivas de análisis sensorial

1.13.5.a.i. Pruebas de aceptabilidad

Las pruebas de aceptabilidad de consumidores usando escalas son un modo de determinar la aceptación de un producto por parte de ellos y de analizar sus hábitos, actitudes, creencias y opiniones acerca de los productos alimentarios que afectan su aceptación (Yang y Lee, 2018). Además, resultan necesarias para establecer la calidad del producto procesado.

La prueba hedónica de 9 puntos es la más conocida y empleada para evaluar aceptabilidad (Kalva y col., 2014). Se basa en la evaluación de un producto usando una escala de categorías que van del agrado al desagrado.

Se brindan una o múltiples muestras a los panelistas, que tendrán que evaluar la impresión global de las mismas empleando una escala (que puede ser estructurada, semiestructurada o no estructurada) y expresar su juicio en una planilla. Estas pruebas permiten identificar problemas no detectados en el laboratorio, previo a que se llegue a la instancia de investigación de mercado.

En particular, la escala hedónica de 9 puntos presenta una categoría central neutral y una escala conteniendo adverbios que van desde “*Me gusta extremadamente*” a “*Me disgusta extremadamente*”. Cada punto de la escala marca un cambio en la percepción hedónica, lo que lo hace muy apropiado para el análisis estadístico (Lawless y Heymann, 2010).

Sin embargo, se han registrado limitaciones respecto de esta escala de 9 puntos (Lim y Fujimaru, 2010). La limitación más común es que cada panelista emplea la escala distinto

y esto lleva a una distribución diferente de puntajes de los panelistas (Villanueva y col, 2005). Ciertos panelistas evitan usar las categorías extremas y se sitúan en la tendencia central, lo cual reduce la eficiencia de la escala y no permite una discriminación adecuada entre las muestras.

1.13.5.a.ii. Test de campo

Consisten en un tipo de prueba afectiva en la que se analiza la respuesta (aceptabilidad, impresión o preferencia) de los consumidores a un dado producto, de acuerdo con un protocolo establecido en el formulario a llenar (Meilgaard y col., 2007).

Los objetivos de los tests de campo son los siguientes:

- ❖ Establecer la aceptabilidad de un producto por parte de los consumidores. Esto debe hacerse sobre la base sensorial del mismo sin contar con los datos de definición y descripción presentes en su envase.
- ❖ Determinar aquellas fallas imperceptibles del producto previo a realizar investigaciones de mercado más complejas.
- ❖ Brindar las claves para la reformulación del producto si es requerida para su aceptabilidad.
- ❖ Escoger las formulaciones más aceptables del producto cuando se emplea una prueba camuflada.
- ❖ Obtener información valiosa sobre el gusto de los consumidores blanco del producto.

De acuerdo con el número de muestras a evaluar en un test de campo, las mismas se pueden disponer según alguno de los siguientes diseños:

- ✓ **Pruebas paralelas:** se presentan dos muestras distintas a la vez. Los individuos analizan ambos productos en condiciones controladas (con el monitoreo del encargado de la prueba), lo cual brinda un alto nivel de sensibilidad.
- ✓ **Pruebas monádicas (de un producto):** cada individuo evalúa un solo producto, siendo una metodología costosa por requerir muchos participantes. El análisis estadístico utiliza pruebas de comparación entre grupos. Un problema es la elevada variabilidad individual de estas pruebas, por lo que conviene comparar un producto respecto a otro de referencia (por ejemplo, una variante alternativa o la versión del producto de la competencia).
- ✓ **Pruebas monádicas secuenciales:** se ofrecen dos productos de forma secuencial, habiendo dos fuentes de variación: producto y sujetos.

En relación con el diseño de los cuestionarios para las pruebas sensoriales afectivas, conviene cubrir de lo más general a lo más específico. En primera instancia, se recomienda solicitar la impresión global de la muestra mediante el uso de una escala hedónica balanceada de 9 puntos. Posteriormente, se procede a analizar atributos particulares mediante escalas de punto óptimo (JAR, del inglés “just about right”), de intensidad y de agrado (apariencia, sabor, color, textura, etc.).

En la elaboración de las escalas de atributos, se determinan las características generales que lo identifican conocidas como descriptores. A la hora de definirlos, el encargado del panel tiene que ser objetivo y usar definiciones amplias en término de la terminología (Barrera y Hernández, 2010).

Resulta clave no empezar preguntando por los atributos particulares para después pasar a la impresión global, dado que los panelistas consideran el producto integradamente (como un todo). Las preguntas respecto de los atributos individuales causan que los panelistas se vuelvan más puntillosos, lo que podría traer conflictos al hacer luego preguntas globales. Sobre todo, porque podrían introducir en la impresión global vocabulario proveniente de las escalas de atributos individuales.

También se pueden incluir en el cuestionario preguntas de información personal sobre los panelistas (edad, ocupación, preferencias de consumo, etc.), a fin de segmentar los datos obtenidos.

1.13.5.b.i. Prueba CATA

La prueba CATA (del inglés, “check-all-that-apply”) consiste en un cuestionario con una lista de atributos (palabras y/o frases), de los cuales los panelistas deben seleccionar todos aquellos que estimen adecuados para describir al producto (Valentin y col., 2012).

Las muestras se presentan de a una según un diseño balanceado o aleatorizado. Se les solicita a los panelistas que evalúen cada producto y que marquen en la lista todos aquellos atributos que mejor definen al mismo. Los panelistas pueden escoger tantos atributos como deseen, no habiendo limitaciones de tiempo para completar el cuestionario.

Los atributos de una prueba CATA no están restringidos a los asuntos sensoriales, sino que también pueden estar vinculados a aspectos emocionales, hedónicos, y a cuestiones respecto del uso e idoneidad del producto (Dooley y col., 2010). Los términos de la prueba CATA pueden ser elegidos por un grupo focal previo o en base a las preguntas abiertas que siguen a las pruebas de impresión global.

El análisis estadístico se realiza volcando el número de panelistas que usaron cada atributo para describir cada producto en una matriz de frecuencias. Posteriormente, se procede a efectuar un análisis de correspondencias sobre la matriz de frecuencias con el objetivo de obtener un mapa sensorial de los productos (Ares y col., 2014; Ferrario y col., 2018).

Además, es posible solicitar a los consumidores que definan un producto ideal empleando el mismo cuestionario que para la evaluación de las muestras bajo estudio. Este uso de la prueba CATA representa un enfoque alternativo al uso del Método del Perfil Ideal, el cual les requiere mucho tiempo a los panelistas y trae aparejado problemas de alta variabilidad en el empleo de las escalas de intensidad para los atributos (Bruzzone y col., 2015).



2. Objetivos

2. Objetivos

2.1. Hipótesis y objetivo general

En los últimos años, resultado de la preocupación de los consumidores ante brotes de ETAs, se han desarrollado múltiples estándares respecto de la seguridad y calidad alimentarias. Con el objetivo de cumplir con los mismos, la industria alimentaria se ha concentrado tanto en disminuir la contaminación de las materias primas y productos procesados, como en generar tecnologías para la preservación que reduzcan la carga microbiana y/o su desarrollo (Wilcock y Ball, 2014).

Por otro lado, la industria alimentaria se ve obligada a satisfacer las demandas de los consumidores en términos de generar productos más similares a los frescos, pero de alta calidad organoléptica, nutricional y sensorial. Esto representa un inconveniente porque se deben producir alimentos de elevada calidad con los niveles de inactivación microbiana requeridos para su consumo. Como respuesta a estos requisitos, es que aparecen las tecnologías emergentes para la preservación de alimentos pudiendo ser empleadas de modo individual o en combinación (Bhattacharjee y col., 2019).

La preservación de jugos frutihortícolas mediante el uso de la tecnología emergente de luz ultravioleta de onda corta (UV-C) representa una alternativa prometedora para obtener productos microbiológicamente seguros y de buena calidad. Múltiples estudios dan cuenta de la eficacia de la luz UV-C como tecnología de inactivación microbiana en jugos frutales (Acevedo y col., 2018; Saucedo-Gálvez y col., 2019) y vegetales (Demir y col., 2019). Sin embargo, el uso de la luz UV-C para la preservación de jugos frutihortícolas trae aparejado el inconveniente de la presencia de sólidos solubles y compuestos coloreados, lo cual disminuye la transmitancia UV, la dosis de UV-C efectiva entregada y, consecuentemente, la inactivación microbiana (Shah y col., 2016).

El uso de la irradiación UV-C junto a la aplicación de temperatura moderada podría, dentro de una estrategia multiobjetivo, acrecentar la seguridad y estabilidad microbiológica de los jugos superando las limitaciones de los tratamientos UV-C simples, puesto que estas tecnologías poseen distintos mecanismos de inactivación.

El objetivo general de esta tesis consiste en evaluar distintos aspectos relacionados a la eficacia del procesamiento de jugos frutihortícolas turbios mediante el uso de luz UV-C simple y asistida por temperatura moderada para la inactivación y/o inhibición de múltiples microorganismos patógenos y deteriorativos de alimentos. Este objetivo contempla desarrollar una tecnología de procesamiento mínima, que provoque mínimos cambios en la

calidad organoléptica y sensorial del jugo a la vez de resultar económicamente ventajosa en comparación a las tecnologías térmicas tradicionales para la preservación de alimentos líquidos.

La tesis está organizada en las siguientes partes:

1. Determinación de parámetros físico-químicos relativos a la matriz alimentaria (jugo mezcla de zanahoria-naranja) usada en los experimentos. Determinación de parámetros de funcionamiento de un reactor de luz UV-C continuo.
2. Estudio del procesamiento con luz UV-C simple (20 °C) de un jugo mezcla de zanahoria-naranja. Estudio del procesamiento con luz UV-C asistida por temperatura moderada (UV-C/T: 40, 45 y 50 °C) de un jugo mezcla de zanahoria-naranja.
3. Optimización de las variables de procesamiento UV-C/T (*tiempo, temperatura*). Estudio del daño microbiano para el tratamiento óptimo y sus controles simples mediante diversas metodologías.
4. Estudio de la evaluación de la flora nativa (mesófilos aerobios, hongos y levaduras, coliformes totales) del jugo procesado con UV-C/T y sus respectivos controles a lo largo de su almacenamiento refrigerado. Estudios de impacto del tratamiento óptimo sobre parámetros de calidad organoléptica, físico-química y sensorial del jugo zanahoria-naranja.

2.2. Objetivos específicos

Primera parte

- Caracterizar el jugo mezcla de zanahoria-naranja empleado en la tesis en función de ciertos parámetros físico-químicos que influyen su procesamiento por luz UV-C asistida por temperatura moderada: pH, ° Brix, turbidez, distribución de tamaño de partícula y coeficiente de absorción UV.
- Definir ciertos parámetros operativos como el número de Reynolds, la dosis de UV-C emitida por radiometría, y la dosis de UV-C absorbida por la muestra mediante actinometría de un reactor UV-C de flujo continuo.
- Determinar la distribución de tiempos de residencia dentro del reactor y de la dosis de UV-C incidente sobre un microorganismo de referencia en el reactor mediante la técnica de biodosimetría.

Segunda parte

- Evaluar la efectividad del tratamiento usando luz UV-C simple (20 °C) en un jugo fresco de zanahoria-naranja sobre la inactivación de algunos microorganismos patógenos y deteriorativos típicos de jugos (obtención de curvas de inactivación).
- Evaluar la efectividad del tratamiento UV-C asistido por temperatura moderada (UV-C/T: 40, 45 y 50 °C) sobre la inactivación microbiana. Caracterizar la interacción (aditiva, sinérgica o antagónica) de las dos tecnologías empleadas e identificar situaciones sinérgicas y aditivas del enfoque de obstáculos (“hurdle technology”) para la preservación de alimentos.
- Modelar la cinética de inactivación de los microorganismos inoculados en el jugo mezcla zanahoria-naranja tratados con UV-C simple o UV-C/T mediante el empleo de herramientas de microbiología predictiva. Analizar la efectividad de los tratamientos según los parámetros obtenidos provenientes de los modelos aplicados y evaluar cuáles modelos presentaron un mejor ajuste a los datos experimentales obtenidos.
- Optimizar las variables tiempo y temperatura de procesamiento para los distintos tratamientos UV-C/T mediante la metodología de superficies de respuesta (MSR), para seleccionar la mejor condición para los estudios subsiguientes.
- Determinar la energía eléctrica por orden (E_{EO}) para la inactivación de cada cepa estudiada a fin de determinar la energía implicada en el tratamiento UV-C y su eficiencia.

Tercera parte

- Estudiar el estado fisiológico de las células de *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 sometidas al tratamiento UV-C/T óptimo (UV-C/T:50 °C) y sus controles simples (T: 50 °C, UV-C) por medio de las técnicas de citometría de flujo (CF).
- Analizar el daño microbiano causado a las células de *S. cerevisiae* KE 162 inoculadas en jugo mezcla de zanahoria-naranja y en agua peptonada tratadas con UV-C simple, T:50 °C simple, y UV-C/T asistido mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión (MET).

Cuarta parte

- Examinar ciertos parámetros de calidad organoléptica (contenido de polifenoles, actividad antioxidante total, turbidez, ° Brix, pH, color) para el jugo de zanahoria-naranja procesado con el tratamiento UV-C/T óptimo, para los controles simples y para el jugo sin tratar a lo largo de su almacenamiento refrigerado.
- Estudiar la evolución de la flora nativa para el jugo de zanahoria-naranja tratado con UV-C/T y los diversos controles durante su almacenamiento refrigerado.
- Realizar estudios sensoriales con el objetivo de evaluar la aceptabilidad del jugo de zanahoria-naranja procesado con UV-C/T, evaluando también la intensidad y el punto adecuado de ciertas características para los atributos más importantes del producto.
- Describir la bebida propuesta (jugo de zanahoria-naranja procesado con UV-C/T) en términos de sus atributos sensoriales y no sensoriales, definiendo el consumidor blanco al cual podría dirigirse el producto.



3. Materiales y métodos

3. Materiales y Métodos

3.1. Materia prima

Para todos los ensayos se empleó jugo de naranja natural de la variedad Valencia (*Citrus x sinensis*, var. Valencia).

Para aquellos ensayos que involucraron jugo de zanahoria, se usó la variedad Chantenay (*Daucus carota*, var. Chantenay).

Tanto las naranjas como las zanahorias fueron adquiridas en un mercado local (COTO, Buenos Aires, Argentina).

3.2. Reactivos

- ❖ Extracto de levadura (YE, Biokar Diagnostics, Beauvois, Francia).
- ❖ Yoduro de propidio ($C_{27}H_{34}I_2N_4$) (PI, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Estados Unidos).
- ❖ Fluoresceína diacetato (FDA, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Estados Unidos).
- ❖ Acetona (C_3H_6O) (Biopack, Zárate, Buenos Aires, Argentina).
- ❖ Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) (Anedra, Tigre, Buenos Aires, Argentina).
- ❖ Ácido gálico ($C_7H_6O_5$) (Biopack, Zárate, Buenos Aires, Argentina).
- ❖ Reactivo de Folin-Ciocalteu (Biopack, Zárate, Buenos Aires, Argentina).
- ❖ Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) (Biopack, Zárate, Buenos Aires, Argentina).
- ❖ 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) (DPPH, Merck, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos).
- ❖ Metanol (CH_3OH) (Biopack, Zárate, Buenos Aires, Argentina).
- ❖ Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico ($C_{14}H_{18}O_4$) (Trolox, Merck, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos).
- ❖ Yodato de Potasio (KIO_3) (Biopack, Zárate, Buenos Aires, Argentina).
- ❖ Yoduro de Potasio (KI) (Biopack, Zárate, Buenos Aires, Argentina).
- ❖ Cloruro de Sodio (NaCl) (Biopack, Zárate, Buenos Aires, Argentina).
- ❖ Estándar AMCO Clear 100 NTU (LaMotte, Chestertown, Maryland, Estados Unidos).

- ❖ Estándar Formazina 4000 NTU (LaMotte, Chestertown, Maryland, Estados Unidos).
- ❖ Glutaraldehído ($C_5H_8O_2$) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Estados Unidos).
- ❖ Epon 812 (Shell Chemical Company, Houston, Texas, Estados Unidos).
- ❖ Metanol para titulación Karl Fischer (CH_3OH) (CombiMethanol, Merck, Nueva Jersey, Estados Unidos).
- ❖ Hydranal Titrant Composite 5 (Riedel-de Haën, Seelze, Hannover, Alemania).
- ❖ Sodio fosfato dibásico anhidro (Na_2HPO_4) (Anedra, Tigre, Buenos Aires, Argentina).
- ❖ Potasio fosfato monobásico anhidro (KH_2PO_4) (Biopack, Zárate, Buenos Aires, Argentina).
- ❖ Cloruro de potasio (KCl) (Anedra, Tigre, Buenos Aires, Argentina).
- ❖ Acetato de uranilo ($UO_2(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Estados Unidos).
- ❖ Citrato de plomo ($C_{12}H_{10}O_{14}Pb_3$) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Estados Unidos).

3.3. Medios de cultivo

- ❖ **Triptona Soja Agar (TSA, Biokar Diagnostics, Beauvois, Francia).** Composición (g/L): triptona 15 g; digestión papaíca de porotos de soja 5 g; cloruro de sodio 5 g; agar bacteriológico 15 g. pH del medio preparado=7,3±0,2.
- ❖ **Triptona Soja Caldo (TSB, Biokar Diagnostics, Beauvois, Francia).** Composición (g/L): triptona 17 g; digestión papaíca de porotos de soja 3 g; glucosa 2,5 g; fosfato dipotásico 2,5 g; cloruro de sodio 5 g. pH del medio preparado=7,3±0,2.
- ❖ **Agua Peptonada Bufferada (AP, Laboratorios Britania, Ciudad de Buenos Aires, Argentina).** Composición (g/L): peptona 10 g; cloruro de sodio 5 g; fosfato disódico 3,5 g; fosfato monopotásico 1,5 g. pH del medio preparado=7,2±0,2.
- ❖ **Agar Sabouraud Dextrosa (Agar SAB, Biokar Diagnostics, Beauvois, Francia).** Composición (g/L): dextrosa monohidratada 40 g; productos

digestión pancreática de tejidos animales 5 g; productos digestión pancreática de la caseína 5 g; agar bacteriológico 15 g. pH del medio preparado=5,6±0,2.

❖ **Caldo Sabouraud Dextrosa (Caldo SAB, Biokar Diagnostics, Beauvois, Francia).** Composición (g/L): triptona 5 g; productos de la digestión péptica de carne 5 g; dextrosa 20 g. pH del medio preparado=5,6±0,2.

❖ **Agar nutritivo (NA, Biokar Diagnostics, Beauvois, Francia).** Composición (g/L): triptona 5 g; extracto de carne 3 g; agar bacteriológico 12 g. pH del medio preparado=7,0±0,2.

❖ **Caldo nutritivo (NB, Biokar Diagnostics, Beauvois, Francia).** Composición (g/L): triptona 10 g; extracto de carne 5 g; cloruro de sodio 5 g. pH del medio preparado=7,2±0,2.

❖ **Agar de Recuento en Placa (PCA, Biokar Diagnostics, Beauvois, Francia).** Composición (g/L): triptona 5 g; extracto de levadura 2,5 g; glucosa 1 g; agar bacteriológico 12 g. pH del medio preparado=7,0±0,2.

❖ **Agar cloranfenicol-glucosa (CGA, Biokar Diagnostics, Beauvois, Francia).** Composición (g/L): extracto de levadura 5 g; glucosa 20 g; cloranfenicol 0,1 g; agar bacteriológico 15 g. pH del medio preparado=6,6±0,2.

❖ **Agar violeta rojo bilis (VRBL, Biokar Diagnostics, Beauvois, Francia).** Composición (g/L): productos digestión péptica de carne 7 g; extracto de levadura 3 g; lactosa 10 g; sales de bilis 1,5 g; cloruro de sodio 5 g; rojo neutral 0,03 g; cristales violetas 0,002 g; agar bacteriológico 12 g. pH del medio preparado=7,4±0,2.

3.4. Microorganismos utilizados en los experimentos

Para los estudios de reto microbiano en la aplicación de tratamientos de luz ultravioleta de onda corta individual (UV-C), temperatura moderada individual (T:50 °C), o luz ultravioleta asistida por temperatura moderada (UV-C/T), se usaron los siguientes microorganismos: *Escherichia coli* ATCC 35218, *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 y *Pseudomonas fluorescens* ATCC 49838. Además, *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 fue usada para evaluar daño microbiano mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) y citometría de flujo (CF).

Las cepas fueron adquiridas en Medica-Tec SRL (Ciudad de Buenos Aires, Argentina). La cepa de *Escherichia coli* fue sembrada en estrías de medio triptona soja agar

(1,5 % m/v) adicionado con extracto de levadura (TSAYE: 0,6 % m/v). *Saccharomyces cerevisiae* fue sembrada en estrías de medio agar Sabouraud (SAB: 1,5 % m/v); mientras que *Pseudomonas fluorescens* en estrías de agar nutritivo (NA: 1,5 % m/v). A partir de esas estrías, se tomó una colonia de cada una de las cepas y se las sembró en tubos picos de flauta conteniendo los medios de crecimiento especificados. Los tubos de *E. coli* se incubaron a 37 °C (24 horas), mientras que los de *S. cerevisiae* a 27 °C (48 horas) y los de *P. fluorescens* a 30 °C (24 horas), manteniéndolos refrigerados posteriormente a 4 °C para su futuro empleo.

3.5. Preparación de inóculos

Los inóculos de *Escherichia coli* ATCC 35218 fueron preparados tomando muestras con un ansa estéril de tubos de cultivo stock (**Sección 3.4**). Las muestras fueron adicionadas a frascos Erlenmeyer conteniendo 20 mL de caldo triptona soja (TSB, Biokar Diagnostics, Beauvois, Francia) al 3 % (m/v) adicionados con 0,6 % (m/v) de extracto de levadura. Estos inóculos fueron incubados bajo agitación continua por 18 horas hasta alcanzar la fase estacionaria.

De modo similar, se prepararon los inóculos de *Saccharomyces cerevisiae* KE 162, transfiriendo una muestra de un cultivo stock en 20 mL de caldo Sabouraud (Caldo SAB, Biokar Diagnostics, Beauvois, Francia) al 3 % (m/v). La incubación se realizó a 27 °C por 24 horas.

Para *Pseudomonas fluorescens* ATCC 49838, se siguió la misma metodología usando 20 mL de caldo nutritivo (NB, Biokar Diagnostics, Beauvois, Francia) al 2 % (m/v). La incubación se efectuó a 30 °C por 27 horas.

Los inóculos finales empleados fueron obtenidos por centrifugación a 1475 *g* por 5 minutos (Labnet, Edison, Nueva Jersey, Estados Unidos) y lavados dos veces con agua peptonada (AP, Britania, Buenos Aires, Argentina) al 0,1 % (m/v) para obtener una densidad celular final de 10^7 - 10^9 UFC mL⁻¹.

3.6. Obtención de los jugos simples y el jugo mezcla de zanahoria-naranja

El jugo de zanahoria fue obtenido manualmente bajo condiciones asépticas de trabajo. Para ello, se trabajó en un cuarto separado. La mesada fue sanitizada usando alcohol etílico al 70 % (v/v) y se descontaminó la superficie mediante el encendido de una lámpara UV-C (10 minutos). Además, se procedió a sanitizar la juguera doméstica usada (Ju655,

Moulinex, Taipéi, Taiwán, China). Para la obtención del jugo de naranja fresco, se empleó una exprimidora doméstica (Arno, San Pablo, San Pablo, Brasil) previamente desinfectada.

Tanto las naranjas como las zanahorias fueron santizadas previo a la obtención del jugo para reducir su microflora nativa superficial. Para ello, se hizo un enjuague en una solución al 5 % (v/v) de hipoclorito de sodio por 10 minutos y luego en agua estéril. El enjuague con soluciones diluidas de hipoclorito de sodio de la fruta y verdura previo a la aplicación de un tratamiento de preservación es una práctica estándar (Akusu y col., 2016; Ochoa-Velasco y col., 2018.b). En el caso del jugo de zanahoria, se lo filtró usando dos capas de una muselina de seda estéril para reducir su cantidad de partículas suspendidas (Jabbar y col., 2014). El jugo de naranja fue centrifugado por 10 minutos a 157 *g* a temperatura ambiente (Rolco AMC 3550, Ciudad de Buenos Aires, Argentina) para reducir la cantidad de pulpa. Para obtener la mezcla de jugos, se mezclaron ambos en una proporción 1:1 (v/v).

Para estandarizar las muestras del jugo mezcla de zanahoria-naranja a emplear en los ensayos de reto microbiano, se ajustó su pH a $3,8 \pm 0,2$ usando una solución de ácido cítrico al 20 % (m/v).

El jugo mezcla de zanahoria-naranja empleado para la evaluación del daño microbiano mediante las técnicas de citometría de flujo (CF) y microscopía electrónica de transmisión (MET) fue preparado mezclando proporciones iguales de cada uno de los jugos (50:50) y centrifugando la mezcla resultante a 4588 *g* (Eppendorf 5804 R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a 5 °C durante 10 minutos a fin de reducir la cantidad de pulpa presente en el mismo. Luego, se ajustó a $\text{pH}=3,8 \pm 0,2$ empleando una solución al 20 % (m/v) de ácido cítrico.

El jugo mezcla de zanahoria-naranja usado para los estudios de reto microbiano fue pretratado térmicamente a 70 °C en un tubo helicoidal encamisado por 13 minutos, con el fin de reducir la microflora nativa. Para determinar el tiempo de procesamiento necesario para lograr una reducción considerable (de al menos, 2 ciclos logarítmicos) de la flora nativa, se tomaron muestras de jugo de zanahoria tratadas térmicamente a ciertos tiempos (0-15 min) y se las sembró en placas de Petri con medio PCA al 2 %.

El tubo helicoidal fue conectado a un baño termostático hasta que se alcanzó una temperatura final de pre-tratamiento de $70 \pm 1^\circ\text{C}$ (**Fig. 3.1**) (HAAKE, Mess-Technik, Karlsruhe, Baden-Wurtemberg, Alemania). Se vigiló la temperatura con una termocupla tipo T. Los jugos tratados fueron recolectados en botellas de vidrio caramelo estériles y

mantenidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un ultrafreezer (MDF-U55V, Panasonic Biomedical, Gunma, Japón) hasta su uso.

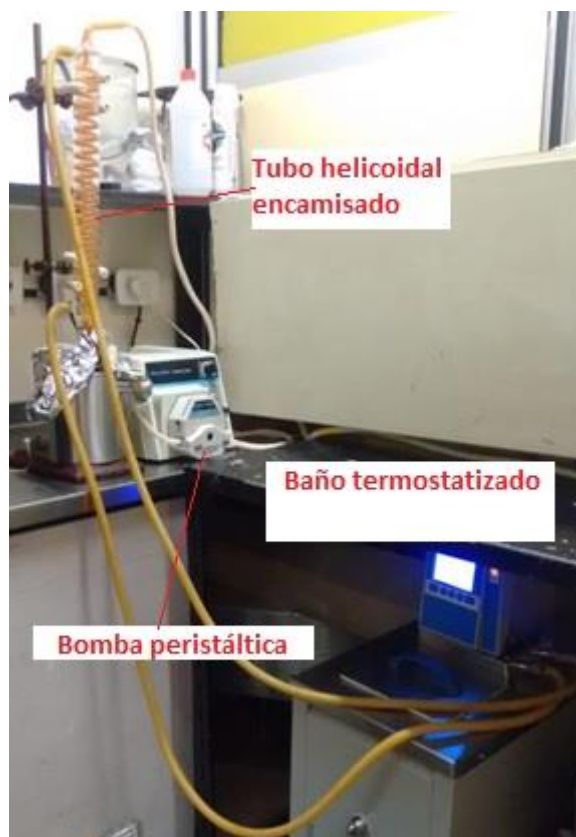


Figura 3.1. Fotografía del sistema de tubo helicoidal encamisado usado para los tratamientos térmicos.

3.7. Caracterización físico-química de los jugos

Para la caracterización físico-química de los jugos individuales y del jugo mezcla se usaron muestras sin inocular ni tratar mantenidas en frascos caramelo de 10 mL estériles y refrigeradas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, sin dejar transcurrir más de 30 minutos pasada su obtención. Además, se caracterizaron muestras del jugo mezcla sometidas a los tratamientos simples (UV-C; T: $50\text{ }^{\circ}\text{C}$) y con UV-C/T: $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (óptimo de asistencia) a lo largo de su almacenamiento con refrigeración. Estas mediciones se realizaron periódicamente durante 13 a 21 días de almacenamiento refrigerado ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$), graficando los datos en función del día de almacenamiento. Todas las mediciones se hicieron por triplicado.

3.7.1. pH

Se midió el pH de los jugos individuales y del jugo mezcla de zanahoria-naranja, empleando un pH metro PerpHect pH/ISE modelo 310 (Orion Research Inc., Beverly, Massachusetts, Estados Unidos). Se calibró el equipo cada vez que se lo usó con soluciones buffer de pH=7,0 y pH=4,0.

3.7.2. Sólidos solubles (° Brix)

La concentración de sólidos solubles de los jugos se midió con un refractómetro digital PR-101 Palette (ATAGO Co., Japón).

3.7.3. Turbidez

La turbidez de los jugos fue determinada con un turbidímetro (LaMotte 2020we, Chestertown, Maryland, Estados Unidos) y se expresó en unidades nefelométricas (NTU). Se usaron estándares AMCO Primary Turbidity de 100 NTU y de Formazina de 4000 NTU. Con el objetivo de que las muestras de jugo de zanahoria y de jugo mezcla de zanahoria-naranja entraran en el rango de medición del patrón de 4000 NTU, se las diluyó en relación 1:1 con agua destilada y se procedió a multiplicar el valor de turbidez medido por el factor de dilución para obtener la turbidez final de cada muestra.

3.7.4. Coeficiente de absorción UV

Para obtener el coeficiente de absorción UV de los jugos, se realizaron múltiples diluciones de cada uno en agua destilada. Luego, se determinó la absorbancia a 254 nm usando cubetas de cuarzo (longitud óptica: 1 cm) en un espectrofotómetro UV-VIS (V-630, Jasco, Tokio, Japón). La pendiente de la línea de regresión lineal del gráfico de absorbancia versus concentración de muestra (% v/v) se consideró como el coeficiente de absorción. Este coeficiente no se relaciona con la absorptividad molar, dado que la concentración no se expresa en mol/L (Oteiza y col., 2010).

3.7.5. Tamaño de partícula

Para la caracterización físico-química de los jugos, se utilizaron muestras de jugo de zanahoria individual sin tratar, naranja individual sin tratar y del jugo mezcla de zanahoria-naranja sin tratar (control) y sin inocular.

El tamaño de partícula de los jugos se determinó en el rango de los 0,1-1000 nm con un medidor de dispersión de luz estática (DEL) modelo Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, Reino Unido). La velocidad de la bomba del equipo se fijó en 1800 rpm, y un índice de refracción (IR) de 1,35 con un parámetro de absorción de 0,1 fueron usados según las sugerencias para muestras coloreadas.

A partir de los datos obtenidos para las tres matrices frutihortícolas, se calculó la media del tamaño de la distribución de partículas en volumen [$D_{4,3}$], y la media del tamaño de la distribución de partículas en superficie [$D_{3,2}$] (**Ec. 3.1 y 3.2**):

$$(3.1) \quad D_{3,2} = \frac{\sum_i [n_i \times d_i^3]}{\sum_i [n_i \times d_i^2]}$$

$$(3.2) \quad D_{4,3} = \frac{\sum_i [n_i \times d_i^4]}{\sum_i [n_i \times d_i^3]}$$

Donde n_i es el número de partículas de diámetro d_i (Corredig y col., 2001).

Por otra parte, se determinó el tamaño de partícula de la solución de agua peptonada al 0,1 % (m/v). El tamaño de partícula fue determinado en el rango de 0,6 nm–6 μ m mediante un medidor de dispersión dinámica de luz (DDL) a 20 °C (Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Las mediciones se efectuaron a un ángulo de dispersión fijo de 173°. La relación entre el tamaño de partícula y el coeficiente de difusión es definida mediante la ecuación de Stokes-Einstein (**Ec. 3.3**).

$$(3.3) \quad d(H) = \frac{k \times T}{3 \times \pi \times \eta \times D}$$

Donde, $d(H)$ es el diámetro hidrodinámico (m); D es el coeficiente de difusión traslacional ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$); k es la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ N m K}^{-1}$); T es la temperatura absoluta (K); y η es la viscosidad del solvente (N s m^{-2}).

La distribución de intensidad en tamaño fue convertida en una distribución en volumen aplicando la teoría de Lorenz-Mie-Debye para partículas esféricas (Malvern Instruments, 2004).

Con el objetivo de poder comparar los tamaños de partícula de las distribuciones obtenidas usando el equipo de dispersión de luz estática con aquellos determinados por el de dispersión de luz dinámica, se emplea el valor del pico máximo de la distribución: $D(\text{nm})$.

3.8. Equipo de luz UV-C

El reactor de luz ultravioleta de onda corta (UV-C) empleado en esta tesis para el tratamiento de los jugos fue ensamblado previamente en el laboratorio (**Fig. 3.2 y Esq. 3.1**) y consistió en dos lámparas UV-C conectadas en serie (TUV-30W, 253,7 nm, Philips, Ámsterdam, Países Bajos). Cada lámpara se hallaba dentro de un tubo de vidrio (Industria Argentina Vidriera Sacifei, Ciudad de Buenos Aires, Argentina) de 0,87 m de longitud, dejando un espacio de flujo anular (diámetro externo=0,031 m; diámetro interno=0,024 m; volumen=0,22 L), usado como el recinto de irradiación. La entrada y salida de fluidos del reactor se efectuó usando mangueras flexibles autoclavables (L/S 24, Cole-Parmer, Masterflex, Barrington, Illinois, Estados Unidos), que descargaban dentro de un vaso doblemente encamisado conectado a un baño termostático (HAAKE, Mess-Technik, Karlsruhe, Baden-Wurtemberg, Alemania) para lograr la temperatura de tratamiento necesaria en cada caso.

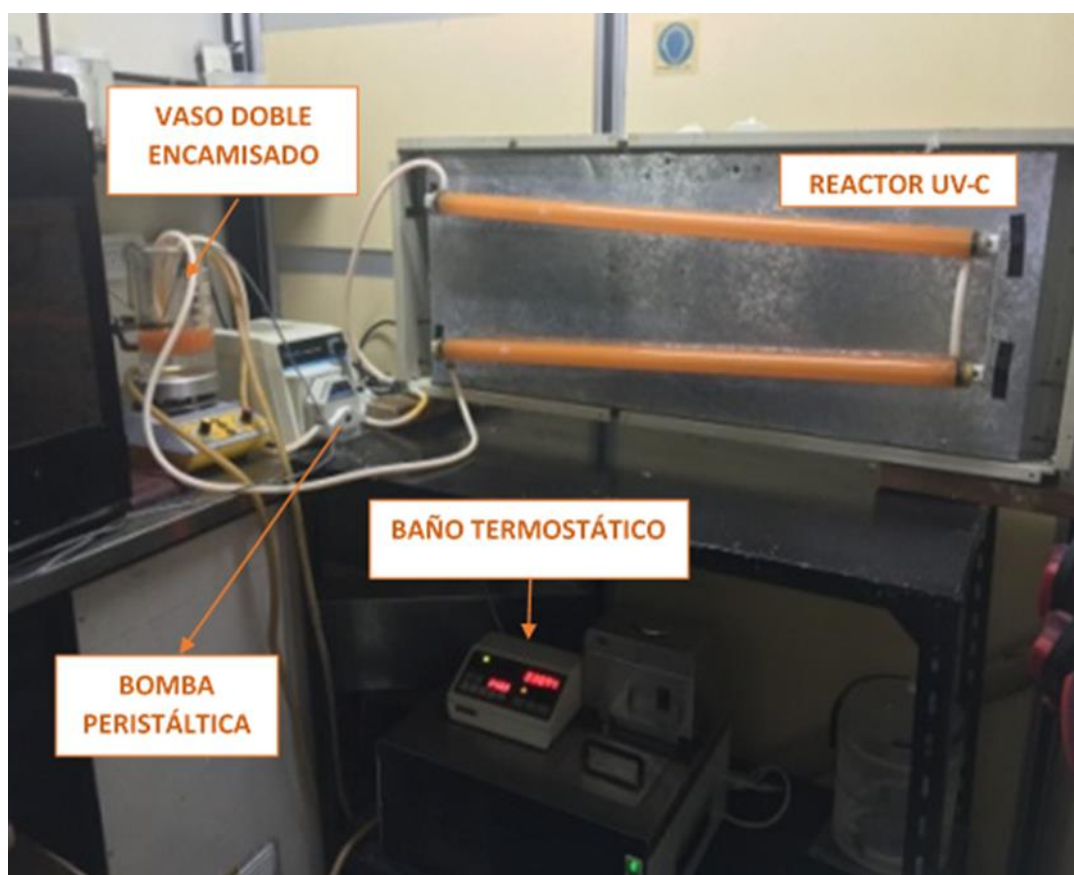
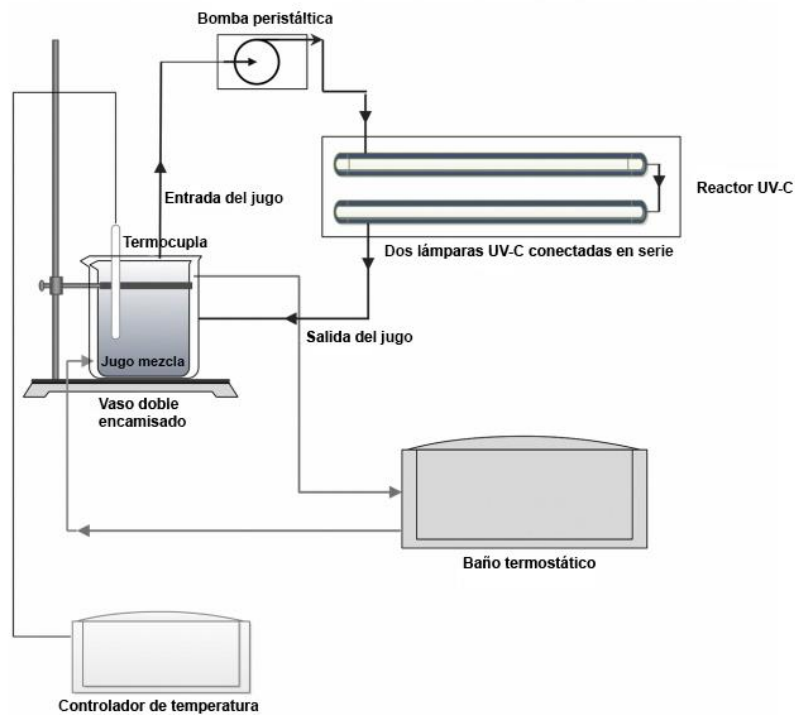


Figura 3.2. Foto del reactor UV-C utilizado para la realización de los experimentos.



Esquema 3.1. Esquema del reactor UV-C usado en los experimentos.

3.8.1. Cálculo del número de Reynolds

El número de Reynolds (Re) es definido como la relación entre las fuerzas inerciales (convectivas) y las fuerzas viscosas existentes en un fluido. Este número adimensional permite establecer si un flujo es laminar o turbulento (Koutchma y col., 2009). El número de Reynolds para un fluido circulando dentro de un tubo concéntrico se conoce como Re hidrodinámico (Re_h) (Ec. 3.4).

$$(3.4) \quad Re_h = \frac{D_h \times \rho \times v}{\mu}$$

Siendo:

- ρ = densidad del fluido.
- v = velocidad media del flujo.
- D_h = diámetro hidráulico ($D_h = 2 * d$, siendo d : el ancho del espacio anular entre los dos tubos concéntricos).
- μ = viscosidad dinámica del fluido.

Para la determinación del Re hidrodinámico, se usaron los datos correspondientes a un jugo de zanahoria modelo ($\mu_{25^{\circ}\text{C}}=0.00132 \text{ Pa}\cdot\text{s}$; $\rho=1032 \text{ kg/m}^3$) (Alvarado, 1993). Por otro lado, se determinó la velocidad media del flujo ($v=0,093 \text{ m/s}$) en el reactor UV-C a partir de su caudal de alimentación ($F_v=1,8 \text{ L/min}$) y de su área anular (**Ec. 3.5**).

$$(3.5) \quad v = \frac{F_v}{A}$$

Por su lado, se determinó el área anular ($A=0,000302225 \text{ m}^2$) del reactor UV-C construido en el laboratorio mediante la siguiente expresión (**Ec. 3.6**):

$$(3.6) \quad A = \left(\frac{\pi}{4} \times D_e^2\right) - \left(\frac{\pi}{4} \times D_i^2\right)$$

En donde, D_e es el diámetro externo del tubo concéntrico del reactor, mientras que D_i es el interno.

En conductos cilíndricos y tuberías si el número de Reynolds resulta inferior a 2000, el flujo es considerado laminar. Mientras que, para valores superiores a 4000, el flujo es considerado turbulento.

3.8.2. Energía eléctrica por orden (E_{EO})

La energía eléctrica por orden (E_{EO}) es la energía eléctrica en horas kilovatio (kWh) necesaria para reducir la carga microbiana presente en 1 m^3 de muestra contaminada en un orden de magnitud. La E_{EO} fue calculada para determinar la energía implicada para llevar a cabo los tratamientos con luz UV-C simple, temperatura moderada simple, y UV-C/T asistida y su eficiencia.

Los valores de E_{EO} se estimaron usando las ecuaciones propuestas para operaciones de flujo continuo en sistemas que funcionan con energía eléctrica (Bolton y col., 2001). Los valores de E_{EO} [kWh/ m^3 /orden] para sistemas continuos son determinados empleando la siguiente expresión (**Ec. 3.7**):

$$(3.7) \quad E_{EO} = \frac{P}{F \times \log\left(\frac{c_i}{c_f}\right)}$$

Siendo:

- P: potencia (kW) del sistema implicado.
- F: tasa de flujo del fluido circulando por el sistema (m^3/h).

- c_i : concentración microbiana inicial del fluido circulando por el reactor UV.
- c_f : concentración microbiana final del fluido circulando por el reactor UV.

3.9. Caracterización de la dosis de UV-C del reactor

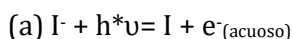
3.9.1. Determinación de la irradiancia UV-C mediante radiómetro

Se determinó la dosis de UV-C entregada por cada una de las lámparas (irradiancia) del reactor empleando un radiómetro (Melles Griot, modelo 13 PEM 001, Boulder, Colorado, Estados Unidos). Para obtener la dosis de UV-C entregada individual, se procedió a medir por triplicado con el radiómetro en tres posiciones distintas: extremo izquierdo, centro y extremo derecho apoyando el sensor sobre la lámpara ($r=0,00$ m). El valor adoptado fue el medido en la posición central, ya que es un mejor reflejo de la dosis entregada verdadera que la de los extremos del reactor. Como resultado, la irradiancia UV-C reportada según radiometría corresponde al promedio de las determinaciones para cada lámpara multiplicado por el tiempo de exposición (15 minutos).

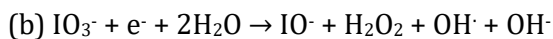
3.9.2. Determinación de la dosis de UV-C absorbida por la muestra por actinometría

Para obtener el valor de dosis de UV-C absorbida por una muestra según la técnica de actinometría, se aplicó la técnica descrita por Rahn (1997), adaptada para una operación de procesamiento de flujo continuo (Char y col., 2010). Se utilizó como actinómetro químico una solución 0,6 M de yoduro de potasio/0,1 yodato de potasio en 0,01 M de buffer borato (pH=9,25). La irradiación de esta solución al pasar por el reactor UV-C generó la formación del ion triyoduro, que se cuantificó midiendo su absorbancia a 352 nm.

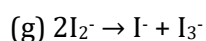
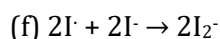
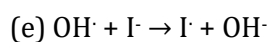
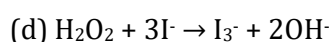
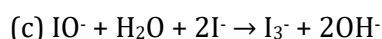
El yodato de potasio es usado como colector de electrones para cuantificar la radiación UV. La absorción de un fotón conduce a la generación de átomos de yodo y de un electrón solvatado:



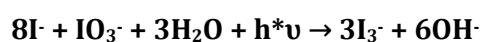
El iodato se reduce aceptando un electrón y la siguiente reacción se llevaría a cabo:



La formación de iones triyoduro se da mediante la siguiente serie de reacciones:



En consecuencia, la ecuación general para el conjunto de reacciones de la actinometría resulta:



Para calcular el rendimiento cuántico (ϕ) de las soluciones de yoduro y yodato de potasio empleadas en la actinometría, incorporando la dependencia de la concentración y de la temperatura, se emplea la **Ec. 3.8**:

$$(3.8) \quad \phi = 0,75[1 + 0,02(T - 20,7)][1 + 0,23(C - 0,577)]$$

En donde T representa la temperatura, mientras que C es la concentración de yoduro de potasio.

Contando con una expresión para obtener el rendimiento cuántico para el sistema yoduro-yodato, es posible pasar al cálculo de la dosis de luz UV incidente sobre el mismo. La solución de yoduro y yodato es preparada, y luego se mide su absorbancia a 300 y 352 nm antes de ser irradiada. La lectura del espectrofotómetro a 300 nm se usa para calcular la concentración de yoduro en la solución actinométrica (**Ec. 3.9**).

$$(3.9) \quad [\text{Yoduro}] (M) = \frac{1,061}{OD(300 \text{ nm})}$$

Siendo OD : la densidad óptica de la muestra.

Luego, la muestra es irradiada y se registra la temperatura. La concentración de yoduro y la temperatura se utilizan según la **Ec. 3.8** para calcular el rendimiento cuántico corregido. El aumento en la absorbancia a 353 nm se emplea para calcular la concentración (moles/L) de triyoduro usando $26400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ como el coeficiente de extinción molar para un camino óptico de 1 cm de longitud. Para obtener el número total de moles de producto (triyoduro) formados, se multiplica su concentración por el volumen (L) de la muestra. En

último lugar, se dividen os moles de producto por el rendimiento cuántico para obtener la cantidad de Einsteins de fotones absorbida por la solución irradiada:

$$(3.10) \quad E \left(\frac{\text{eisteins}}{L} \right) = \frac{\Delta OD_{352 \text{ nm}} \times 26400 \times Vol(L)}{\phi}$$

Para convertir el número de fotones incidentes en Julios, hay que multiplicar su número por la cantidad de energía por fotón. Si se asume que todos los fotones absorbidos por la muestra poseen una longitud de onda de 254 nm, este factor es de $4,72 \cdot 10^3$ J por Einstein de fotones. Para obtener la tasa de exposición en vatios, se divide el número de Julios por el tiempo de irradiación (s). Si se necesita la fluencia incidente en Julios por cm^2 , es necesario conocer el área de la muestra expuesta a la fuente de irradiación. Al dividir este área por la energía total absorbida por la muestra, se obtiene la energía UV por cm^2 absorbida por la muestra.

3.10. Distribución de tiempo de residencia y definición de la biodosis

3.10.1. Distribución de tiempos de residencia (DTR)

La técnica de estímulo-respuesta (Koutchma y col., 2004) mediante impulsión fue empleada con el fin de determinar la distribución de tiempos de residencia de los elementos de volumen dentro del reactor (DTR). Cuando se estabilizó el caudal del reactor (1,8 L/min), se inyectó una solución marcadora de cloruro de sodio al 5 % (m/v) en el centro de una pipa situada en el ingreso del reactor UV-C. La ubicación de la inyección de la solución se encontraba a 3 cm de distancia por fuera del ingreso del reactor. La conductividad de la solución de cloruro de sodio (Hanna Combo pH EC HI-98129, Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, Estados Unidos) del flujo de salida de la instalación fue determinada como función del tiempo tras la inyección. La concentración de cloruro de sodio se estableció a partir de la curva de calibración de sal armada en comparación con la conductividad. La distribución de la concentración de la curva de cloruro de sodio $c(t)$ se normaliza para obtener la curva $E(t)$ (Ec. 3.11). A partir de la curva $E(t)$, se calculó el tiempo de residencia medio \bar{t} (Ec. 3.12).

$$(3.11) \quad E(t) = \frac{c(t)}{\int_0^t c(t) dt}$$

$$(3.12) \quad \bar{t} = \int_0^t t \cdot E(t) dt$$

El tiempo de residencia teórico ($t = V/Q$) fue determinado a partir del volumen de llenado del reactor V y la tasa de flujo volumétrica Q . El cociente entre \bar{t} y t indica si el

volumen efectivo es bastante menor que el volumen real del reactor. Las diferencias en los tiempos teóricos y los medidos indican si el volumen efectivo es menor que el volumen de llenado de reactor. Los tiempos de residencia medidos son los usados en los cálculos subsiguientes para determinar la dosis de UV promedio para la solución modelo usada en la biodosimetría.

3.10.2. Distribución de dosis de UV-C: Biodosimetría

Para la obtención de la distribución de biodosis del reactor empleado en la tesis, se inyectaron 5 mL de un inóculo de *E. coli* ATCC 35218 en una corriente de flujo de jugo de manzana comercial (Baggio, Gualeguaychú, Entre Ríos, Argentina) en la entrada del tubo tras estabilizar el sistema. Se escogió un jugo claro con una baja absorbancia a 254 nm para obtener una inactivación microbiana notable tras un solo pasaje por el reactor UV-C. Las fracciones de jugo a la salida fueron recolectadas según una función dependiente del tiempo posterior a la inyección. Las muestras fueron tomadas cada 5 segundos, siendo sembradas en placa. La inyección se realizó dos veces: con las lámparas encendidas y con las mismas apagadas (**Fig. 3.3.a, b**).

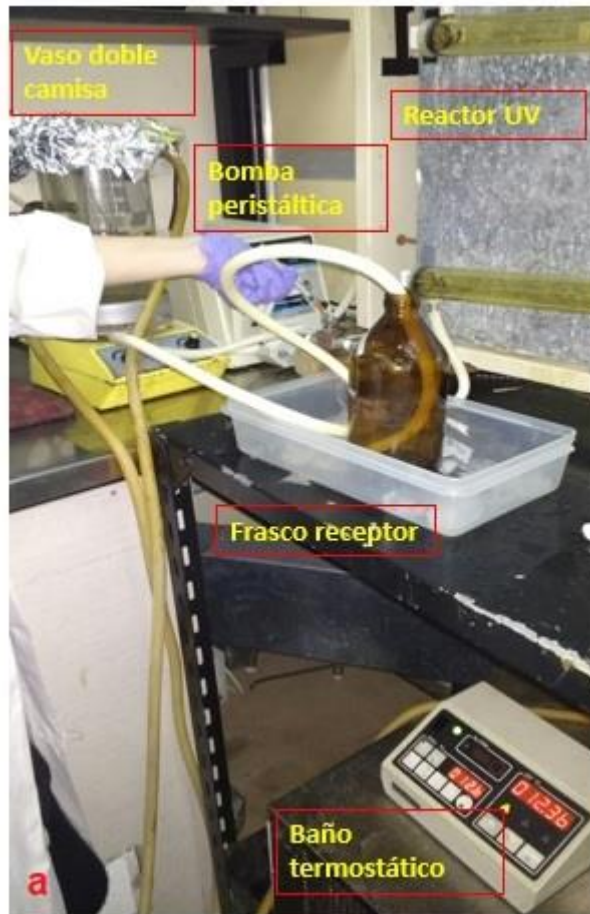


Figura 3.3.a, b. Fotografías del reactor UV-C adaptado para la determinación de la DTR y las experiencias de biosimetría.

La distribución de los elementos de volumen reflejó la distribución de tiempos de residencia (DTR); mientras que la distribución de las bacterias reflejó los efectos combinados que la DTR y la distribución de la irradiancia de la luz poseen sobre la exposición de los microorganismos a la radiación UV-C. La cantidad de bacterias inactivadas en cada fracción de volumen se obtuvo al restar el logaritmo de las concentraciones bacterianas en las soluciones de jugo irradiadas y no irradiadas a un dado tiempo tras la inyección y graficando versus el tiempo.

La curva de inactivación para *E. coli* se construyó graficando las reducciones logarítmicas obtenidas $[Log(N/N_0)]$ versus la dosis de UV. Por otro lado, D corresponde a la dosis de UV promedio.

Respecto a la determinación de la dosis de UV, la distribución de la irradiancia UV en una solución modelo debe considerarse ya que la dosis es absorbida por el medio en cuestión. La ecuación de Lambert-Beer permitió calcular la atenuación de la irradiancia de la luz UV (**Ec. 3.13**) en los puntos a lo largo del radio del reactor anular durante el procesamiento del jugo de manzana modelo.

$$(3.13) \quad I_r = I_0 * e^{(-\alpha(r-r_0))}$$

En la que I_r es la irradiancia UV (determinada mediante el uso de un radiómetro) a una distancia r respecto del centro; I_0 es la irradiancia en la superficie de la fuente UV; r es la distancia radial entre el centro de la fuente hasta el punto en donde se determina la irradiancia; r_0 es el radio de la lámpara UV; y α es el coeficiente de absorción UV del jugo de manzana modelo utilizado.

A partir de los datos correspondientes a la irradiación en los distintos puntos del reactor, fue posible determinar la irradiancia UV promedio (I_{av}) dentro del volumen de un reactor anular (**Ec. 3.14**).

$$(3.14) \quad I_{av} = \frac{\sum_{r_0}^r I_r * V_r}{V}$$

Por último, se calculó la dosis de UV de reducción equivalente requerida para inactivar la población de *E. coli* en un orden (dosis de UV D_{10}). Este parámetro representa la sensibilidad de un dado microorganismo a la luz UV-C considerando la distribución de la dosis de UV en el reactor y la distribución de tiempos de residencia. En consecuencia, la dosis de UV D_{10} fue obtenida multiplicando la irradiancia UV promedio (I_{av}) por el tiempo

de residencia medio (t_m), y dividiendo ambos por el logaritmo decimal de la inactivación bacteriana para todos los volúmenes parciales de elementos líquidos con distintos tiempos de residencia y normalizados respecto al tiempo (Koutchma y Parisi, 2004).

3.11. Estudios de reto microbiano

3.11.1. Tratamiento simple de luz UV-C (UV-C)

Los tratamientos UV-C hechos sin la asistencia de temperatura moderada corresponden a los tratamientos simples (UV-C). En los mismos, la temperatura fue programada usando el baño termostático a 20 °C conectado a una termocupla tipo T. Previo a los experimentos, las lámparas UV-C fueron encendidas durante 15 minutos para estabilizarlas y esterilizar el recinto de irradiación. Primero, se colocaron 745 mL del jugo de zanahoria-naranja o de agua peptonada, según el caso, dentro del vaso doblemente encamisado y se lo dejó estabilizar hasta llegar a los 20 °C. Luego, se hizo recircular el jugo a 1,8 L/min a través del reactor UV-C usando una bomba peristáltica (CPX-400, Cole Parmer, Vernon Hills, Illinois, Estados Unidos).

En las experiencias de reto microbiano y de estudio de daño microbiano por CF y MET, se agregaron 5 mL de inóculo con las lámparas UV-C apagadas y se dejó recircular el sistema por 2 minutos para asegurar un adecuado mezclado. Una vez encendidas las lámparas UV-C, se tomaron muestras entre los 0 y los 15 minutos para los distintos experimentos realizados (0,0-2032,0 mJ/cm²). Las muestras colectadas fueron guardadas en botellas de 10 mL de vidrio caramelo y refrigeradas a 4 °C previo a su procesamiento (menos de 20 minutos para los ensayos de reto microbiano y las experiencias de evaluación del estado fisiológico celular por CF y MET). Las experiencias fueron llevadas a cabo por triplicado.

3.11.2. Tratamientos térmicos utilizados

Por un lado, se realizó un tratamiento de pasteurización tradicional (T:80 °C) al jugo mezcla de zanahoria-naranja para poder establecer comparaciones con el jugo tratado con luz UV-C asistida por temperatura (UV-C/T) en la prueba de campo y la evaluación CATA del análisis sensorial. Este tratamiento representa un control de una pasteurización tradicional de jugos frutihortícolas, siendo similar a los jugos de zanahoria disponibles en el mercado (Vora y col., 1999). El jugo pasteurizado fue procesado a una temperatura de 80 ± 1°C por 6 minutos en un tubo de vidrio helicoidal encamisado (Industria Argentina Vidriera Sacifei, Ciudad de Buenos Aires, Argentina), conectado a un baño termostático. La

entrada y salida de fluidos del tubo helicoidal se efectuó usando una manguera flexible autoclavable (L/S 24, Cole-Parmer, Masterflex, Barrington, Illinois, Estados Unidos) conectada a una bomba peristáltica (CPX-400, Cole Parmer, Vernon Hills, Illinois, Estados Unidos), que descargaba dentro de un vaso. Durante este procesamiento, se vigiló la temperatura con una termocupla tipo T.

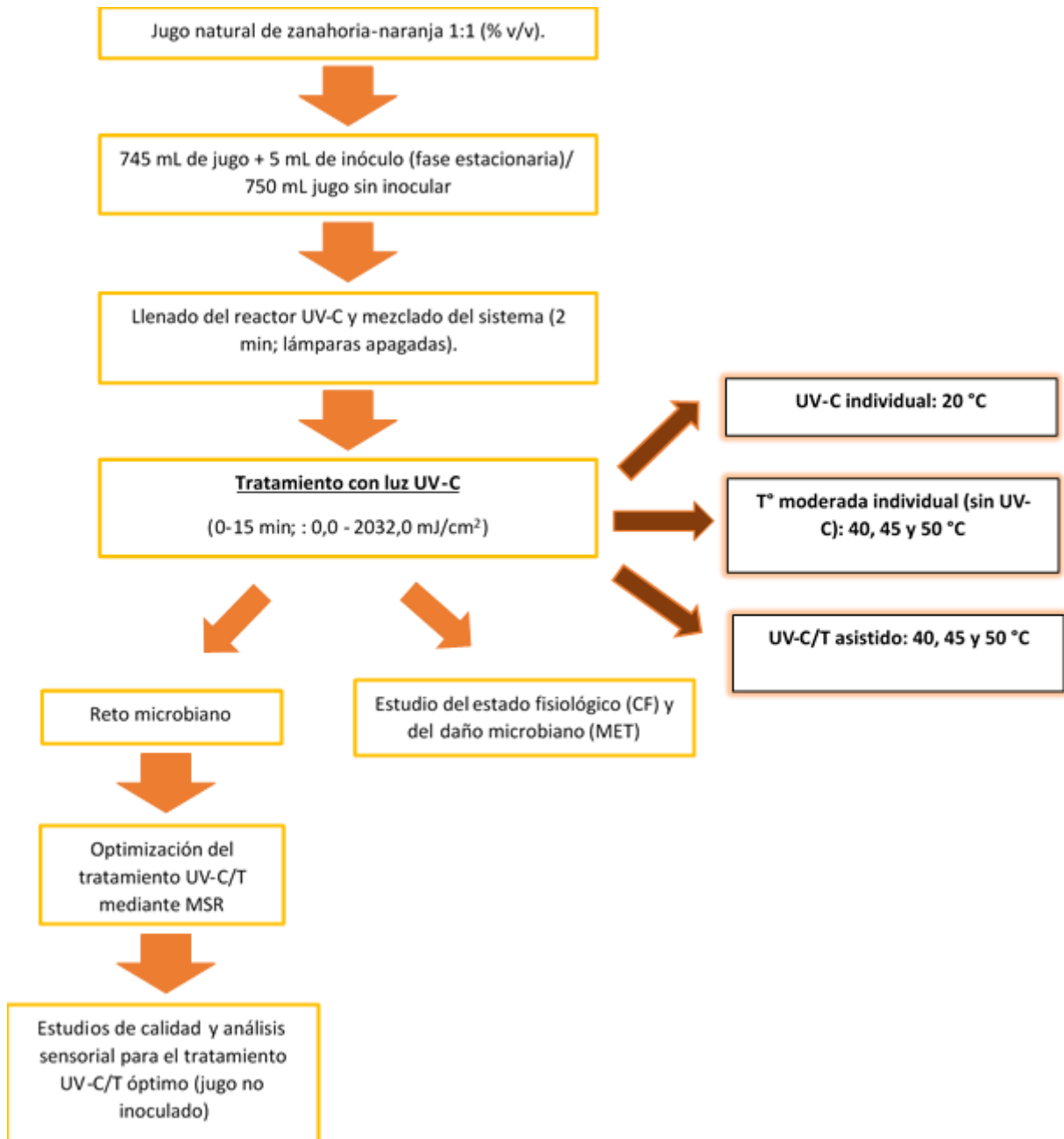
Por otro lado, se efectuaron tratamientos térmicos individuales al jugo mezcla de zanahoria-naranja empleando temperaturas moderadas (40, 45 y 50 °C) en el reactor UV-C. Estos tratamientos representaron un control del tratamiento térmico respecto de los tratamientos con UV-C simple y con UV-C/T asistido a 50 °C. Para el procesamiento del jugo y la extracción de muestras, se prosiguió con la metodología descrita para aquellos jugos procesados con UV-C simple (**Sección 3.11**).

3.11.4. Tratamiento de luz UV-C asistida por temperatura (UV-C/T)

Los tratamientos de luz ultravioleta efectuados a temperaturas de 40 °C, 45 °C y 50 °C corresponden a los asistidos por temperaturas moderadas (UV-C/T). La temperatura fue controlada durante los experimentos empleando un baño termostático programado a 40 °C, 45 °C o 50 °C, según el caso.

Para los tratamientos UV-C/T, las lámparas se encendieron por 15 minutos para estabilizarlas y esterilizar el recinto de irradiación. Se dispusieron 745 mL del jugo mezcla de zanahoria-naranja o de agua peptonada (según el caso) en el interior del vaso doblemente encamisado y se dejó estabilizar el sistema hasta alcanzar los 40 °C, 45 °C o 50 °C. Luego, se recirculó el jugo a 1,8 L/min a través del reactor UV-C usando una bomba peristáltica.

En las experiencias de reto microbiano y de estudio de daño microbiano por CF y MET, se agregaron 5 mL de inóculo con las lámparas UV-C apagadas y se procedió de la manera previamente descrita para las muestras procesadas con luz UV-C simple (**Sección 3.11**). Una vez encendidas las lámparas UV-C, se tomaron muestras entre los 0 y 15 minutos para los distintos experimentos realizados (0,0-2032,0 mJ/cm²). Las muestras fueron guardadas en frascos de 10 mL de vidrio caramelo e inmediatamente dispuestas en un baño con hielo. Las muestras fueron refrigeradas a 4 °C hasta su posterior análisis (menos de 20 min en los ensayos de reto microbiano (**Esq. 3.2**), en las experiencias de citometría de flujo y de MET). Todas las experiencias se realizaron por triplicado.



Esquema 3.2. Breve resumen de la metodología empleada para los ensayos involucrando los tratamientos con luz UV-C simple, temperatura moderada simple, y UV-C/T asistido del jugo mezcla de zanahoria-naranja.

3.11.5. Recuento microbiano

Cada muestra de los ensayos de reto microbiano fue diluida en serie en agua peptonada al 0,1 % (m/v) y sembrada en superficie sobre TSAYE para *E. coli*, NA para *P. fluorescens* y SAB agar para *S. cerevisiae* usando un plaqueador automático espiral (Autoplate 4000, Spiral Biotech, Norwood, Massachusetts, Estados Unidos). Cuando el

tratamiento dio como resultado un bajo recuento microbiano (a altos tiempos de procesamiento), hasta 3 mL de jugo mezcla de zanahoria-naranja fueron sembrados en profundidad. Las placas fueron incubadas por 24 horas a 37 °C (*E. coli*), 48 horas a 30 °C (*P. fluorescens*), y 48 horas a 27 °C (*S. cerevisiae*), respectivamente.

Se empleó una grilla de recuento para la enumeración de colonias en el caso de la siembra con plaqueador espiral. Las curvas de inactivación fueron generadas a partir de los datos experimentales al graficar $\text{Log}(N/N_0)$ versus el tiempo de tratamiento (0-15 minutos), siendo N el número de UFC/mL en un punto de tiempo y N_0 el número inicial de UFC/mL en la muestra.

3.11.6. Caracterización de la cinética de inactivación microbiana por modelado predictivo

Se usaron tres modelos para describir los datos de cinética de inactivación microbiana obtenidos: Weibull, Gompertz y Geeraerd. Los mismos fueron evaluados comparativamente respecto de su bondad de ajuste a los datos experimentales usando los criterios de raíz cuadrada de la media del error (RMSE), Akaike (AIC) y Bayesiano (BIC). Además, se reportan los valores para los coeficientes de determinación ajustados (R^2_{aj}).

Por otro lado, se empleó un análisis de componentes principales (PCA) para poder visualizar mejor la relación espacial entre la inactivación para cada sistema microorganismo-jugo y los parámetros de los tres modelos usados para describir las curvas de inactivación de los distintos tratamientos (**Sección 6.6.2**). Para llevar a cabo el modelado de las curvas de inactivación, la evaluación de bondad de ajuste y el PCA se empleó el programa InfoStat 2009 (Grupo InfoStat, FCA-UNC, Córdoba, Argentina).

3.11.6.a. Modelo de Weibull

Los datos de las pruebas de reto microbiano fueron ajustados empleando la expresión acumulativa de la distribución de resistencias de Weibull (Peleg y Cole, 1998):

$$(3.15) \quad S(t) = \text{Log}\left(\frac{N}{N_0}\right) = -b \times t^n$$

Siendo $S(t)$ la fracción de sobrevivientes a un tiempo dado, mientras que b y n son los parámetros de escala y forma, respectivamente. Estos parámetros se derivaron mediante regresión no lineal y se usaron para generar las curvas de frecuencia de resistencia (**Ec. 3.16**).

$$(3.16) \quad \frac{d\phi}{dt_c} = bnt_c^{n-1} \exp(-bt_c^n)$$

En la cual, t_c es una medida de resistencia o sensibilidad de la célula microbiana, mientras que $d\phi/dt_c$ es la distribución de Weibull correspondiente a t_c . Adicionalmente, existen varios parámetros estadísticos para caracterizar las frecuencias observadas (moda de la distribución, t_{cm} ; media, \bar{t}_c ; varianza, σ_{tc}^2 ; y el coeficiente de sesgo, v_1). Los mismos fueron calculados empleando las siguientes ecuaciones (Peleg y Cole, 1998):

$$(3.17) \quad t_{cm} = \left[\frac{(n-1)}{n} \times b \right]^{1/n}$$

$$(3.18) \quad \bar{t}_c = \left\{ \Gamma \left[\frac{(n+1)}{n} \right] \right\} / b^{1/n}$$

$$(3.19) \quad \sigma_{tc}^2 = \left\{ \Gamma \left[\frac{(n+2)}{n} \right] - \left(\Gamma \left[\frac{(n+1)}{n} \right] \right)^2 \right\} / b^{2/n}$$

$$(3.20) \quad v_1 = \frac{\left[\Gamma \left(\frac{n+3}{n} \right) / b^{3/n} \right]}{\left[\Gamma \left(\frac{n+2}{n} \right) / b^{2/n} \right]^{3/2}}$$

3.14.2.b. Modelo de Gompertz

Las curvas de inactivación fueron también ajustadas aplicando el modelo de Gompertz (Linton y col., 1995):

$$(3.21) \quad \text{Log} \left(\frac{N}{N_0} \right) = C \cdot e^{-e(A+B \cdot t)} - C \cdot e^{-e(A)}$$

Los parámetros estimados (A , B y C) encarnan las diferentes regiones de la curva de inactivación: (A), el hombro inicial [min]; (B), la máxima tasa de muerte [min^{-1}] y (C), el cambio total en el número de sobrevivientes [-].

3.14.2.c. Modelo de Geeraerd

Por otro lado, también se aplicó el modelo de Geeraerd para el modelado de las curvas de inactivación microbiana (Geeraerd y col., 2000):

$$(3.22) \quad \text{Log} (N) = \text{Log} \left[\left(10^{\text{Log}(N_0)} - 10^{\text{Log}(N_{res})} \right) \cdot e^{-k_{max} \cdot t} \cdot \left(\frac{e^{k_{max} \cdot SL}}{1 + (e^{k_{max} \cdot SL} - 1) \cdot e^{-k_{max} \cdot t}} \right) + 10^{\text{Log}(N_{res})} \right]$$

En el que k_{max} es la tasa de muerte [min^{-1}]; SL , la longitud del hombro; $\text{Log}(N_0)$, la población microbiana inicial; y $\text{Log}(N_{res})$, la población sobreviviente determinada tras el tratamiento. Las diferentes versiones de este modelo corresponden a las situaciones en las que $N_{res}=0$ (log-lineal con hombro y sin cola), o el caso de $SL=0$ (log-lineal con cola y sin hombro).

3.15. Estudios de daño microbiano causado por los tratamientos UV-C y UV-C/T

3.15.1. Estudio del daño microbiano por citometría de flujo (CF)

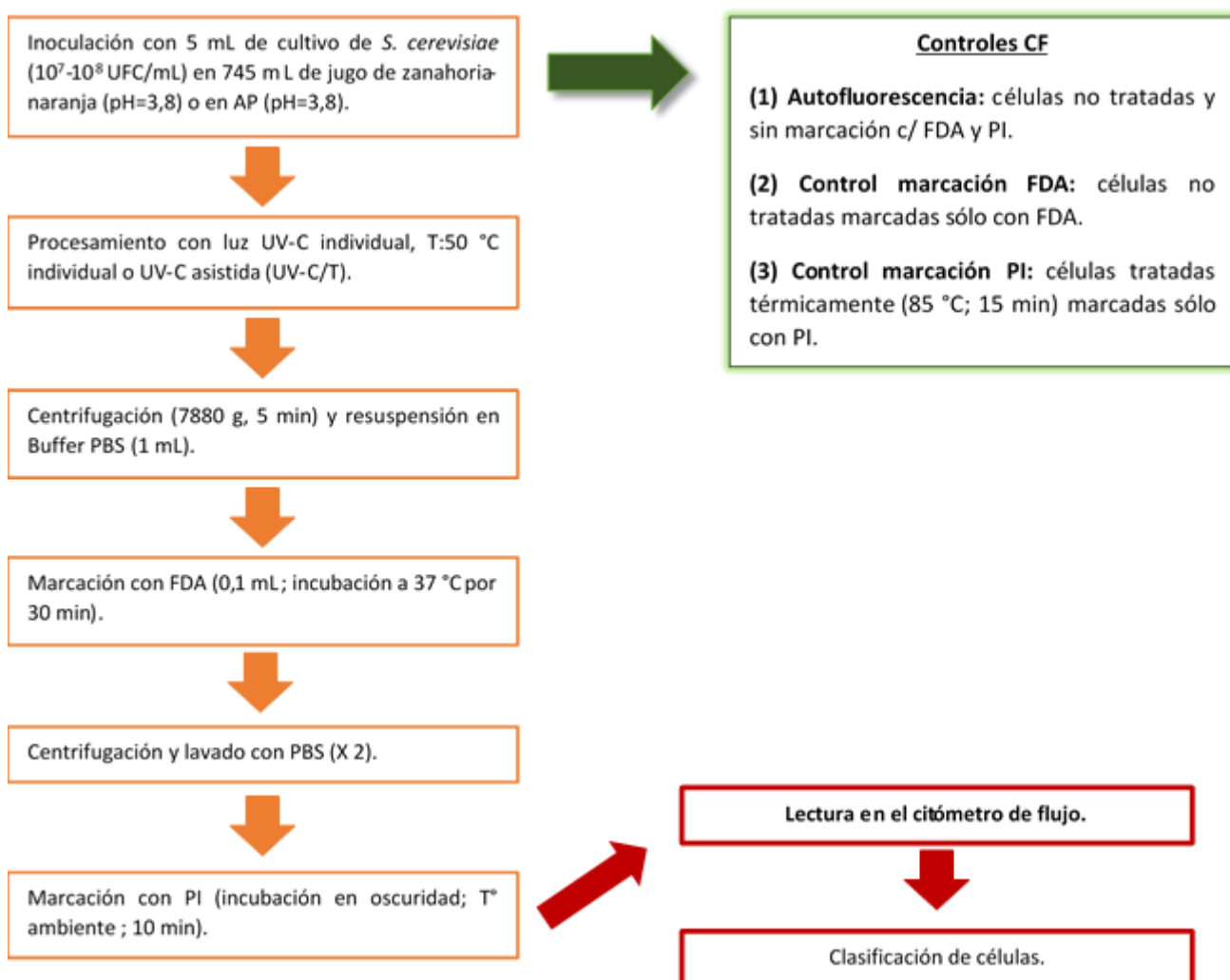
Para marcar las células y poder analizarlas por citometría de flujo, se llevó a cabo una doble tinción empleando FDA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos) y con PI (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos) (Ananta y col., 2004). Se emplearon células no irradiadas por UV-C y células tratadas a 85 °C por 15 minutos y seguidamente teñidas con FDA o PI, respectivamente, como controles para definir regiones negativas y positivas del histograma. Por otro lado, se utilizó un control sin marcar y sin tratar con el fin de determinar la autofluorescencia de las células.

Las células tratadas y las células de los controles de ambas especies de levadura se incubaron primero con 0,5 mL de FDA (5 mg/mL de acetona) por 30 minutos a 37 °C. Tras esta marcación, las células fueron centrifugadas dos veces (7880 *g*, 5 minutos) y resuspendidas en un mL de solución de buffer fosfato salino (buffer PBS; pH=7,0). A continuación, se agregaron 0,5 mL de PI (1 mg/mL de agua destilada estéril) y se incubaron las células a temperatura ambiente (20 °C) durante 10 minutos en la oscuridad.

Tras la incubación con PI, las células fueron mantenidas a oscuras con hielo hasta el momento del análisis (máximo tiempo transcurrido: 1 hora). Las células de *S. cerevisiae* se analizaron primero en un medio sencillo, libre de partículas como las del jugo, como lo es el agua peptonada, que permitió la delimitación de la población de levaduras. Es importante recalcar que para estas experiencias se empleó una variante del jugo mezcla de zanahoria-naranja, preparada especialmente con el objetivo de ser menos particulada que la usada en las experiencias de reto microbiano y de evaluación de la calidad (**Sección 3.6**). Cuando la misma población celular fue analizada en el jugo mezcla de zanahoria-naranja, las partículas de jugo fueron fácilmente reconocidas ya que diferían significativamente de la población delimitada. Luego, estas partículas fueron removidas del análisis empleando el programa WinMDI 2.8 (Purdue University, West Lafayette, Indiana, Estados Unidos). Adicionalmente, se detectaron y removieron dobletes al graficar señales FSC-A versus FSC-H. Las células que

se hallaban por fuera de la diagonal de este gráfico fueron excluidas de la serie de datos a considerar (Huang y col., 2018).

El análisis de las células microbianas se hizo usando un citómetro de flujo (BD FACSAria II, Nueva Jersey, Nueva Jersey, Estados Unidos). Las señales de dispersión y fluorescencia de las células individuales atravesando la zona del láser se recolectaron como señales logarítmicas. La fluorescencia verde de aquellas células marcadas con FDA se recolectó en el canal FL1 (525 ± 15 nm); mientras que la roja de las células marcadas con PI fue recolectada en el canal FL2 (620 ± 15 nm). La tasa de flujo y concentración celular de las muestras fue ajustada para que la adquisición de datos ocurriese a 200 células/segundo. Se registraron 20000 eventos para cada muestra. Todos los tratamientos fueron llevados a cabo en triplicado (**Esq. 3.3**).



Esquema 3.3. Metodología adoptada para el estudio del daño microbiano mediante citometría de flujo (CF).

Durante las mediciones en el citómetro de flujo se obtuvieron gráficos de puntos representando la dispersión frontal de luz (FSC) versus la dispersión lateral de luz (SSC).

El análisis de puntos de FL1 versus FL2 fue empleado para establecer las propiedades de fluorescencia de la población y las células se contaron en cuatro portales o cuadrantes. El porcentaje de la reducción en las señales SSC y FSC fueron determinados para las muestras control y las tratadas, en todas las condiciones ensayadas. La actividad esterasa residual tras los tratamientos fue calculada (**Ec. 3.23**), comparando la actividad enzimática tras el tratamiento con la actividad de las células sin tratar. Solamente las células marcadas únicamente con F (en el Cuadrante I) se consideraron para el cálculo de la actividad esterasa (% AE) correspondiente a toda la población.

$$(3.23) \quad \% AE = \left(\frac{\#1_T}{\#1_{Ctrl}} \right) * 100$$

Donde, % AE es el porcentaje de actividad enzimática residual en respuesta a un tratamiento determinado; #1_T es el porcentaje de la población que está en el Cuadrante I tras los tratamientos UV-C simple, temperatura moderada simple, o UV-C/T asistido, y #1_{Ctrl} es el porcentaje de la población en el Cuadrante I previo a la realización de los tratamientos. El aumento en la cantidad de células permeabilizadas (determinado por la incorporación de PI) se calculó como la diferencia de $\text{Log}(NO_t)$ y $\text{Log}(N_t)$ (**Ec. 3.24**).

$$(3.24) \quad \text{Células permeabilizadas} = \text{Log}(NO_t) - \text{Log}(N_t)$$

En donde, NO_t es el número de células que no habían tomado el PI (o sea, aquellas células que no presentaban fluorescencia roja) previo al tratamiento y N_t es el número de células que no incorporaron PI después del tratamiento (Cuadrante IV).

El análisis de los datos obtenidos para la CF fue realizado haciendo uso del programa WinMDI 2.8 (Purdue University, West Lafayette, Indiana, Estados Unidos).

Adicionalmente, se llevó a cabo un ANOVA con el objetivo de evaluar los efectos de los tratamientos (UV-C simple, T:50 °C simple, UV-C/T asistido). El nivel de significación fue de $p < 0,05$. Se verificaron las asunciones de homocedasticidad y normalidad, y se removieron datos anormales en caso de que correspondiese. Los contrastes de interacción fueron evaluados usando la prueba de Tukey (**Sección 6.3.2**).

Adicionalmente, se realizó un MANOVA para detectar diferencias en células con actividad esterasa y células permeabilizadas, según los factores "tratamiento", "tiempo", y el

término de interacción “*tiempo*tratamiento*” (**Sección 6.6.1**). El nivel de significación fue de $p < 0,05$. En el caso de hallar diferencias significativas, se efectuaron comparaciones múltiples post-hoc entre las medias multivariadas de los factores mediante la prueba de Hotelling basada en la corrección de Bonferroni. Se utilizó el programa InfoStat 2009 para realizar estos análisis estadísticos.

3.15.2. Estudios del daño microbiano por microscopía electrónica de transmisión (MET)

Se analizó el daño microbiano causado en células de *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 tratadas con luz UV-C simple (UV-C), temperatura moderada simple (T:50 °C) y luz UV-C asistida por temperatura (UV-C/T) usando microscopía electrónica de transmisión (MET). Las muestras analizadas fueron: **(i)** células no tratadas en agua peptonada; **(ii)** células no tratadas en jugo mezcla de zanahoria-naranja (preparado especialmente según Sección 3.6 a fines de presentar menos partículas); **(iii)** células tratadas por 15 minutos con tratamiento térmico moderado a 50 °C (T:50 °C) en jugo mezcla de zanahoria-naranja; **(iv)** células tratadas con luz ultravioleta de onda corta simple (UV-C) por 15 min en jugo mezcla; y **(v)** células tratadas con luz UV-C asistida por temperatura moderada durante 15 minutos en jugo mezcla (UV-C/T:50 °C).

Para cada caso, las muestras tratadas o no (control) fueron centrifugadas a 1475 *g* (Labnet, Edison, Nueva Jersey, Estados Unidos) durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se hizo este procedimiento colocando 1 mL de muestra por vez (x 4 total), para conseguir la mayor densidad de células posible. El pellet final se resuspendió en 2 mL de glutaraldehído (2,5 g/100 mL) en buffer fosfato (0,1 M; pH=7,1) durante 2 horas a 4 °C, se lo lavó con agua destilada, y se lo deshidrató con una serie de concentraciones ascendentes de etanol en acetona (50 %-70 %-96 %-100 %) y se lo embebió en Epon 812 (Shell Chemical Company, Houston, Texas, Estados Unidos) por 48 horas (Bolondi y col., 1995). Se tiñeron secciones ultrafinas con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras fueron examinadas con un Microscopio Electrónico Opton modelo EM 109 (Lanais-Mie, UBA-CONICET, Buenos Aires, Argentina).

3.16. Estudios de calidad microbiológica y físico-química de los jugos mezcla de zanahoria-naranja

3.16.1. Estudios de calidad según la evolución de flora nativa

En el caso del jugo de zanahoria-naranja usado en los experimentos de flora nativa, las zanahorias y naranjas no fueron previamente desinfectadas y se empleó un jugo fresco no tratado.

Dos muestras independientes tratadas por UV-C simple, T:50 °C simple, UV-C asistido por temperatura moderada (UV-C/T) o sin tratar (control), fueron guardadas en frascos caramelo de 10 mL y almacenadas bajo refrigeración (4 ± 1 °C) por lapsos de 13 o 24 días, dependiendo del caso.

En el transcurso del almacenamiento, dos frascos fueron tomados a intervalos de tiempo predeterminados (24-72 horas) para su análisis por duplicado de sobrevivientes mesófilos aerobios totales, hongos y levaduras, y coliformes totales. Las poblaciones de mesófilos aerobios totales se determinaron sembrando en placas de PCA con incubación por 72 horas a 37 ± 1 °C. Los hongos y mohos fueron cultivados en placas CGA, incubadas por 5 días a 25 ± 1 °C. Las poblaciones de coliformes totales fueron sembradas sobre placas de Agar Violeta Rojo Bilis Lactosa (VRBL) e incubadas a 30 ± 1 °C por 48 horas. Para mostrar la evolución de la flora nativa, se obtuvieron gráficos de *Log N* versus día de almacenamiento refrigerado. Resulta importante señalar que se tomaron muestras a los 0 y 15 minutos para cada una de las condiciones al inicio del experimento (día 0).

Con el fin de evaluar la influencia del tratamiento aplicado (UV-C simple, T:50 °C simple, y UV-C/T asistido) y la población de flora nativa, se realizó un ANOVA de dos factores. El nivel de significación fue fijado en $p < 0,05$. Se verificaron las asunciones de homocedasticidad, normalidad, y se removieron datos anormales si correspondía. Los contrastes de interacción se efectuaron mediante la prueba de Tukey (**Sección 6.3.2**).

3.16.2. Estudios de calidad físico-química del jugo mezcla de zanahoria-naranja

A fines de evaluar la calidad del jugo de zanahoria-naranja durante su almacenamiento refrigerado, se graficaron las determinaciones correspondientes al contenido polifenólico (CPo), la actividad antioxidante total (AAT), el pH, los °Brix, la turbidez y el color de muestras sin tratar o procesadas con los tratamientos UV-C simple, T:50 °C simple, o con UV-C/T asistido.

Las muestras de jugo fueron asépticamente guardadas en frascos de 10 mL de vidrio caramelo, y se las mantuvo en la oscuridad a 5 ± 1 °C, según cuando llegaban al deterioro. A lo largo del almacenamiento, tres frascos independientes correspondientes al mismo tratamiento fueron tomados a intervalos de tiempo predeterminados para su posterior análisis.

Para determinar si existían diferencias significativas entre el contenido polifenólico (CPo) y la actividad antioxidante total (AAT) se utilizó un MANOVA, según los factores “tratamiento”, “tiempo”, y la interacción “tiempo*tratamiento” (**Sección 6.6.1**). El nivel de significación se fijó en $p<0,05$. En caso de hallar diferencias significativas, se realizaron comparaciones múltiples post-hoc en base a las medias multivariadas utilizando la prueba de Hotelling basada en la corrección de Bonferroni.

3.16.3. Estudios de color de las muestras analizadas

El color de las muestras fue determinado haciendo uso de un fotocolorímetro de reflectancia triestímulo (Minolta Co. Modelo CM-508-d, Osaka, Japón). Se empleó una abertura de medición de 1,4 utilizando fondos blancos y negros. Para hacer las mediciones, se emplearon cubetas de 2,5 cm de diámetro y 1 cm de alto con base vidriada y paredes opacas, en las que se colocaron 3 mL de las muestras de jugo a fin de que se comporten como opacas y se pueda aplicar la teoría del color CIE (X, Y, Z). Además, se usó el iluminante C con un ángulo de observador estándar de 2°.

Antes de cada medición, se procedió a calibrar el instrumento con el estándar provisto por el fabricante. Se registraron tanto las coordenadas de color CIE (X, Y, Z), como los componentes del espacio CIE $L^*a^*b^*$: L^* (luminosidad), a^* (coordenadas rojo/verde), y b^* (coordenadas amarillo/azul).

La evolución del color a lo largo del almacenamiento refrigerado (5 ± 1 °C) de las muestras control y las muestras procesadas del jugo mezcla de zanahoria-naranja fueron graficadas en el diagrama de cromaticidad CIE x,y (Jin y col., 2017). Además, se determinaron las evoluciones a lo largo de los días de los componentes del espacio CIE $L^*a^*b^*$ durante 13 días para las muestras UV-C simple, T:50 °C simple y control sin tratar (hasta su deterioro), y por 21 días para las muestras UV-C/T (Riganakos y col., 2017).

3.16.4. Turbidez

La turbidez en el almacenamiento refrigerado fue determinada con un turbidímetro (LaMotte 2020we, Chestertown, Maryland, Estados Unidos), usando y estándares de medición AMCO Turbidez Primaria (100 NTU) y de Formazina (4000 NTU). Se realizaron mediciones en tres frascos independientes para cada tipo de muestra procesada o control. Las distintas muestras de jugo (control sin tratar, procesada con UV-C simple, con T:50 °C simple y con UV-C/T) fueron diluidas al medio para poder así entrar en el rango de medición del turbidímetro y la turbidez final se calculó multiplicando la estimada por el equipo por el factor de dilución (X 2).

3.16.5. pH

El pH a lo largo del almacenamiento refrigerado de las muestras se determinó de la forma descrita para el jugo fresco, usando de un pH metro PerpHect pH/ISE modelo 310 (Orion Research Inc., Beverly, Massachusetts, Estados Unidos). Se realizaron mediciones independientes de 3 frascos por muestra.

3.16.6. Determinación de polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales de las muestras fue medido usando el método de Folin-Ciocalteu. Con tal fin, se preparó una curva de calibración de ácido gálico, cuyas concentraciones fueron de 0,0025 a 0,125 mg/mL (Ferrario y col., 2018).

Las concentraciones de las muestras se determinaron a partir de la curva de calibración ($y=13,2465x+0,0518$; $R^2=0,99$), expresándose como mg de Ácido Gálico Equivalente por mililitro de muestra: EAG/mL. Por un breve lapso, se mezcló 0,5 mL de las muestras de jugo diluidas 100 veces en agua destilada con 2,5 mL de Reactivo Fenólico de Folin-Ciocalteu (10 % v/v). A continuación, se agregaron 2 mL de solución de Na_2CO_3 (7,5 % m/v). La mezcla se dejó por 3 horas a oscuras, y la formación de color azul, como indicador de contenido polifenólico, se determinó a 740 nm con un espectrofotómetro UV-Vis.

3.16.7. Determinación de la capacidad antioxidante por DPPH

La actividad antioxidante de las muestras fue determinada mediante un método colorimétrico basado en la capacidad de recoger radicales libres, evaluada usando el radical estable DPPH (Merck, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos) (Gutiérrez y col., 2015).

Ochenta (80) mL de la muestra diluida 1500 veces en metanol fueron mezclados con 2200 μ L de DPPH (0,02 g/L en metanol). La mezcla de reacción se dejó a oscuras por 30 minutos a 25 ° C, y se determinó la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. Se construyó una curva de calibración usando Trolox (Merck, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos) como estándar. Los resultados se determinaron a partir de la curva de calibración obtenida ($y=0,00084x-0,0024$; $R^2=0,98$), expresándose en términos de equivalentes de Trolox (μ g Trolox Eq/ mL).

3.17. Estudios sensoriales

3.17.1. Área de prueba

El área de prueba consistió en un espacio aislado con entrada propia, abundante luz natural, temperatura placentera y libre de distracciones (ISO 8589:1988). Se la dividió en dos zonas: una zona de preparación de muestras y una zona de análisis sensorial. La zona de análisis sensorial consistió en seis cubículos de melamina blancos (**Fig. 3.4**), a fin de asegurar la independencia de los jueces (es decir, evitar que se comuniquen entre sí). Cada juez fue provisto de un vaso de agua mineral fría, brindada para enjuagar la boca antes de probar las muestras o para enjuagarla entre las degustaciones.



Figura 3.4. Fotografía del área usada para los ensayos sensoriales.

3.17.2. Jueces de los ensayos de análisis sensorial

Los distintos ensayos sensoriales fueron llevados a cabo con consumidores frecuentes de jugos (aquellos que consumían más de 3 porciones de frutas diarias), eligiendo un dado número de jueces según la clase de ensayo. Para la prueba de campo y la prueba CATA (“Check-all-that-applies”, en inglés), se escogieron 130 voluntarios no pagos (59 mujeres y 71 hombres). Solamente participaron de las pruebas estudiantes de la facultad (18-45 años), a fin de evitar efectos de panel semi-entrenado. Las muestras fueron acercadas a los evaluadores de forma monádica y secuencial con un orden aleatorizado. Al término del ensayo, se les brindó una golosina y un jugo de manzana comercial para agradecer su participación.

3.17.3. Prueba conjunta

Se efectuó una prueba conjunta con el objetivo de estudiar la influencia de las características del jugo de zanahoria-naranja tratado con UV-C/T y el tipo de procesamiento sobre la percepción de salubridad y la voluntad de probarlo, similar a la descrita en Ares y

col. (2009). El diseño conjunto consistió en dos factores categóricos: *características del jugo y tipo de procesamiento*. El primer factor se refería a si el jugo mezcla era natural, sin preservantes ni agregado de azúcar, y rico en antioxidantes naturales. El otro factor se refería a si el jugo había sido procesado con temperaturas moderadas o sin las mismas. Los factores variaron independientemente uno respecto al otro, según un diseño factorial, resultando en tres combinaciones de atributos a las que se sumó un jugo mezcla regular (sin información sobre sus características o procesamiento), que actuó como un control. Por lo tanto, los panelistas evaluaron un total de 4 declaraciones sobre las muestras del jugo UV-C/T: “Jugo de zanahoria-naranja” (**Plantilla 1, Control**); “Jugo de zanahoria-naranja, procesado sin temperaturas elevadas” (**Plantilla 2**); “Jugo de zanahoria-naranja, 100% natural, sin conservantes ni azúcares agregados, rico en antioxidantes” (**Plantilla 3**); y “Jugo de zanahoria-naranja, 100% natural, sin conservantes ni azúcares agregados, rico en antioxidantes, procesado sin temperaturas elevadas” (**Plantilla 4**). Estas declaraciones fueron presentadas usando plantillas con imágenes (**Fig. 3.5**), impresas en papel calidad fotográfica y numeradas con códigos de 3 dígitos al azar. Se les solicitó a los panelistas que calificaran los jugos de las plantillas según su percepción de salubridad, usando una escala de 7 casilleros, donde la casilla más a la izquierda correspondía a “*Para nada saludable*” y la más a la derecha a “*Muy saludable*”. Por otro lado, se preguntó sobre la voluntad de probar los productos descritos en las plantillas en un formulario impreso usando una escala de 7 casilleros donde el extremo a la izquierda correspondía a “*Definitivamente no lo probaría*”, la mitad a “*Tal vez sí, tal vez no lo probaría*” y el extremo derecha a “*Definitivamente lo probaría*” (**Formulario 1**).

Para investigar si existían diferencias entre la percepción de salubridad y la voluntad de probar el jugo de zanahoria-naranja, se efectuó un análisis de la covarianza multivariada (MANCOVA), empleando al género de los panelistas como covariable (**Sección 6.7**). También se emplearon las porciones de fruta consumidas por día como covariable para el MANCOVA.

Jugo de zanahoria y naranja



- ✓ Jugo 100 % natural.
- ✓ Sin conservantes, ni azúcares agregados.
- ✓ Rico en antioxidantes.
- ✓ Procesado sin temperaturas elevadas.

Figura 3.5. Ejemplo de plantilla (**Plantilla 4**) usada en la prueba conjunta para el jugo de zanahoria-naranja procesado con UV-C/T.

3.17.4. Prueba de campo

Se utilizó la encuesta de prueba de campo a fin de analizar la aceptabilidad global junto a la intensidad y el punto justo de ciertos atributos de interés de las muestras de jugo zanahoria-naranja tratadas con UV-C/T y las pasteurizadas a 80 °C (T:80 °C). Cada panelista evaluó dos muestras de 15 mL (cada una correspondiente a uno de los tratamientos), servidas en vasos blancos. Las muestras fueron presentadas de manera monádica secuencial, evaluándose cada muestra individualmente. El orden de presentación de las muestras estuvo aleatorizado, y se las presentó con códigos de 3 dígitos. Estas muestras fueron ofrecidas a la temperatura de consumo de jugos frutales (5-7 °C) y se dio un vaso de agua mineral fría a fin de realizar un enjuague entre muestras (**Fig. 3.6**). Para cada muestra, los panelistas determinaron primero la aceptabilidad global del producto y después evaluaron la intensidad y el punto justo de los siguientes atributos relevantes del jugo de zanahoria-naranja: *Sabor amargo*, *Sabor herbal*, *Sabor ácido*, *Aroma*, *Cuerpo/viscosidad*.

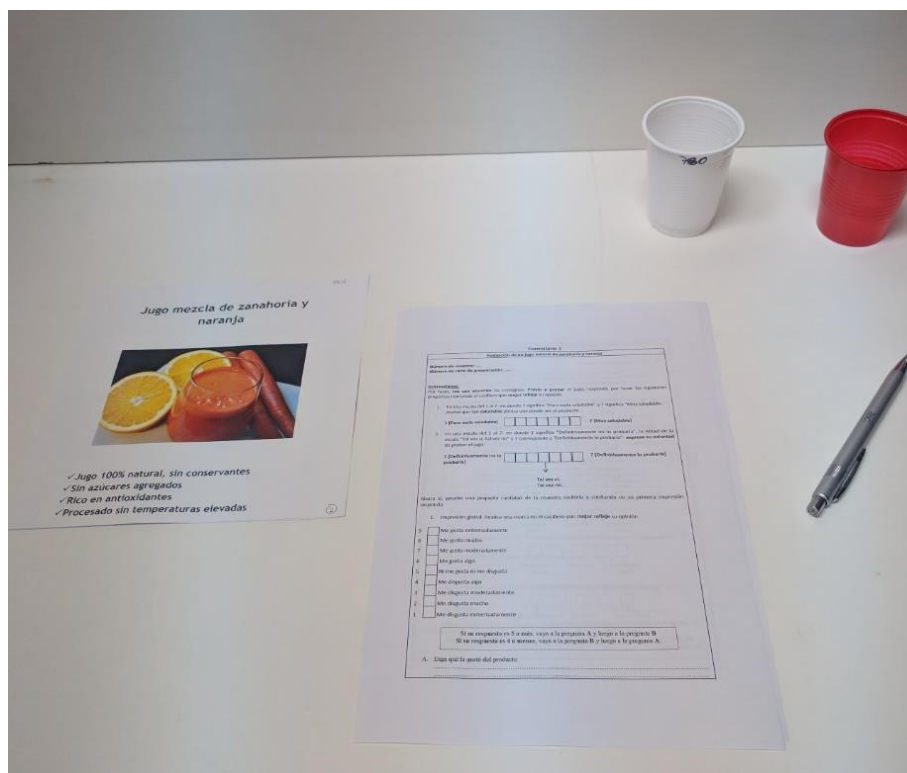


Figura 3.6. Presentación de las muestras para la prueba de campo y la prueba CATA a los consumidores.

El Formulario 1 usado para las muestras procesadas con UV-C/T y T:80 °C da cuenta -en primer lugar- de la evaluación de impresión global de las muestras usando una escala hedónica (**Formulario 1**) de 9 puntos (en donde, el 1 representa “*Me disgusta extremadamente*”, mientras que el 9 representa “*Me gusta extremadamente*”), elaborada según las instrucciones de Lawless y Heyman (2010). Esto fue continuado por preguntas abiertas dirigidas sobre el agrado o desagrado del jugo, a ser respondidas siguiendo una determinada secuencia según el puntaje otorgado en la escala de impresión global.

Además, ciertas características de los jugos fueron evaluadas usando escalas de 5 puntos, dirigidas a evaluar la aceptabilidad, intensidad y/o adecuación de cada atributo en la muestra de jugo dada. En específico, el “*Sabor herbal*” de las bebidas fue evaluado en una escala de intensidad breve con extremos marcados (1: *Imperceptible*; 5: *Muy intenso*). De modo parecido, el “*Sabor amargo*” fue determinado en una escala de intensidad con extremos marcados (1: *No amargo*; 5: *Extremadamente amargo*). El “*Sabor a zanahoria*” de las muestras, el sabor ácido (denominado “*Sabor a naranja-ácido*”), “*Aroma frutal*” y “*Cuerpo/viscosidad*” fueron evaluados usando escalas de punto, marcadas en el extremo

izquierdo como “*Demasiado débil*” y en el extremo derecho como “*Demasiado fuerte*”. La medida de “*Adecuado*” se hallaba en el medio de todas las escalas. Mientras que el color fue evaluado usando una escala de 5 puntos, en la que el extremo izquierdo correspondía a “*Me disgusta extremadamente*”, mientras que el derecho a “*Me gusta extremadamente*”. Previo a cada sesión de evaluación, cada escala y toda la terminología asociada a la encuesta se explicaron múltiples veces hasta asegurar la comprensión de los panelistas.

Para la prueba hedónica, los datos de lugar en las escalas fueron transformados en puntajes numéricos. Los resultados se reportaron como el promedio de los puntajes de los individuos. Por otro lado, se colectaron las respuestas de las preguntas abiertas y se las analizó cualitativamente, agrupando todos los atributos comunes descritos por los panelistas en categorías. Se llevó a cabo un análisis de conglomerados usando distancias euclídeas y un algoritmo de enlace del método de medias ponderadas para visualizar si existía segmentación en la preferencia de los consumidores por el jugo de zanahoria-naranja tratado con UV-C/T y el procesado con T:80 °C.

Además, se efectuó un PCA para visualizar la asociación existente entre los puntajes de la impresión global y aquellos correspondientes al promedio de los atributos para cada grupo de panelistas (**Sección 6.6.2**). Todos los análisis estadísticos se hicieron usando el programa InfoStat 2009.

Un análisis de penalización fue realizado al clasificar a los consumidores en tres grupos para cada uno de los atributos evaluados mediante una escala de punto justo: **(1)** los consumidores que dieron puntajes por encima del punto justo (para ese atributo bajo análisis); **(2)** los consumidores que evaluaron la muestra en el punto justo; y **(3)** los consumidores que dieron puntajes por debajo del punto justo. Por un lado, se procedió a restar el promedio del puntaje hedónico para el grupo que caracterizó la muestra respecto a ese atributo en el punto justo al promedio del puntaje hedónico obtenido para el grupo por encima del punto justo. Por otro lado, se le restó el puntaje hedónico promedio correspondiente al grupo que evaluó ese atributo por debajo del punto justo al puntaje hedónico medio correspondiente al grupo que caracterizó a la muestra en el punto justo. Finalmente, se graficaron esas diferencias en función del porcentaje de panelistas de cada grupo respecto al total (Lawless, 2013).

3.17.5. Prueba CATA

Para la realización de la prueba CATA, los panelistas respondieron un cuestionario consistente en descriptores sensoriales generados en una ronda previa de consulta **(Formulario 2)**. Los descriptores sensoriales escogidos fueron: *Afrutado, Sabor artificial, Sabor natural, Demasiado particulado, Sabor persistente (con regusto), Aroma extraño, Aroma a hierbas, Gusto a naranja, Sabor extraño, Sabor a cocido, Sabor intenso a fruta-hortaliza, Color agradable, Color intenso, No muy afrutado, Aroma agradable, Gusto a hierbas, Gusto a zanahoria, Cuerpo Agradable*. Se les explicó a los panelistas que debían elegir todos los términos que considerasen apropiados para describir a cada bebida (Lawless, 2013). Los conteos para cada descriptor fueron totalizados para cada producto y la tabla de contingencia resultada fue usada en el análisis siguiente.

Por otro lado, se les solicitó que eligieran aquellos descriptores no sensoriales que sintieran que mejor describen a las muestras: *Para consumir ocasionalmente, Para consumir en el desayuno, Para consumir cuando hago deportes, Para consumir cuando hace calor, Para consumir todos los días, Refrescante e hidratante, Nutricionalmente saludable, Ideal para dietas*. Se procedió a registrar la frecuencia de mención para cada una de las frases vinculadas a la intención de consumo.

A fines de analizar la información proveniente de la realización del cuestionario CATA, se llevó a cabo un análisis de correspondencias (CA) usando la tabla de frecuencias obtenida, consistente en las respuestas relativas a los descriptores sensoriales para las tres muestras bajo estudio: para jugo procesado con UV-C/T, con T:80 °C y para una bebida ideal (definida por los consumidores según los atributos que debería poseer ese tipo de producto) **(Sección 6.6.3)**. Además, se efectuó una prueba de χ^2 para comparar las frecuencias de los descriptores no sensoriales del cuestionario CATA para las muestras, ya que al poseer solamente dos muestras resultaba imposible aplicar una prueba multivariada. Para todos los análisis efectuados, se procedió a registrar información sobre los consumidores relativa al género, edad y raciones de fruta consumidas al día.

Formulario 1

Evaluación de un jugo natural de zanahoria y naranja

Número de muestra:

Número de carta de presentación:

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

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

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

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

A. Diga qué le gustó del producto

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

B. Diga qué no le gusta del producto.

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

2. Indique realizando una marca cómo siente la bebida de acuerdo al **sabor amargo**.

Sabor amargo:

No amargo Extremadamente amargo

3. Indique realizando una marca cómo siente el **sabor a hierbas** de la bebida:

Sabor herbal:

Imperceptible Muy intenso

4. ¿Cuál es su opinión acerca del **sabor a zanahoria** de la bebida?

	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	demasiado débil		adecuado		demasiado fuerte	
5.	¿Cuál es su opinión acerca del sabor a naranja-ácido de la bebida?					
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	demasiado débil		adecuado		demasiado fuerte	
6.	¿Cuál es su opinión acerca del aroma frutal de la bebida?					
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	demasiado débil		adecuado		demasiado fuerte	
7.	¿Cuál es su opinión acerca del cuerpo/viscosidad de la bebida?					
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Poco cuerpo		adecuado		demasiado cuerpo	
8.	¿Cuál es su opinión acerca del color de la bebida?					
Me disgusta extremadamente	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Me gusta extremadamente

Formulario 1. Formulario de la prueba de campo usada para evaluar la aceptabilidad del jugo de zanahoria-naranja procesado con UV-C/T:50 °C y con T:80 °C.

Formulario 2

Evaluación de un jugo natural de zanahoria y naranja

Número de muestra:

Fecha: / /

Instrucciones:

Agite la muestra antes de probarla. Pruebe una pequeña cantidad de la muestra recibida. Por favor, lea **con atención las consignas** de cada apartado.

a) Por favor, tilde todas las palabras o frases que usted considere que aplican a la bebida:

<input type="checkbox"/>	Afrutado	<input type="checkbox"/>	Sabor a cocido
<input type="checkbox"/>	Sabor artificial	<input type="checkbox"/>	Sabor intenso a fruta-hortaliza
<input type="checkbox"/>	Sabor natural	<input type="checkbox"/>	Color agradable
<input type="checkbox"/>	Demasiado particulado	<input type="checkbox"/>	Color intenso
<input type="checkbox"/>	Sabor persistente (con regusto)	<input type="checkbox"/>	No muy afrutado
<input type="checkbox"/>	Aroma extraño	<input type="checkbox"/>	Aroma agradable
<input type="checkbox"/>	Aroma a hierbas	<input type="checkbox"/>	Gusto a hierbas
<input type="checkbox"/>	Gusto a naranja	<input type="checkbox"/>	Gusto a zanahoria
<input type="checkbox"/>	Sabor extraño	<input type="checkbox"/>	Cuerpo agradable

b) Marque todos los atributos que le parezcan ideales para este producto:

<input type="checkbox"/>	Afrutado	<input type="checkbox"/>	Sabor a cocido
<input type="checkbox"/>	Sabor artificial	<input type="checkbox"/>	Sabor intenso a fruta-hortaliza
<input type="checkbox"/>	Sabor natural	<input type="checkbox"/>	Color agradable
<input type="checkbox"/>	Demasiado particulado	<input type="checkbox"/>	Color intenso
<input type="checkbox"/>	Sabor persistente (con regusto)	<input type="checkbox"/>	No muy afrutado
<input type="checkbox"/>	Aroma extraño	<input type="checkbox"/>	Aroma agradable
<input type="checkbox"/>	Aroma a hierbas	<input type="checkbox"/>	Gusto a hierbas
<input type="checkbox"/>	Gusto a naranja	<input type="checkbox"/>	Gusto a zanahoria
<input type="checkbox"/>	Sabor extraño	<input type="checkbox"/>	Cuerpo agradable

c) Marque las situaciones de consumo que le parecen adecuadas para esta bebida:

<input type="checkbox"/>	Nutricionalmente saludable	<input type="checkbox"/>	Para consumir cuando hago deportes
<input type="checkbox"/>	Para tomarlo en el desayuno	<input type="checkbox"/>	Ideal para dietas
<input type="checkbox"/>	Para consumir ocasionalmente	<input type="checkbox"/>	Para consumir cuando hace calor
<input type="checkbox"/>	Para consumir todos los días	<input type="checkbox"/>	Refrescante e hidratante

d) Por favor, complete el siguiente apartado sobre su información personal **marcando con cruz** según corresponda:

i. Edad:

..... 18- 29 años

..... 30- 45 años

..... + 46 años

ii. Género:

..... Femenino

..... Masculino

iii. Raciones de frutas y verduras consumidas **por día**:

..... Menos de 3

..... Más de 3

Glosario de términos

- Afrutado: producto que tiene sabor u olor parecido al de la fruta.
- Demasiado particulado: que presenta demasiadas partículas en suspensión.
- Persistencia del sabor (regusto): persistencia de una sensación de sabor de algunos alimentos tras haber pasado por la boca (en general por la lengua) y estar ya fuera de contacto de las papilas gustativas
- Sabor intenso a frutas-hortalizas: que posee un sabor claramente definido y expresado de fruta u hortaliza
- Aroma extraño: aroma que resulta ajeno al aroma típico de las frutas y verduras.
- Sabor a cocido: sabor a hervido.
- Cuerpo: sensación oral de viscosidad y densidad de una bebida que uno percibe en la boca.

Formulario 2. Formulario usado en la evaluación CATA de las muestras de jugo de zanahoria-naranja tratadas con UV-C/T: 50 °C y con T:80 °C.



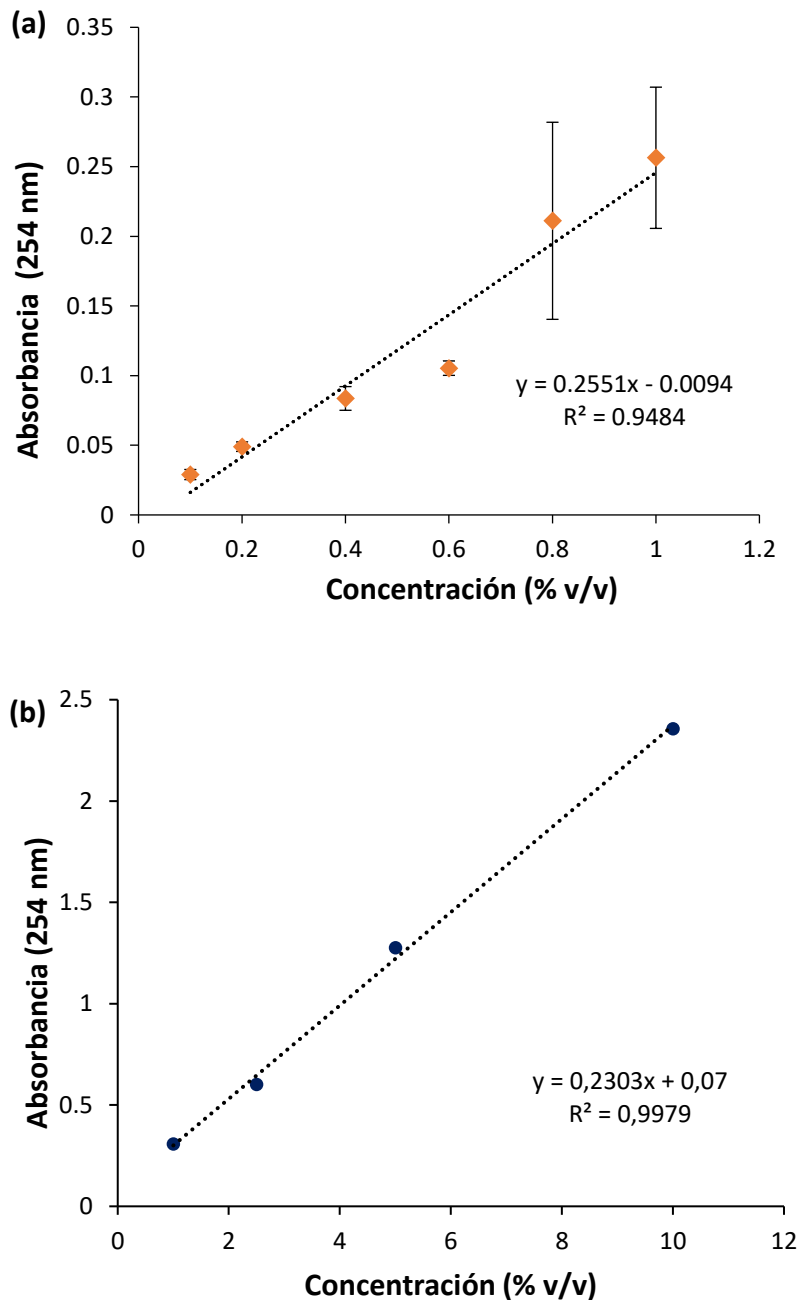
4. Resultados y discusión

4. Resultados y discusión

Primera parte

4.1. Caracterización físico-química de las matrices frutihortícolas

Los coeficientes de absorción UV-C para las distintas matrices bajo estudio (jugo de zanahoria, jugo de naranja, jugo mezcla de zanahoria-naranja 1:1, y jugo clarificado mezcla de zanahoria-naranja especialmente utilizado en los experimentos de citometría de flujo y microscopía electrónica de transmisión) se obtuvieron a partir de la pendiente de los gráficos de concentración (% v/v) versus absorbancia a 254 nm (**Fig. 4.1, Tabla 4.1**).



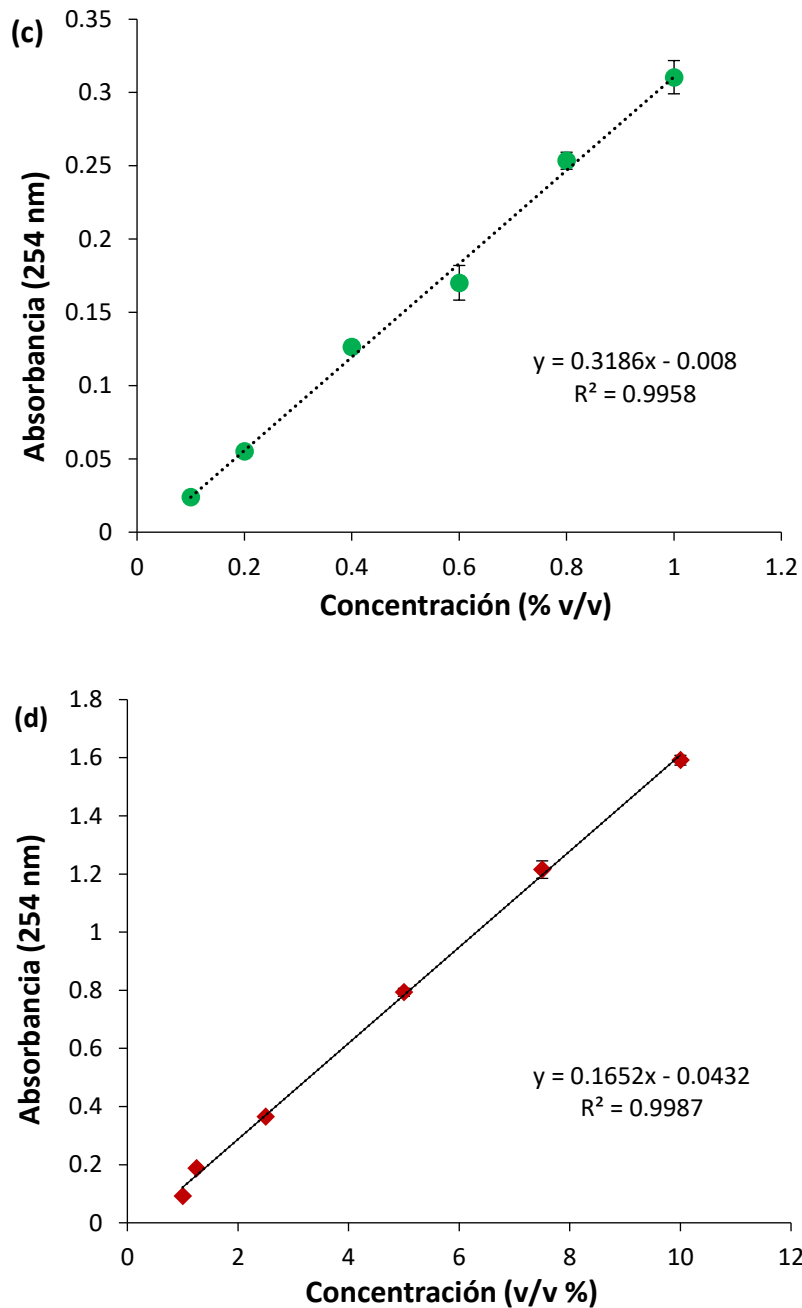


Figura 4.1. Gráficos de concentración (% v/v) versus Absorbancia a 254 nm para las distintas matrices frutihortícolas empleadas: **(a)** Jugo de zanahoria (◆), **(b)** Jugo de naranja (●), **(c)** Jugo de zanahoria-naranja 1:1 (●), **(d)** Jugo de zanahoria-naranja 50:50 usado en CF y MET (◆).

Además, para tanto los jugos frutihortícolas como para la solución de agua peptonada al 0,1 % (v/v) empleada en la realización de los distintos experimentos de esta tesis, se obtuvieron los distintos parámetros vinculados a su caracterización físico-química: pH, ° Brix, $D_{3,2}$, $D_{4,3}$, y turbidez (**Tabla 4.1**).

El jugo de naranja ($\text{pH}=3,5\pm 0,1$; $11,10\pm 0,10$ °Brix) presentó el mayor diámetro de partícula en superficie promedio ($D_{3,2}=12,60\pm 0,40$ μm) entre los jugos estudiados. También presentó la mayor cantidad de agregados, lo que se evidenció en el valor obtenido para el diámetro de partícula en volumen promedio ($D_{4,3}=271,00\pm 2,00$ μm). Sin embargo, exhibió menos partículas en suspensión que el de zanahoria (turbidez: $3723,00\pm 9,00$ NTU), lo cual se vio reflejado también en su coeficiente de absorción fue menor (coeficiente de absorción UV: $0,23$ cm^{-1}).

Por su parte, el jugo de zanahoria ($\text{pH}=6,5\pm 0,1$; $7,10\pm 0,10$ °Brix) exhibió menor valor de $D_{3,2}=4,60\pm 0,40$ μm y de $D_{4,3}=29,30\pm 4,40$ μm que el jugo de naranja. Este jugo presentó muchas partículas suspendidas (turbidez: $7167,00\pm 5,00$ NTU). Como consecuencia de la mayor cantidad de partículas de jugo suspendidas, la penetración de la luz resultó menor en el jugo de zanahoria (coeficiente de absorción UV: $0,26$ cm^{-1}) que en el de naranja.

El jugo mezcla de zanahoria-naranja ($\text{pH}=3,8\pm 0,1$; $10,60\pm 0,20$ °Brix) se caracterizó por presentar valores intermedios de $D_{3,2}$ ($5,10\pm 0,10$ μm) y $D_{4,3}$ ($60,80\pm 8,70$ μm). Por otro lado, presentó los mayores valores de turbidez ($7667,00\pm 15,00$ NTU) y la menor penetración de la luz (coeficiente de absorción UV: $0,32$ cm^{-1}) de los tres jugos evaluados.

Por otra parte, el jugo mezcla de zanahoria-naranja preparado para los experimentos de citometría de flujo (CF) y microscopía electrónica de transmisión (MET), empleando un paso adicional de centrifugación (4588 g, 5 °C, 10 min) a fin de reducir la cantidad de partículas y evitar la obturación del láser, se caracterizó por su menor tamaño de partícula en comparación al preparado para los experimentos de reto microbiano y evaluación de la calidad, lo cual se evidenció en sus valores de $D_{3,2}$ ($D_{3,2}= 1,99\pm 0,07$ μm). Sin embargo, también hubo un grado importante de agregación de partículas, lo cual se vio en el hecho de que se obtuvo un valor muy similar al del jugo mezcla preparado convencionalmente para el diámetro medio en volumen: $D_{4,3}$ ($D_{4,3}= 67,29\pm 6,44$ μm).

La solución de agua peptonada (AP) al $0,1$ % presentó un valor de coeficiente de absorción UV despreciable (coeficiente de absorción UV: $0,004\pm 0,001$ cm^{-1}). También, presentó una turbidez despreciable ($0,6\pm 0,2$ NTU) y un tamaño de partícula ($D= 396,80$ nm) significativamente menor al del resto de las matrices analizadas.

Tabla 4.1. Caracterización físico-química de las distintas matrices bajo estudio: **(a)** Jugo de naranja natural; **(b)** Jugo de zanahoria natural; **(c)** Jugo mezcla de zanahoria-naranja natural 1:1; **(d)** Jugo mezcla de zanahoria-naranja 1:1 preparado para los experimentos de CF y MET; y **(d)** Agua peptonada al 0,1 % (m/v).

	pH	°Brix	D _{3,2} (µm)	D _{4,3} (µm)	D [(µm) en jugos; (nm) en AP]*	Turbidez (NTU)	Coefficiente de absorción UV (cm ⁻¹)
Jugo de naranja	3,5±0,1	11,10±0,10	12,60±0,40	271,00±2,00	667,00±10,00	3723,0±9,0	0,230
Jugo de zanahoria	6,5±0,1	7,10±0,10	4,60±0,40	29,30±4,40	19,95±0,09	7167,0±5,0	0,260
Jugo de zanahoria-naranja (1:1)	3,8±0,1	10,60±0,20	5,10±0,10	60,80±8,70	19,95±0,01	7667,0±15,0	0,320
Jugo de zanahoria-naranja (1:1) para CF y MET	3,8±0,1	10,60±0,20	1,99±0,07	67,29±6,44	13,18±0,10	707,0±13,0	0,170
Agua peptonada (0,1 % v/v)	3,8±0,1	-	-	-	386,0 ± 23,0	0,6±0,2	0,004

* *D* es el diámetro de partícula correspondiente al pico máximo donde se halla la mayor proporción de partículas de una distribución. Para los datos obtenidos en el Mastersizer ese diámetro es en µm, mientras que para los obtenidos en el Nanozetasizer es en mm.

4.2. Prueba de reto microbiano para el pre-tratamiento térmico del jugo de zanahoria-naranja usado en los experimentos de inactivación microbiana

A fin de reducir la carga de microflora nativa presente en el jugo mezcla de zanahoria-naranja usado en la realización de las experiencias de reto microbiano para los distintos tratamientos bajo estudio (UV-C simple, temperatura moderada simple, y UV-C/T asistido), se procedió a realizar un pre-tratamiento térmico (70 ± 1 °C), para el cual se registraron las reducciones logarítmicas logradas sobre la población inicial de mesófilos aerobios.

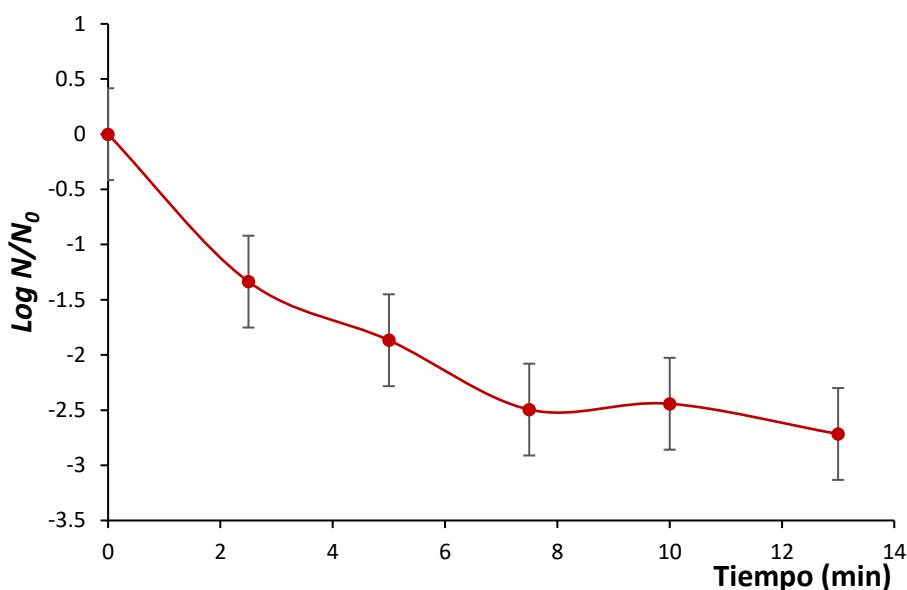


Figura 4.2. Reducciones logarítmicas alcanzadas sobre la población inicial de mesófilos aerobios en jugo mezcla de zanahoria-naranja procesado térmicamente (70 °C).

En base a los resultados obtenidos, se estableció a los 13 minutos como un tiempo adecuado para llevar a cabo un pre-tratamiento del jugo de zanahoria-naranja, logrando aproximadamente 2,70 reducciones logarítmicas de los niveles de aerobios mesófilos.

4.3. Determinación del número de Reynolds

Mediante el uso de un jugo de zanahoria de características previamente definidas como matriz modelo, se determinó el valor del número de Reynolds hidrodinámico (Re_h) del reactor UV-C usado en los experimentos de esta tesis (**Sección 3.8.1**). El régimen de flujo dentro del reactor resultó ser laminar puesto que los valores de Re_h calculado fue igual a 436,3. se encontraron en el rango de 720-963 dependiendo del jugo.

Es importante señalar que incluso en condiciones de flujo laminar de operación, es posible alcanzar los niveles de inactivación requeridos para el procesamiento UV-C de jugos frutales y vegetales (USFDA, 2001). En un estudio reciente, se lograron hasta 6,0 reducciones log de *S. cerevisiae* en un jugo de uva (pH=3,46; 13,10 °Brix) sometido a procesamiento UV-C (35,8 mJ/cm²), en un reactor operando bajo régimen laminar ($Re_h=58,02-795,58$) en modo de recirculación continua (Antonio-Gutiérrez y col., 2019.b). En base a los resultados obtenidos, los autores concluyeron que es posible hallar condiciones propicias para el tratamiento UV-C de jugos bajo régimen laminar, si se da un mezclado apropiado de los sistemas en condiciones de recirculación continuas.

4.4. Determinación de la dosis de UV-C emitida mediante radiometría

Mediante el uso de la técnica de radiometría fue posible conocer la dosis de UV-C emitida por las lámparas, al apoyar el detector del radiómetro sobre su superficie. Resultando la potencia de las lámparas ser igual a 0,00180 W, se determinó que la dosis de UV-C emitida por las lámparas a los 15 minutos (900 s) de irradiación es igual a 2032,0 mJ/cm².

4.5. Determinación de la dosis de UV-C incidente mediante actinometría

Mediante el uso de la técnica de actinometría química, se determinó que la dosis de UV-C incidente tras 15 minutos de irradiación era de 986,0 mJ/cm² (**Tabla 4.3**). La relación entre los moles de triyoduro formados y el tiempo resultó lineal durante el lapso evaluado, lo cual significó que la solución de yoduro/yodato de potasio no saturó a los 15 minutos de irradiación (**Figura 4.3**). En concordancia, la relación entre la energía incidente sobre el sistema y el tiempo de irradiación UV-C también resultó lineal.

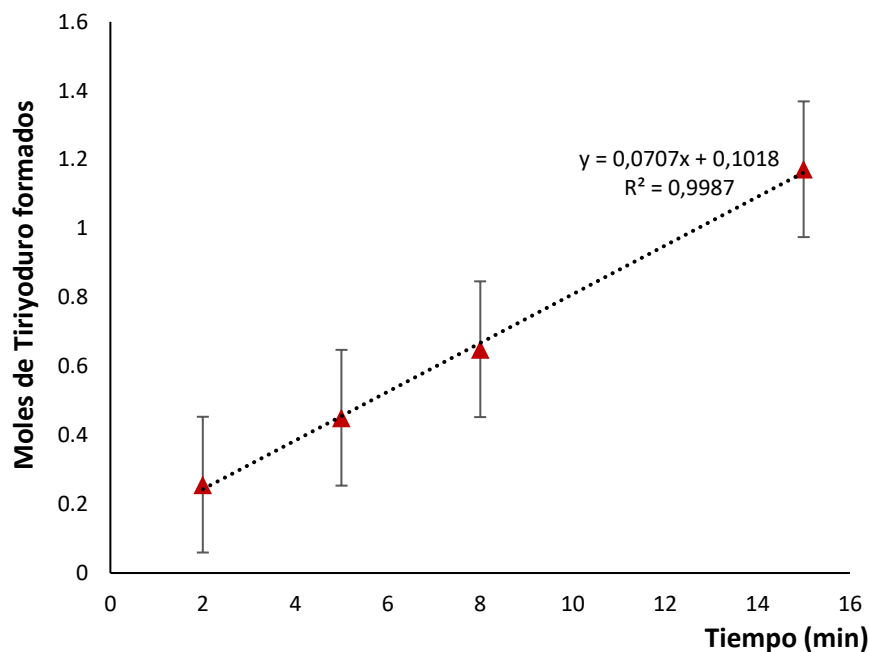


Figura 4.3. Moles de triyoduro formados a partir de la reacción del par actinométrico yoduro/yodato de potasio en función del tiempo de irradiación UV-C (min).

Tabla 4.3. Moles de triyoduro y energía absorbida por la muestra (J) para la determinación de la dosis de UV-C incidente sobre la muestra (mJ/cm²) mediante el par actinométrico yoduro/yodato de potasio.

Tiempo (min)	Absorbancia (352 nm)	Moles de Triyoduro formados	E (J)	Dosis de UV-C incidente (mJ/cm ²)
2	0,256	0,000427	283,05	215,75
5	0,451	0,000751	497,44	379,16
8	0,650	0,001083	716,94	546,47
15	1,172	0,001953	1293,50	985,95

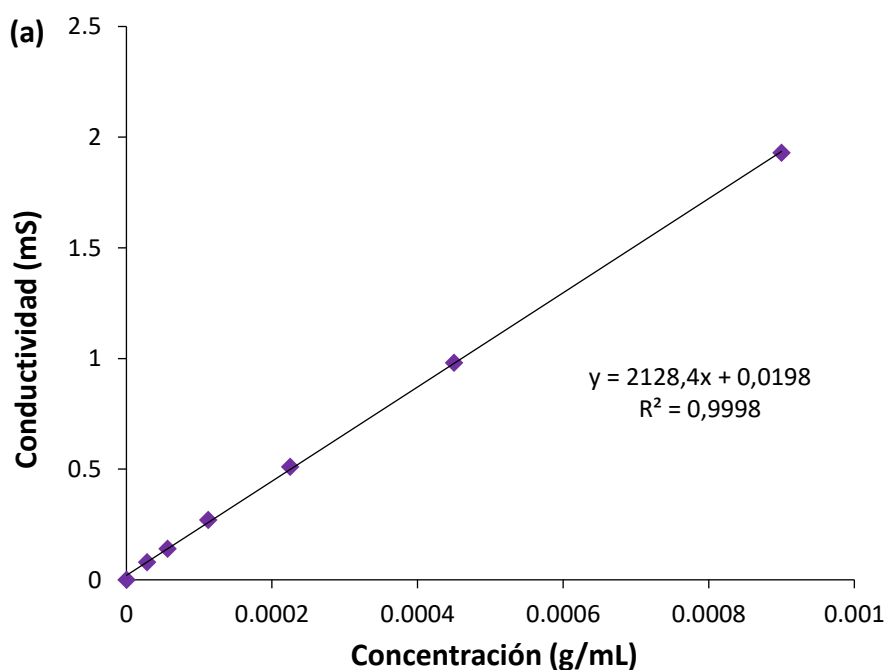
Si bien los datos relativos a la dosis de UV-C incidente en sistemas para el tratamiento de jugos UV-C son escasos, estudios previos realizados en el laboratorio determinaron una dosis de UV-C incidente de 1395,0 mJ/cm² para un reactor para el procesamiento UV-C de matrices líquidas (Mytilinaki, 2008). En ese caso, el reactor presentaba un diseño distinto al usado en esta tesis, presentando una sola lámpara UV-C.

4.6. Determinación de la distribución de dosis de UV-C mediante biosimetría

4.6.1. Determinación de la distribución de tiempos de residencia en el reactor UV-C

En primer lugar, se procedió a construir una curva de calibración con el objetivo de transformar las conductividades medidas a la salida del reactor UV-C en concentraciones de cloruro de sodio empleando una solución madre (**Fig. 4.4.a**), cuya concentración fue de 0,0009 g/mL. Empleando la curva de calibración obtenida, fue posible determinar posteriormente la distribución de la concentración de cloruro de sodio (% m/v).

A partir de la distribución de la concentración de cloruro de sodio (**Fig. 4.4.b**), fue posible determinar la distribución de tiempos de residencia en el reactor UV-C, también conocida como $E(t)$ (**Fig. 4.4.c**). La curva $E(t)$ representa la fracción de fluido que abandona el sistema a cada tiempo, es decir, la función de distribución de tiempos de residencia (DTR).



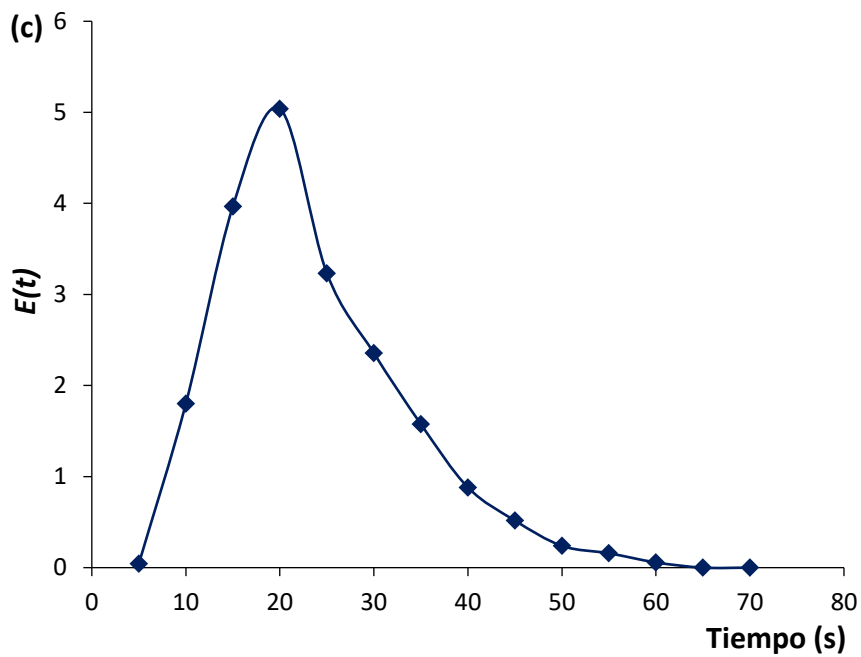
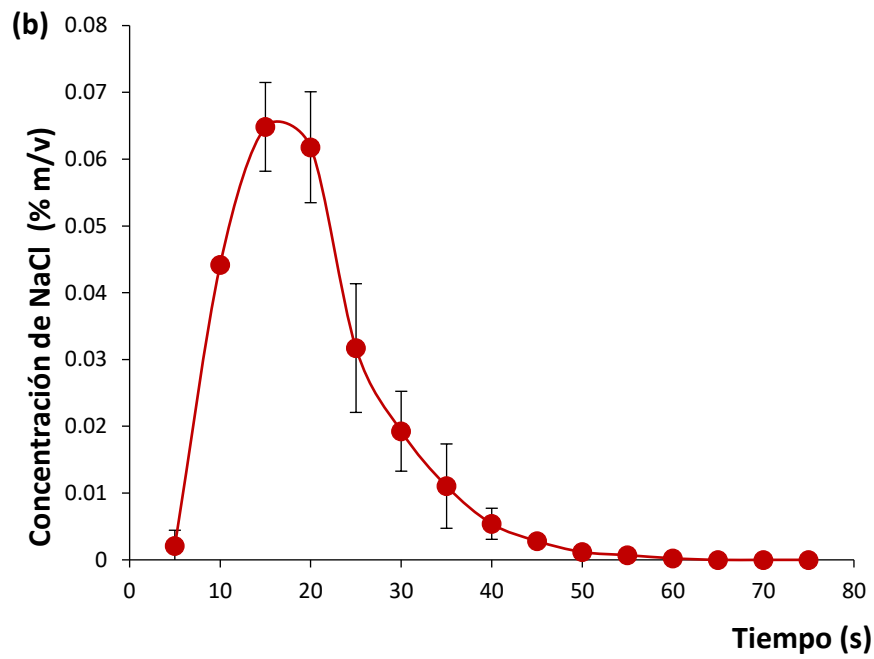


Figura 4.4. (a) Curva de calibración para una solución madre de cloruro de sodio determinada con un conductímetro; (b) Distribución de la concentración (%) en el tiempo (s) de una solución de cloruro de sodio marcadora dentro del reactor UV-C: $c(t)$; (c) Función normalizada de la distribución de tiempos de residencia en el reactor UV-C: $E(t)$.

Las formas de los gráficos de concentración de la solución marcadora en el tiempo y de distribución de tiempo de residencias en el reactor UV-C son similares a las obtenidas por Koutchma y Parisi (2004) para el estudio de la distribución de biodosis en un reactor UV-C anular.

En base a los resultados, se estableció que el tiempo de residencia promedio en el reactor fue de 19,87 segundos, mientras que el tiempo de residencia teórico de 20,63 segundos. En consecuencia, el cociente entre el tiempo de residencia promedio y el teórico fue igual a 0,96. Puesto que el cociente resultó cercano a 1, es posible asumir que el volumen del reactor fue aprovechado casi en su completitud (Koutchma y col., 2007).

4.6.1. Determinación de la distribución de biodosis

En primer lugar, se determinó como decaía la irradiancia UV-C (I_r) en el jugo de manzana Baggio en función de la distancia respecto de la lámpara, tal como se detalla en la Sección 3.10.2, a modo de calcular posteriormente la irradiancia promedio (I_{av}).

Tabla 4.2. Determinación de la distribución de la irradiancia UV-C (I_r) en los distintos puntos del espacio anular del reactor UV-C (V_r = volumen del espacio anular de radio r).

Radio del reactor (cm)	Distancia desde lámpara UV (cm)	V_r (cm ³)	I_r (mW/cm ²)	$I_r * V_r$
1,30	0,00	0,0000	2,8243	0,0000
1,40	0,10	4,3065	2,6094	11,2375
1,50	0,20	5,2862	2,4233	12,8101
1,60	0,30	6,3883	2,2605	14,4410
1,65	0,35	6,9853	2,1866	15,2738

Realizando la suma de todas las irradiancias multiplicadas por el volumen del espacio anular, se obtuvo el valor de la I_{av} (0,5376 mW/cm²). Luego, se multiplicó la irradiancia promedio (I_{av}) por el tiempo de residencia medio, obteniéndose un valor de 10,4837 mJ/cm². Este valor fue dividido por las reducciones logarítmicas (3,4 ciclos logarítmicos) obtenidas para la inactivación de *E. coli* (Fig. 4.5) a fin de determinar una dosis de UV decimal, D_{10} , de 3,0834 mJ/cm².

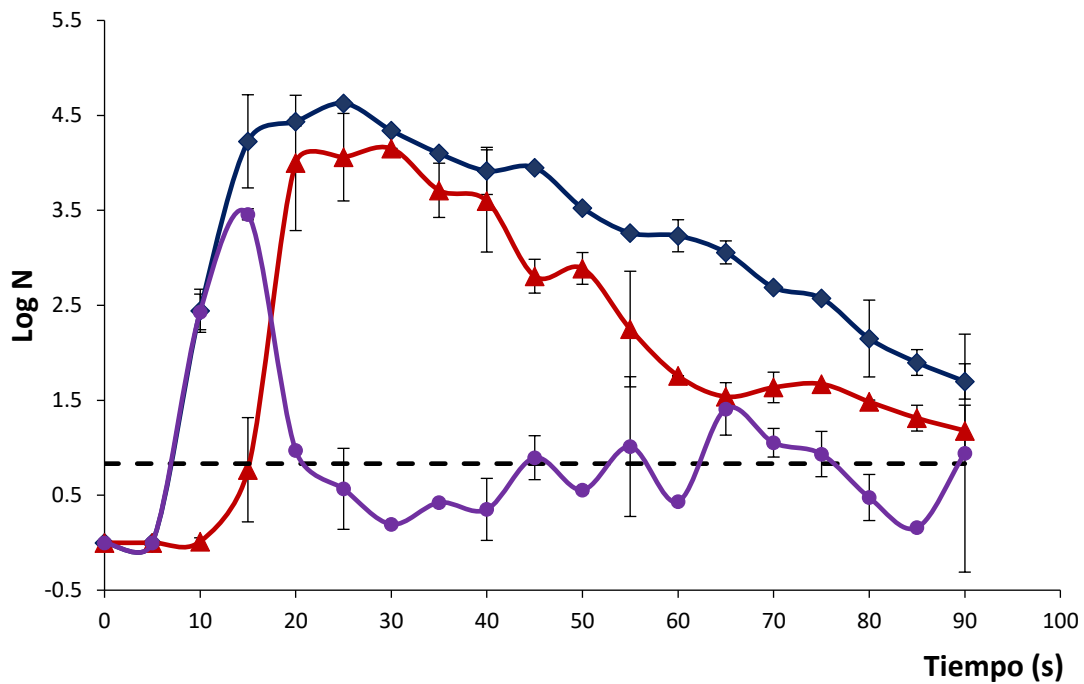


Figura 4.5. Bioensayo de la distribución de fluencia en un reactor UV-C anular (1,8 L/min), presentando la concentración de *E. coli* como una función de la distribución de tiempo de exposición al ser irradiada (—, ▲) y no irradiada (—, ◆) con luz UV-C, junto a la diferencia entre células de *E. coli* irradiadas y las no irradiadas (—, ●). Inactivación promedio (- - -).

Por su parte, Koutchma y Parisi (2004) determinaron la distribución de dosis de UV en un jugo de manzana usando *E. coli* K12 como marcador en un reactor UV-C consistente en una única lámpara (12,5 mL/s). Estos autores describieron una dosis UV decimal de 4,7 mJ/cm² con un tiempo de residencia promedio de 7 a 9 s.

Segunda parte

4.7. Caracterización de las curvas de inactivación microbiana

En el caso de la aplicación simple de temperatura, no se detectaron cambios significativos en la inactivación de *Escherichia coli* ATCC 35218, *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 y *Pseudomonas fluorescens* ATCC 49838 en el jugo de zanahoria-naranja tras 15 minutos de tratamiento ($p < 0,001$) (**Fig. 4.6.I**). La aplicación simple de temperatura moderada generó 0,6-1,5 reducciones logarítmicas para las tres cepas estudiadas, sin existir diferencias significativas al incrementar la temperatura. Sin embargo, el tratamiento con T:50 °C generó una leve inactivación de 0,6 reducciones logarítmicas de tanto *E. coli* como de *S. cerevisiae*, mientras que provocó 1,6 reducciones logarítmicas para de *P. fluorescens* (**Fig. 4.6.I**). Por otro lado, se lograron niveles de inactivación superiores para los tratamientos UV-C simples (2,5-2,9 reducciones logarítmicas) en comparación a los tratamientos simples con temperatura moderada, sin existir diferencias significativas entre las tres cepas.

Los distintos tratamientos con luz UV-C aplicados (0,0-2032,0 mJ/cm²; 15 minutos) provocaron 2,9-6,0; 2,5-4,2 y 2,9-8,0 (no detectable tras 8 minutos de procesamiento) reducciones logarítmicas de *E. coli*, *S. cerevisiae* y *P. fluorescens*, respectivamente- según la temperatura aplicada. El parámetro de interacción del ANOVA entre los factores *Tratamiento*temperatura* resultó ser significativo, prediciendo adecuadamente $\text{Log}(N/N_0)$ ($p < 0,001$).

En el caso de *P. fluorescens*, se detectaron efectos de inactivación sinérgicos para los tratamientos UV-C/T a 45 y 50 °C, puesto que se obtuvieron 5,3 y 8,0 reducciones logarítmicas tras 15 minutos de procesamiento, respectivamente. Además, se registró un efecto aditivo en la inactivación de *P. fluorescens* para el procesamiento UV-C/T a 40 °C.

Por su parte, se observó sinergismo para la inactivación de *E. coli* por UV-C/T a 50 °C, alcanzando 6,0 reducciones logarítmicas a los 15 minutos de tratamiento (**Fig. 4.6.II**). Este resultado está en concordancia con el de Gayán y col. (2012.a), quienes detectaron un efecto sinérgico en la inactivación de *E. coli* STCC 4201 cuando el procesamiento UV-C/T se efectuó a 50 °C.

Con respecto a *S. cerevisiae*, se observó que los tratamientos UV-C/T a 45 y 50 °C incrementaron la inactivación (3,4-3,5 reducciones logarítmicas) en comparación con el procesamiento UV-C simple. En oposición, Gouma y col. (2015) observaron que el empleo de una temperatura de asistencia al tratamiento UV-C de 50 °C no afectaba la inactivación

de *S. cerevisiae* en jugo de manzana. No obstante, cuando se usaron temperaturas más altas de asistencia (55,0 y 57,5 °C), observaron efectos sinérgicos de inactivación.

En el caso de los tratamientos UV-C/T de *E. coli* y *S. cerevisiae* a 40 °C, los efectos de los tratamientos UV-C asistidos por temperatura moderada resultaron indiferentes ($p < 0,001$).

En general, las curvas de inactivación para los tratamientos con luz UV-C simple exhibieron un hombro reducido y carecieron de cola. Para las curvas correspondientes a los tratamientos UV-C/T, se observó ausencia de hombro y presencia de cola (**Fig. 4.6.II**).

La presencia de cola en las curvas correspondientes a los tratamientos con UV-C/T podría deberse, entre otros motivos, a la existencia de miembros más resistentes en las poblaciones de cada uno de los tres microorganismos. Otro motivo podría ser la alta absorción de las muestras del jugo mezcla en la región UV debida a la presencia de sólidos en suspensión (Rowan y col., 2015).

Mientras tanto, existen múltiples explicaciones posibles para la presencia de hombro en las curvas de inactivación correspondientes al tratamiento UV-C, dentro de las cuales se incluyen:

- ❖ La existencia de cúmulos de células microbianas.
- ❖ Una etapa en la cual los microorganismos son capaces de sintetizar de nuevo alguno de sus componentes vitales más velozmente que la tasa de destrucción celular.
- ❖ La existencia de un gran número de componentes celulares que deben ser inactivados para generar la muerte celular (fenómeno de un solo-golpe para múltiples-blancos). En esta situación, el tipo de daño microbiano es acumulativo más que instantáneamente letal (Gouma y col., 2015).

Taze y col. (2015) también reportaron curvas sin hombro y con cola extensa para la inactivación de la flora nativa en jugo de naranja tratado con UV-C (0,0-108,4 mJ/cm²). Similarmente, La Cava y Sgroppo (2018) reportaron curvas de inactivación sin hombro y con cola para *S. cerevisiae* IMR-R-L 962 inoculada en jugo de pomelo procesado con UV-C (0,0-2360,0 mJ/cm²; 25±1°C).

Excepcionalmente, se obtuvieron curvas con hombro y sin cola para *P. fluorescens* tratada con UV-C/T a 45 y 50 °C (**Fig. 4.6.II**). Estos resultados son consistentes con los de Gayán y col. (2012.a), que detectaron curvas de inactivación con hombro y sin cola para *E.*

coli STCC 4201 en jugo de naranja (pH=2,8; 10 °Brix, 4460 NTU; α : 81,10 cm⁻¹) procesado con luz UV-C (25 °C; 13600,0 mJ/mL). Adicionalmente, reportaron curvas de inactivación con hombro y sin cola para tratamientos UV-C/T realizados a 40 °C y 50 °C (0,25-0,84 reducciones logarítmicas).

Por su parte, Gouma y col. (2015) obtuvieron curvas con hombro y sin cola para jugo de manzana (pH=3,6; 2,4 NTU; α :24,9 cm⁻¹) inoculado con distintas cepas de *S. cerevisiae* (*S. cerevisiae* STCC 1172, *S. cerevisiae* STCC 1170, *S. cerevisiae* STCC 11034, y de *S. cerevisiae* STCC 1996) y procesado con UV-C (3700,0 mJ/mL) a 25, 45 y 50 °C. Estos autores observaron menos de una reducción logarítmicas para la cepa estudiada, mientras aquí se alcanzaron 2,5-4,2 reducciones logarítmicas para *S. cerevisiae* KE 162. Adicionalmente, Gayán y col. (2013.b), expusieron cultivos de *E. coli* STCC 4201 en buffer McIlvaine a tratamientos UV-C/T (25-55 °C), observando curvas con un hombro inicial seguido de una fase de inactivación exponencial sin cola.

Es importante señalar que *E. coli* y *P. fluorescens* resultaron más sensibles a los tratamientos con luz UV-C simple y con UV-C/T que *S. cerevisiae*. De modo similar, La Cava y Sgroppo (2018) reportaron que *E. coli* ATCC 25922 resultaba más sensible al tratamiento UV-C que *S. cerevisiae* IMR-R-L 962. Por su parte, Kaya (2011) observó que *S. cerevisiae* NRRL Y-139 era más resistente al tratamiento UV-C (0,0-45360,0 mJ/cm²) que *E. coli* K12 en jugo de uva claro (pH=3,45±0,01; turbidez: 32,50±0,14 NTU; °Brix= 17,42±0,01; coeficiente de absorción UV: 5,63±0,01 cm⁻¹).

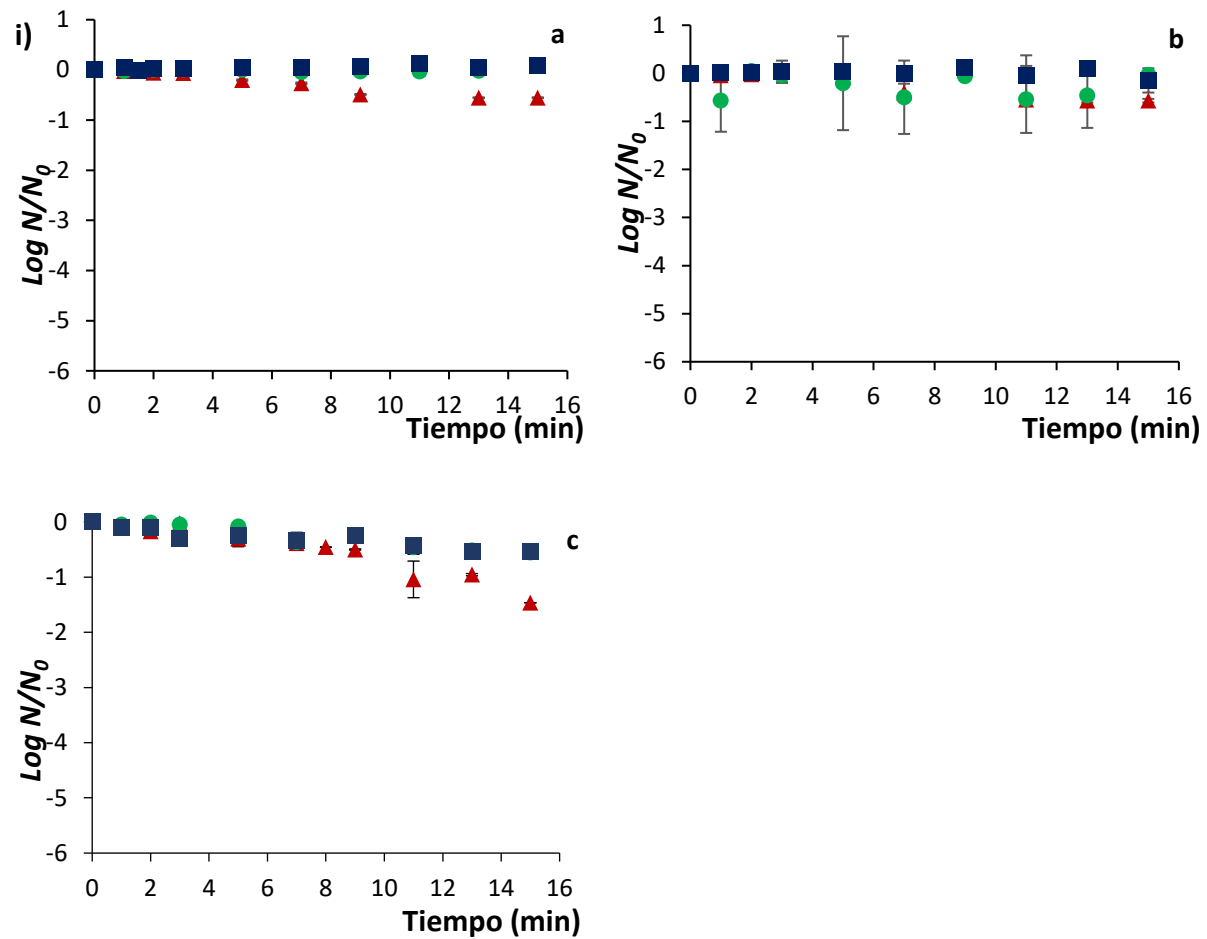


Figura 4.6. (i) Curvas de inactivación microbiana experimentales (símbolos) para el tratamiento individual de temperatura moderada: **(a)** 40 °C; **(b)** 45 °C; y **(c)** 50 °C de *E. coli* (\blacktriangle), *S. cerevisiae* (\blacksquare) y *P. fluorescens* (\bullet) en jugo de zanahoria-naranja (15 min).

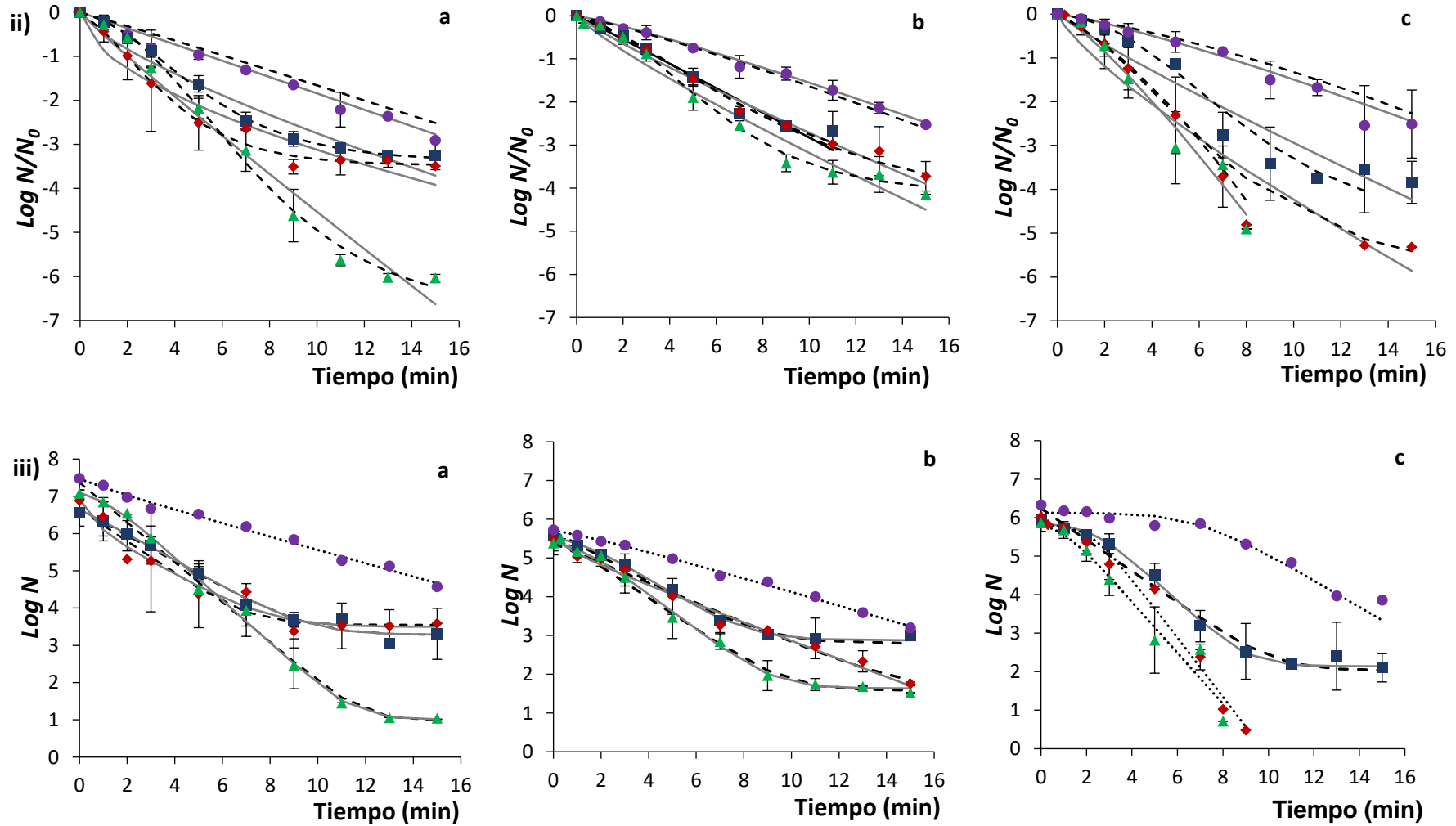


Figura 4.6. (ii) Curvas de inactivación microbiana (símbolos) ajustadas con el modelo de Weibull (—) y de Gompertz (---); y (iii) ajustadas con el modelo de Geeraerd con hombro y cola (—), con hombro y sin cola (...), y con cola sin hombro (---) de *E. coli* (a), *S. cerevisiae* (b) y *P. fluorescens* (c) en jugo de zanahoria-naranja, tratado con luz UV-C simple (•) (0,0-2032,0 mJ/cm²; 15 min), o con UV-C/T asistido a 40 °C (■), 45 °C (◆) o 50 °C (▲).

La **Tabla 4.4** presenta los valores promedio y los correspondientes valores de desvío estándar para los parámetros correspondientes a los modelos de Weibull, Gompertz y Geeraerd aplicados a las curvas de inactivación obtenidas. Los datos de la inactivación para los tratamientos con temperatura moderada simples no fueron modelados, puesto que los niveles alcanzados fueron cercanos a un ciclo logarítmico, lo cual es considerado el error experimental para cualquier tratamiento de pasteurización.

El modelo de Weibull resultó adecuado para describir la inactivación microbiana ($R^2_{aj}=96,5-99,5\%$). Varios estudios han demostrado la capacidad del modelo de Weibull para describir la inactivación microbiana por UV-C tanto en matrices líquidas (Baysal y col., 2013; Taze y col., 2015), como sólidas (Cheigh y col., 2013; Syamaladevi y col., 2013). En general, las curvas de inactivación correspondientes al tratamiento UV-C/T presentaron valores de $n < 1$ (**Tabla 4.4**), lo cual era esperado ya que resultaron ser cóncavas hacia arriba. La concavidad hacia arriba indicaría que el procesamiento se hace menos efectivo a mayores dosis de UV. Como situación excepcional, *P. fluorescens* tratada por UV-C/T a 50 °C exhibió concavidad hacia abajo ($n > 1$), lo cual significa que los miembros poblacionales más sensibles fueron debilitados a dosis menores de UV, permaneciendo viva una gran fracción de microorganismos resistentes.

Los resultados aquí expuestos están de acuerdo con estudios realizados previamente que observaron una concavidad hacia arriba ($n < 1$) para curvas de inactivación correspondientes a tratamientos UV-C. Taze y col. (2015) caracterizaron las curvas de inactivación para la flora nativa de un jugo de naranja expuesto a UV-C (108,4 mJ/cm²), observando concavidad hacia arriba y valores de $n < 1$. Adicionalmente, Flores-Cervantes y col. (2013) obtuvieron curvas de inactivación para esporas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* en néctar de durazno tratado con luz UV-C simple (20300,0 mJ/cm²) o combinada con antimicrobianos mediante el modelo de Weibull, reportando valores de $n < 1$ (0,19-0,72) para ambas cepas. Por su parte, Baysal y col. (2013) también detectaron curvas de inactivación cóncavas hacia arriba para *Alicyclobacillus acidoterrestris* inoculado en un jugo de uva blanca claro (pH=3,2; 16,6 °Brix, y 5,5 NTU) sometido a un tratamiento con luz UV-C (0,0-500,0 mJ/cm²).

Similarmente a la curva de inactivación obtenida para *P. fluorescens* sometida al tratamiento UV-C/T a 50 °C, Ochoa-Velasco y col. (2014) obtuvieron una curva cóncava hacia abajo ($n > 1$) para la inactivación con luz UV-C (0,0-102,6 mJ/cm²) de *Salmonella* Typhimurium en leche de coco.

Tabla 4.4. Parámetros estimados de los modelos de Geeraerd, Weibull y Gompertz correspondientes a la inactivación de *E. coli*, *S. cerevisiae* y *P. fluorescens* en jugo de zanahoria-naranja tratados con UV-C simple o UV-C/T asistido a distintas temperaturas (15 min).

Tratamiento/ Microorganismo		Geeraerd									Weibull			Gompertz				
		Log-lineal con cola			Log-lineal con hombro			Log-lineal con hombro y cola			<i>b</i>	<i>n</i>	<i>R</i> ² _{aj}	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>R</i> ² _{aj}	
		<i>LG</i>	<i>K</i> (min ⁻¹)	<i>R</i> ² _{aj}	<i>SL</i> (min)	<i>K</i> (min ⁻¹)	<i>R</i> ² _{aj}	<i>LG</i>	<i>SL</i> (min)	<i>k</i> (min ⁻¹)								<i>R</i> ² _{aj}
UV-C	<i>E. coli</i>	-	-	-	-0,75 (0,01)	0,41 (0,02)	98,7	-	-	-	-	0,18 (0,02)	1,01 (0,03)	99,4	0,43 (0,38)	-0,04 (0,08)	-11,93 (20,00)	99,2
	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	1,00 (0,01)	0,41 (0,01)	99,6	-	-	-	-	0,11 (0,01)	1,15 (0,05)	98,9	0,82 (0,14)	-0,07 (0,05)	-7,40 (5,07)	99,1
	<i>P. fluorescens</i>	-	-	-	6,92 (0,03)	0,79 (0,04)	98,1	-	-	-	-	0,09 (0,02)	1,22 (0,08)	97,5	1,10 (0,31)	-0,05 (0,08)	-11,78 (27,23)	97,5
UV-C/T 40 °C	<i>E. coli</i>	3,36	0,80 (0,20)	98,2	-2,88 (0,05)	0,50 (0,05)	93,2	3,35	0,23 (0,06)	0,83 (0,51)	97,9	0,41 (0,06)	0,83 (0,06)	97,2	0,96 (0,16)	-0,25 (0,03)	-4,07 (0,28)	99,2
	<i>S. cerevisiae</i>	0,89	0,75 (0,24)	99,0	-0,77 (0,03)	0,58 (0,04)	96,4	2,67	1,24 (0,02)	0,89 (0,12)	99,6	0,27 (0,03)	1,02 (0,05)	98,7	0,92 (0,19)	-0,21 (0,05)	-4,23 (0,72)	99,1
	<i>P. fluorescens</i>	4,20	0,94 (0,79)	97,5	-	-	-	3,70	2,35 (0,06)	1,26 (0,23)	99,5	0,25 (0,05)	1,09 (0,09)	97,7	1,48 (0,13)	-0,25 (0,03)	-4,88 (0,27)	99,4
UV-C/T 45 °C	<i>E. coli</i>	3,12	1,00 (0,61)	93,6	-	-	-	3,42	-1,99 (0,09)	0,78 (0,81)	94,3	1,30 (0,20)	0,40 (0,07)	92,6	0,66 (0,64)	-0,54 (0,16)	-3,97 (0,88)	97,1
	<i>S. cerevisiae</i>	3,82	0,59 (0,72)	98,3	-	-	-	4,29	-1,14 (0,04)	0,54 (0,79)	98,2	0,34 (0,04)	0,90 (0,05)	98,5	0,82 (0,17)	-0,19 (0,03)	-4,84 (0,51)	99,3
	<i>P. fluorescens</i>	5,41	1,32 (1,44)	96,0	-1,53 (0,21)	0,84 (0,11)	86,9	4,95	2,04 (0,29)	1,71 (0,86)	97,5	0,56 (0,13)	0,86 (0,10)	92,1	1,28 (0,33)	-0,30 (0,07)	-5,76 (0,59)	95,1
UV-C/T 50 °C	<i>E. coli</i>	6,39	1,23 (0,88)	99,2	-0,72 (0,17)	1,02 (0,07)	96,4	6,09	0,96 (0,10)	1,32 (0,66)	99,5	0,55 (0,11)	0,92 (0,08)	96,5	1,40 (0,15)	-0,27 (0,03)	-6,77 (0,29)	99,2
	<i>S. cerevisiae</i>	4,00	0,93 (1,57)	96,0	-	-	-	3,79	1,11 (0,22)	1,07 (1,28)	96,3	0,40 (0,05)	0,91 (0,05)	97,2	1,17 (0,10)	-0,26 (0,02)	-4,63 (0,20)	99,4
	<i>P. fluorescens</i>	-	-	-	0,94 (0,20)	1,52 (0,13)	94,9	-	-	-	-	-	0,30 (0,05)	1,30 (0,09)	96,8	1,21 (0,77)	-0,08 (0,21)	-31,89 (140,75)

(Valor), error estándar; *R*²_{aj}, coeficiente de determinación ajustado.

Los parámetros b y n del modelo de Weibull se usaron para obtener las distribuciones de frecuencias de las resistencias (**Fig. 4.7**), junto a sus estadísticos asociados: moda (t_{cm}), media (\bar{t}_c), varianza (σ^2_{tc}) y coeficiente de sesgo (v_1). Esto permitió dar cuenta del efecto de los tratamientos con UV-C simple y con UV-C/T sobre la inactivación microbiana (**Tabla 4.5**).

Tabla 4.5. Estadísticos* del modelo de Weibull correspondientes a la inactivación de *E. coli*, *S. cerevisiae* y *P. fluorescens* en jugo de zanahoria-naranja tratado con UV-C simple (20 °C) o con UV-C/T (40, 45 y 50 °C).

<i>Microorganismo</i>	<i>Tratamiento</i>	t_{cm} (min)	\bar{t}_c (min)	σ^2_{tc} (min ²)	v_1 (-)
<i>E. coli</i>	20 °C	0,06	5,44	29,00	2,10
	40 °C	-	3,23	15,36	2,61
	45 °C	-	1,72	29,34	10,68
	50 °C	-	2,14	4,98	2,21
<i>S. cerevisiae</i>	20 °C	1,16	6,49	31,99	1,86
	40 °C	0,08	3,58	12,32	2,08
	45 °C	-	3,49	15,08	2,37
	50 °C	-	2,86	9,92	2,34
<i>P. fluorescens</i>	20 °C	1,89	6,39	26,49	1,74
	40 °C	0,36	3,45	10,05	1,95
	45 °C	-	1,94	5,37	2,57
	50 °C	0,83	2,31	3,17	1,68

*Estadísticos del modelo de Weibull: t_{cm} =moda de la distribución; \bar{t}_c =media de la distribución; σ^2_{tc} =varianza; v_1 =coeficiente de sesgo.

Las distribuciones de frecuencias de resistencias para los tratamientos UV-C simples y UV-C/T a 40 °C resultaron chatas con una dispersión de datos importante, colas elongadas, presencia de moda, junto a valores de media y varianza altos. Este tipo de curvas da cuenta de que una fracción considerable de la población microbiana permanece viva tras el procesamiento. A modo de excepción, la distribución de frecuencias para *E. coli* tratada con UV-C/T a 40 °C carecía de moda (**Fig. 4.7**).

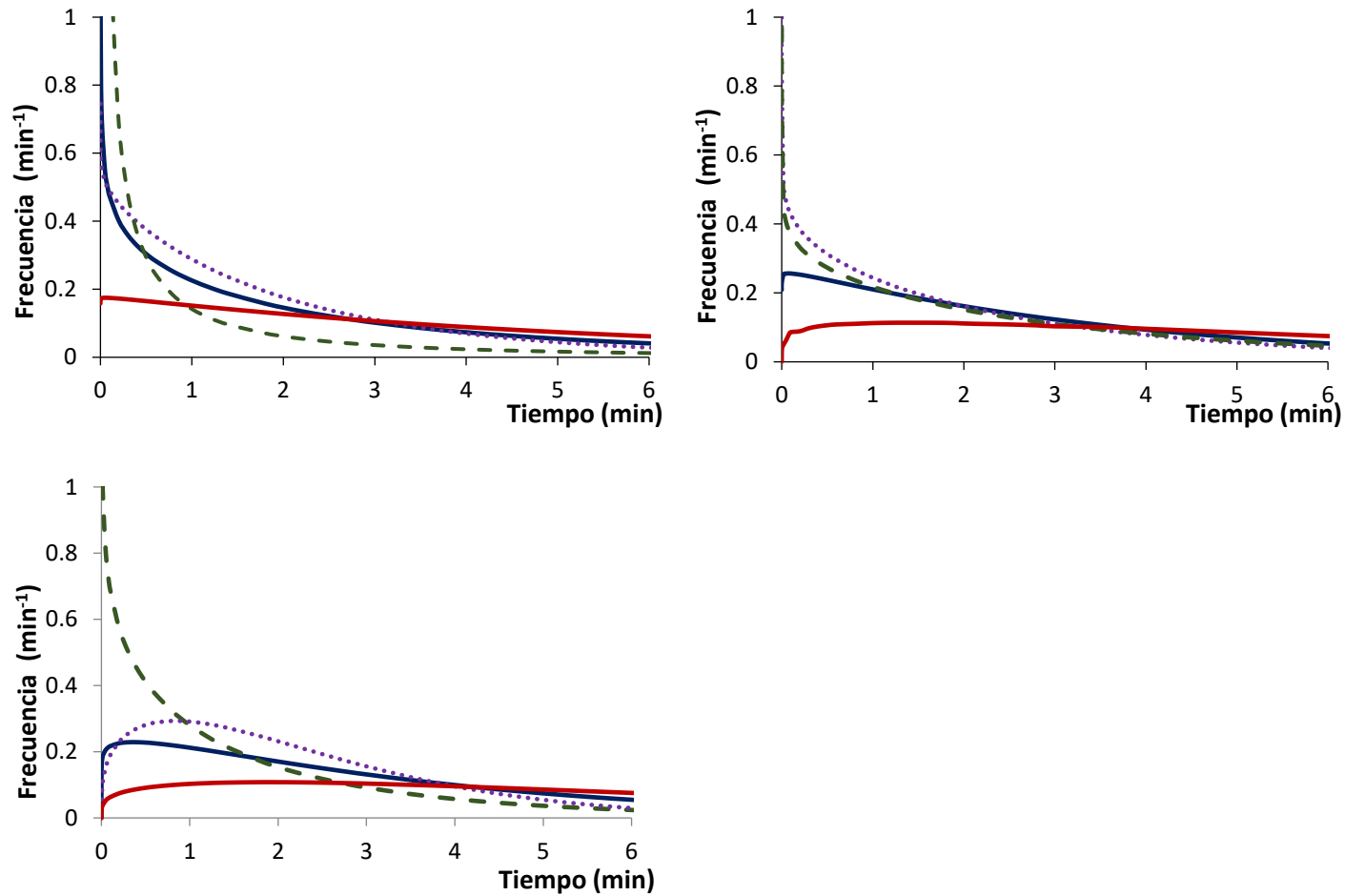


Figura 4.7. Distribuciones de frecuencia de las resistencias correspondientes a las curvas de inactivación microbiana en jugo de zanahoria-naranja procesado con UV-C simple (■), o con UV-C/T asistido a 40 (■), 45 (---) y 50 °C (···) de: **(a)** *E. coli*; **(b)** *S. cerevisiae*; y **(c)** *P. fluorescens*; **(b)**

Las distribuciones de frecuencias para los tratamientos UV-C/T:45 °C y UV-C/T:50 °C estaban más sesgadas hacia la derecha, no presentando moda alguna (**Fig. 4.7**). Además, se registró una caída en los valores de media y varianza obtenidos al incrementar la temperatura, lo que indicaría que la mayor parte de la población fue inactivada a menores tiempos. Estos resultados concuerdan con los de Schenk y col. (2008), quienes observaron distribuciones sesgadas a la derecha, con esparcimiento considerable de los datos de muerte (valores grandes de varianza), sin colas y sin moda para el tratamiento UV-C (0,0-8700,0 mJ/cm²) de rodajas de pera inoculadas con distintas cepas microbianas. Estos autores atribuyeron la forma de esas distribuciones al hecho de que la mayoría de la población fue destruida en corto tiempo tras la exposición UV-C, mientras una fracción minoritaria sobrevivió tras el tratamiento.

De acuerdo con los resultados obtenidos, *E. coli* resultó ser la cepa más sensible a todos los tratamientos, mostrando valores de media en el rango de los 2,1-5,5 minutos, seguida por *P. fluorescens* (2,3-6,6 min) y *S. cerevisiae* (2,8-6,6 min). En concordancia con este hecho, Gayán y col. (2016) reportaron que las bacterias Gram-negativas resultaban más sensibles que a la luz UV-C que las levaduras.

Por su parte, el modelo de Gompertz también resultó apropiado para describir los datos de la inactivación microbiana. Esto se evidenció tanto en los altos valores de R^2_{aj} (97,8-99,7 %). El parámetro correspondiente a la duración del hombro inicial, conocido como *A* (min), presentó valores bajos (0,43-1,40 min para *E. coli*; 0,78-1,17 min para *S. cerevisiae*; 1,10-1,48 para *P. fluorescens*). El mayor valor de *A* obtenido para *P. fluorescens* indica que se necesita más de un golpe UV para lograr su inactivación. Por otro lado, no se vio un patrón de cambios en el valor de *A* al aumentar la temperatura de asistencia al tratamiento UV-C, lo cual podría conectarse al hecho de que las curvas para los tratamientos UV-C/T a 45 y 50 °C no presentaron un hombro marcado.

Resulta importante señalar que la combinación de los tratamientos UV-C y temperatura moderada generó un incremento en el cambio global del número de sobrevivientes (*C*), lo cual indica una mayor eficiencia del proceso de inactivación. La tasa de muerte máxima (*B*) resultó más afectada por la cepa en cuestión que por la temperatura. En específico, *E. coli* resultó la cepa más sensible presentando valores de *B* mayores (-0,25 min⁻¹ a -0,54 min⁻¹) para los tratamientos UV-C/T (45 y 50 °C).

Por otro lado, las curvas de inactivación para *E. coli* y *P. fluorescens* tratadas con luz UV-C simple, junto a la de *P. fluorescens* sometida a UV-C/T a 50 °C carecieron de cola. Si bien el modelo de Gompertz permitió caracterizarlas apropiadamente, se detectó una

sobreestimación del valor de C en comparación con los datos experimentales. Ferrante y col. (2007) también reportaron una sobreestimación de C al aplicar la ecuación de Gompertz para describir la respuesta de *Listeria monocytogenes* ATCC 19114D en jugo de naranja (pH=3,5) procesado mediante ultrasonido (600 W; 20 kHz; 45 °C) con el agregado de vainillina (0-1500 ppm). Los autores describieron una sobreestimación de C para las condiciones más severas (US con 1000 y 1500 ppm de vainillina), dado que la población microbiana murió rápidamente generando una curva de inactivación sin una región de cola y siguiendo una cinética de primer orden.

El modelo de Geeraerd en sus tres versiones (log-lineal con cola y con hombro, log-lineal sin cola y con hombro, log-lineal con cola y sin hombro) describió adecuadamente las curvas de inactivación, obteniéndose valores altos de R^2_{aj} (96,0-99,6 %). Por su parte, al incrementar la temperatura de los tratamientos UV-C/T, se observó un aumento marcado en los valores de k_{max} para todas las cepas. Por ejemplo, *E. coli* mostró valores de k_{max} de 0,41 min^{-1} y de 1,02-1,32 min^{-1} (según la variante del modelo) cuando la temperatura empleada fue de 20 y de 50 °C, respectivamente. De modo similar, se detectó un aumento en los valores de k_{max} al aumentar la temperatura de 0,41 min^{-1} a 0,93-1,07 min^{-1} y de 0,79 min^{-1} a 1,52 min^{-1} para *S. cerevisiae* y *P. fluorescens* tratadas a 20 y 50 °C, respectivamente.

Con respecto al parámetro SL (longitud del hombro) del modelo en Geeraerd, no se detectaron cambios en los valores al aumentar la temperatura, lo que se condice con lo observado para los valores de A de Gompertz. Esto sugiere que las curvas de inactivación no presentaban un hombro marcado. El parámetro SL resultó negativo en muchas ocasiones, indicando falta de hombro. Adicionalmente, una disminución de $1,4-1,9 \cdot 10^3$ a $0,0-10,0$ UFC/mL en los valores del parámetro N_{res} fue detectada al incrementar la temperatura para *E. coli* y *P. fluorescens*.

Otros autores han utilizado el modelo de Geeraerd para describir curvas de inactivación. Por ejemplo, Gayán y col. (2011) estudiaron la inactivación de distintas cepas de *Escherichia coli* (*E. coli* STCC 4201, *E. coli* STCC 471, *E. coli* STCC 27325, *E. coli* O157:H7, *E. coli* ATCC 25922) en las distintas fases de su curva de crecimiento tratada con UV-C (0,00-25000,0 mJ/mL; 8,5 L/h). En este caso, las curvas de inactivación fueron modeladas con la variante del modelo con hombro y sin cola. El parámetro SL (longitud del hombro) para las células de la fase logarítmica fue menor que para la fase estacionaria. En oposición, los valores de k_{max} fueron similares para las poblaciones pertenecientes a ambas fases. Estos autores vincularon la existencia de hombro a mecanismos de daño y reparación que se activan a lo largo del procesamiento.

Por otro lado, Baysal y col. (2013) analizaron la inactivación de esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922 inoculadas en jugo de manzana (pH=3,8; 11 °Brix y 10 NTU) y de uva blanca (pH=3,2; 16,6 °Brix y 5,5 NTU) procesados con UV-C (0,0-489,0 mJ/cm²). Puesto que las curvas presentaron cola y carecían de hombro, emplearon la variante de Geeraerd para curvas log-lineales con cola. Interesantemente, observaron que los valores de k_{max} en el jugo de uva disminuían al incrementar la dosis de UV-C. A su vez, no detectaron cambio en los valores de k_{max} al aumentar la dosis en el jugo de manzana. En relación con el parámetro N_{res} , se detectó una disminución al aumentar la dosis de UV-C.

4.8. Comparación de los modelos empleados de inactivación microbiana

Para poder comparar los tres modelos usados y analizar su bondad de ajuste, se presentan los estadísticos de RMSE, AIC y BIC asociados a las curvas de inactivación predichas para los tratamientos con UV-C simple y UV-C/T asistido (**Tabla 4.6**). En general, el modelo de Gompertz permitió un mejor ajuste. Esto se evidenció en los menores valores obtenidos para los estadísticos en 5 casos de un total de 12, seguido por el de Geeraerd (4 casos favorables) y, finalmente, por el de Weibull (3 casos favorables).

El modelo de Geeraerd presentó una performance predictiva más pobre que el de Gompertz según los estadísticos de AIC y BIC, que consideran en simultáneo el ajuste y la parsimonia (Coroller y col., 2006), puesto que penalizan el número de parámetros utilizados. Es probable que el modelo de Geeraerd provocase un sobreajuste de los datos. A pesar de ello, en 4 casos, hubo diferencias significativas en los valores de AIC y BIC a favor del modelo de Geeraerd. Estos casos son los de la inactivación de *S. cerevisiae* sometida a UV-C/T (40, 50 °C), junto a la de *P. fluorescens* procesada con UV-C simple y con UV-C/T (40 °C).

El modelo de Weibull presentó menores valores de AIC y BIC para las curvas de inactivación correspondientes a los tratamientos UV-C simples, evidenciando una sobreestimación del parámetro vinculado al cambio total en el número de sobrevivientes (C), cuando se empleó el de Gompertz. En paralelo, en el caso de las curvas correspondientes al procesamiento UV-C simple, se observó una penalización del modelo de Geeraerd en su versión para curvas con hombro y sin cola por sobre el de Weibull, ya que posee un mayor número de parámetros a considerar.

En consecuencia, el análisis de los estadísticos RMSE, AIC y BIC permitió determinar que, a nivel global, la aplicación del modelo de Gompertz presentó mejores ajustes y/o menor cantidad de parámetros explicativos usados.

Tabla 4.6. Valores mínimos de RMSE, AIC y BIC* para las curvas de inactivación correspondientes a *E. coli*, *S. cerevisiae* y *P. fluorescens* en jugo de zanahoria-naranja procesado con UV-C simple y UV-C/T asistido.

Microorganismo	Log-lineal con cola			Log-lineal con hombro			Log-lineal con hombro y cola			Weibull			Gompertz			
	RMSE	AIC	BIC	RMSE	AIC	BIC	RMSE	AIC	BIC	RMSE	AIC	BIC	RMSE	AIC	BIC	
UV-C	<i>E. coli</i>	-	-	-	0,10	-11,34	-10,13	-	-	-	0,10	-12,82	-11,91	0,10	-9,50	-8,29
	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	0,06	-23,73	-22,52	-	-	-	0,05	-26,39	-25,48	0,05	-25,15	-23,94
	<i>P. fluorescens</i>	-	-	-	0,17	-2,72	-1,51	0,17	-2,23	-0,72	0,26	5,18	6,08	0,26	5,54	6,75
UV-C/T 40 °C	<i>E. coli</i>	0,17	-1,80	-0,59	0,35	11,60	12,82	0,20	-0,23	1,28	0,28	7,38	8,29	0,05	-25,20	-23,98
	<i>S. cerevisiae</i>	0,10	-8,68	-8,37	0,20	1,47	1,79	0,07	-15,30	-14,91	0,20	0,61	0,85	0,10	-8,86	-8,54
	<i>P. fluorescens</i>	0,24	5,48	6,69	0,50	19,05	20,26	0,14	-7,11	-5,59	0,49	17,90	18,80	0,22	2,52	3,73
UV-C/T 45 °C	<i>E. coli</i>	0,32	10,11	11,32	0,45	16,51	17,72	0,30	9,30	10,81	0,35	11,19	12,10	0,17	-3,42	-2,21
	<i>S. cerevisiae</i>	0,17	-2,81	-1,60	0,17	-3,91	-2,70	0,17	-2,10	-0,59	0,14	-4,92	-4,01	0,10	-11,43	-10,22
	<i>P. fluorescens</i>	0,44	16,20	17,41	0,32	9,53	10,32	0,35	11,79	13,30	0,24	3,75	4,34	0,22	3,00	3,78
UV-C/T 50 °C	<i>E. coli</i>	0,22	2,24	3,45	0,48	18,02	19,23	0,17	-1,35	0,16	0,42	14,98	15,88	0,14	-8,99	-7,78
	<i>S. cerevisiae</i>	0,14	-5,94	-4,35	0,41	16,10	17,69	0,10	-11,05	-9,06	0,30	7,92	9,12	0,10	-10,63	-9,04
	<i>P. fluorescens</i>	-	-	-	0,47	13,47	13,26	-	-	-	0,33	8,25	8,09	0,39	10,44	10,22

*Los valores de RMSE, AIC o BIC en negrita corresponden al mejor valor hallado a fin de comparar la performance de los modelos de inactivación empleados.

4.9. Análisis de componentes principales para la evaluación de los parámetros de los modelos de inactivación

Se aplicó un análisis de componentes principales (PCA) para visualizar las relaciones espaciales entre los parámetros estimados por los tres modelos predictivos usados para ilustrar la relación entre los parámetros obtenidos y la inactivación observada para cada combinación de microorganismo y tratamiento en jugo de zanahoria-naranja (Fig. 4.8).

El coeficiente de correlación cofenética obtenido (CCC=0,96) indica que se logró mediante el PCA una reducción adecuada de la dimensionalidad de los datos. Se retuvieron las dos componentes principales (CP1 y CP2) puesto que explicaban más del 71 % de la varianza total. La CP1 explicó 38,1 % de la varianza; mientras que la CP2, el 32,9 %. La CP1 separó la moda del modelo de Weibull, la longitud del hombro del modelo de Geeraerd (SL), el hombro inicial del modelo de Gompertz (A) y el cambio total en el número de sobrevivientes (C) de Gompertz, que estaban todas asociadas negativamente, de la tasa de muerte máxima de Gompertz (B) y del sesgo de Weibull (cuya asociación era positiva). Por otro lado, la CP2 fue asociada positivamente con los valores de media y de varianza correspondientes al modelo de Weibull, y negativamente con los del hombro inicial del modelo de Gompertz (A) y la tasa de inactivación del modelo de Geeraerd (k_{max}).

El tratamiento UV-C/T a 50 °C resultó ser el más efectivo, lo cual quedó evidenciado por el hecho de que se obtuvieron altos valores de la tasa de inactivación del modelo de Geeraerd (k_{max}), junto a bajos valores de la media y varianza correspondientes al modelo de Weibull para todas las cepas. A su vez, se observaron menores niveles de inactivación para los tratamientos UV-C simples, por lo que los valores de media y varianza weibullianas fueron los más elevados, mientras que los de la k_{max} del modelo de Geeraerd resultaron los más bajos.

Adicionalmente, las cepas bacterianas resultaron más sensibles al procesamiento UV-C/T a 50 °C que la levadura, lo que se evidenció en los mayores valores de k_{max} obtenidos. Por un lado, *P. fluorescens* mostró valores de k_{max} elevados para todos los tratamientos UV-C/T, lo que indicaría su alta sensibilidad. En cambio, para *E. coli* y *S. cerevisiae* se detectó un incremento gradual en los valores de k_{max} al aumentar la temperatura del tratamiento UV-C/T.

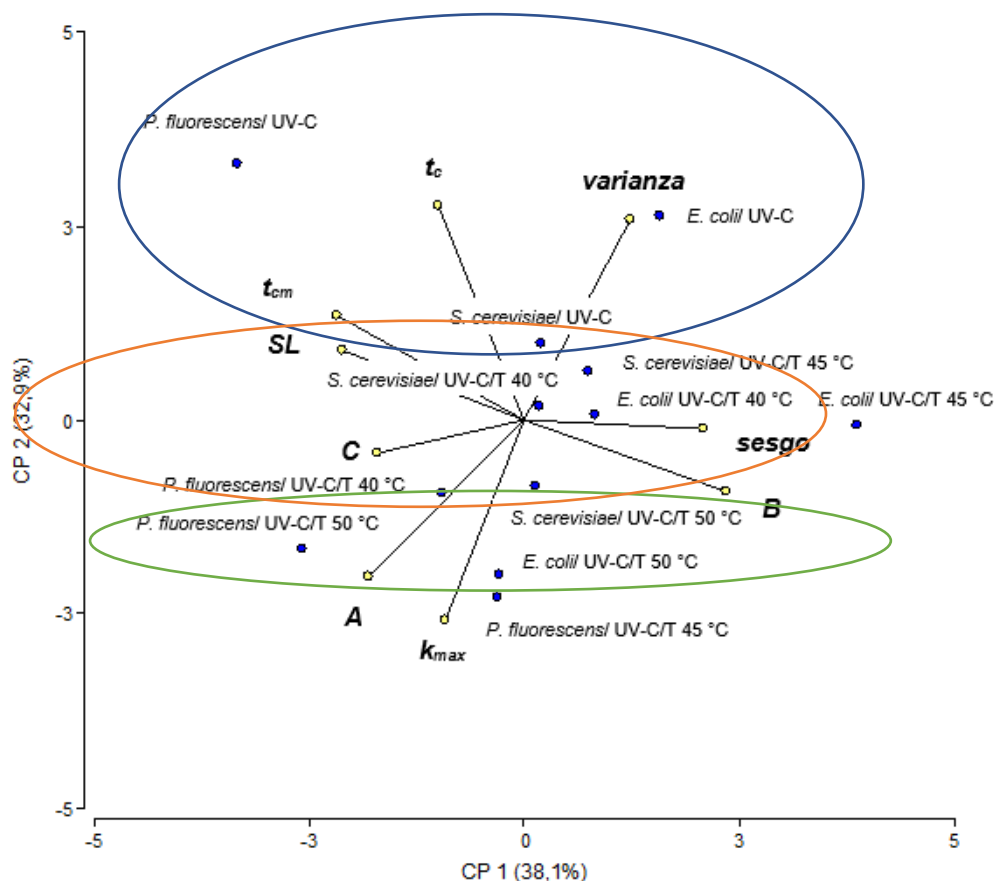


Figura 4.8. Gráfico bidimensional del PCA ilustrando la relación entre los parámetros a los modelos cinéticos de Weibull, Gompertz o Geeraerd en jugo de zanahoria-naranja procesado con UV-C simple o UV-C/T asistido.

4.10. Optimización del tratamiento UV-C asistido por temperatura moderada (UV-C/T) mediante la metodología de superficies de respuesta (RSM)

Se expresó el efecto de la temperatura (T) y del tiempo de tratamiento (t) sobre las reducciones logarítmicas ($\text{Log } N/N_0$) alcanzadas tras la exposición a UV-C simple o UV-C/T asistido mediante ecuaciones logarítmicas de segundo orden. Los modelos postulados resultaron apropiados para describir los datos experimentales ($R^2_{aj}=89,6-98,9 \%$).

Las mejores ecuaciones para la predicción de $\text{Log } N/N_0$ de *E. coli* ATCC 35218 (**Ec. 4.1**), *S. cerevisiae* KE 162 (**Ec. 4.2**) y *P. fluorescens* ATCC 49838 (**Ec. 4.3**) conteniendo el tiempo de tratamiento (t) y la temperatura (T) fueron:

$$\text{Log } \frac{N}{N_0} = 3,69 + 0,83 * T + 1,51 * t - 0,60 * T * t - 0,94 * t^2 \quad (4.1)$$

$$\text{Log } \frac{N}{N_0} = 2,85 + 0,41 * T + 1,35 * t - 0,34 * T * t - 0,68 * t^2 \quad (4.2)$$

$$\text{Log} \frac{N}{N_0} = 4,88 + 0,34 * T + 1,91 * t - 0,56 * T^2 - 1,74 * t^2 + 0,24 * T * t \quad (4.3)$$

De acuerdo con el ANOVA, la importancia relativa de los términos lineales, cuadráticos y de interacción resultó ser distinta según la cepa microbiana. Por otra parte, t fue el factor que más influyó sobre $\text{Log } N/N_0$ para todas las cepas estudiadas, seguido por T , t^2 y la interacción $T*t$ para *E. coli* y *S. cerevisiae*; y de t^2 , T^2 y T para *P. fluorescens* (Tabla 4.7). Además, la significación del efecto de cada variable sobre la respuesta ($\text{Log } N/N_0$) fue analizada mediante la suma de cuadrados, para todos los términos que las involucraban (Tabla 4.8). En base a la contribución de cada variable, la suma de cuadrados reveló que el tiempo de tratamiento, t , era el factor con mayor influencia sobre las reducciones logarítmicas observadas: $\text{Log } N/N_0$ (Tabla 4.8).

Tabla 4.7. Valores de los coeficientes de regresión polinómicos de segundo orden, representando la relación entre las reducciones logarítmicas detectadas ($\text{Log } N/N_0$) y las variables independientes de procesamiento (t ; T) para *E. coli* ATCC 35218, *S. cerevisiae* KE 162, y *P. fluorescens* ATCC 49838 en jugo de zanahoria-naranja procesado con UV-C/T.

Microorganismo	Coficiente	GL	Estimación	t	P
<i>E. coli</i> ATCC 35218	Constante	1	3,69	11,94	0,00
	T	1	0,89	3,78	0,02
	T	1	1,51	6,90	0,01
	t^2	1	-0,94	-2,48	0,07
	$T*t$	1	0,60	2,243	0,09
<i>S. cerevisiae</i> KE 162	Constante	1	2,85	22,24	0,00
	T	1	0,41	4,51	0,01
	T	1	1,35	14,91	0,00
	t^2	1	-0,68	-4,36	0,01
	$T*t$	1	0,34	3,09	0,04
<i>P. fluorescens</i> ATCC 49838	Constante	1	4,88	23,55	0,00
	T	1	0,34	3,03	0,06
	T	1	1,91	16,84	0,00
	T^2	1	-0,56	-2,85	0,07
	t^2	1	-1,74	-8,83	0,00
	$T*t$	1	0,24	1,73	0,18

GL: Grados de libertad; t: estadístico de Student; p: significación.

Tabla 4.8. Significación de los términos lineales, cuadráticos y las interacciones sobre las reducciones logarítmicas alcanzadas para: (a) *E. coli* ATCC 35238; (b) *S. cerevisiae* KE 162; y (c) *P. fluorescens* ATCC 49838 en jugo de zanahoria-naranja procesado con UV-C/T.

(a)

<i>Fuente</i> ¹	<i>SC</i>	<i>GL</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>
Modelo	20,8987	4		
<i>T</i>	4,0837	1	4,0837	14,27 ^{ns}
<i>T</i>	13,6203	1	13,6203	47,59 ^{****}
<i>T*t</i>	1,4400	1	1,4400	5,03 ^{ns}
<i>t</i> ²	1,7547	1	1,7547	6,13 ^{ns}
Residual	1,1448	4	0,2862	

(b)

<i>Fuente</i> ¹	<i>SC</i>	<i>GL</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>
Modelo	13,3399	4		
<i>T</i>	0,9989	1	0,9989	20,31 ^{****}
<i>T</i>	10,9381	1	10,9381	222,40 ^{****}
<i>T*t</i>	0,4686	1	0,4686	9,53 ^{ns}
<i>t</i> ²	0,9342	1	0,9342	18,99 ^{****}
Residual	0,1967	4	3,3350	

(c)

<i>Fuente</i> ¹	<i>SC</i>	<i>GL</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>
Modelo	29,5121	5		
<i>T</i>	0,7073	1	0,7073	9,15 ^{ns}
<i>T</i>	21,9268	1	21,9268	283,70 ^{****}
<i>T*t</i>	0,2304	1	0,2304	2,98 ^{ns}
<i>t</i> ²	6,020	1	6,020	77,90 ^{****}
<i>T</i> ²	0,6272	1	0,6272	8,12 ^{ns}
Residual	0,2319	3	0,0772	

¹Reducciones logarítmicas: *Log (N/N₀)*. GL: Grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios; F: estadístico de Fisher; **** significación al nivel 0,01 %; ns: no significativo.

La **Fig. 4.9** muestra las superficies de respuesta que relacionan las reducciones logarítmicas (*Log N/N₀*) alcanzadas con la temperatura (*T*) y el tiempo de procesamiento (*t*). La curvatura detectada en todos los gráficos de superficies de respuesta resaltó la importancia del término *t*². La tasa de cambio en las reducciones logarítmicas fue más severa al aumentar *T* en todos los casos, pero más marcada para *P. fluorescens* (**Fig. 4.9**).

La **Fig. 4.10** expone los gráficos de superficies de contornos vinculando las distintas temperaturas (*T*) con los tiempos de tratamiento (*t*) necesarios para lograr un dado nivel de inactivación (*Log N/N₀*) para *E. coli*, *S. cerevisiae* y *P. fluorescens* en el jugo de zanahoria-naranja procesado con UV-C/T. El tiempo de procesamiento (*t*) fue el factor que más afectó la inactivación. Por ejemplo, para *E. coli* tratada con UV-C/T a 50 °C, se alcanzaron 1,2-1,8 reducciones logarítmicas tras 3 minutos de tratamiento; mientras que a los 15 minutos se alcanzaron 5,4-6,0 reducciones logarítmicas. Esto demuestra que, a *t* elevados, la

inactivación microbiana fue mejorada. En todos los casos, T tuvo poca influencia sobre las reducciones alcanzadas (**Fig. 4.10**). Aun así, su influencia fue más marcada a tiempos mayores. Particularmente, se alcanzaron 1,5-2,0 reducciones logarítmicas a los 3,5 minutos de tratamiento, a pesar de la T aplicada. Solamente *P. fluorescens* mostró un máximo de inactivación a los valores de T y el t más elevados (**Fig. 4.10**).

En base a estos resultados, se escogió para el resto de los ensayos de la tesis al tratamiento asistido UV-C/T a 50 °C como el óptimo y se lo usó para los estudios de evolución de la flora nativa en el almacenamiento refrigerado y los de evaluación de parámetros asociados a la calidad del jugo de zanahoria-naranja.

En concordancia con estos resultados, diferentes autores han demostrado la influencia de la aplicación de temperaturas moderadas en la asistencia del tratamiento UV-C. Por ejemplo, Gayán y col. (2012.b) estudiaron la inactivación de *Salmonella* Typhimurium STCC 878 en buffer McIlvaine (pH=7,0) procesado con UV-C (19940,0 mJ/mL) asistida con temperatura moderada (50-60 °C). En general, detectaron efectos aditivos sobre la inactivación de *S. Typhimurium*. Sin embargo, el tratamiento UV-C/T a 55 °C presentó efecto sinérgico, alcanzando 2,4 reducciones logarítmicas. Similarmente, Gayán y col. (2012.a) analizaron la inactivación de *Escherichia coli* STCC 4201 en jugo de naranja (pH=2,83; 10,10 °Brix; turbidez: 4460 NTU, coeficiente de absorción UV: 81,10 cm⁻¹) procesado con UV-C/T (27100,0 mJ/mL, 40-60 °C). En su caso, vieron que la letalidad de la luz UV-C no cambiaba debajo de los 40 °C; mientras que a temperaturas (T) más altas la misma aumentó significativamente.

Además, Gayán y col. (2011) observaron que la resistencia UV de *E. coli* STCC 4201 no se modificó al aplicar temperaturas de hasta 50 °C. Superando este valor, la tasa de inactivación fue aumentando rápidamente hasta los 60 °C. El tratamiento UV-C/T a 57,5 °C tuvo efectos sinérgicos sobre la inactivación de *E. coli*, lográndose 6,2 reducciones logarítmicas versus las 1,5-3,6 reducciones obtenidas para los tratamientos UV-C. Cabe mencionar que, al emplear 60 °C como temperatura de asistencia, la magnitud del efecto sobre las reducciones logarítmicas logradas fue menor que a 57,5 °C. Una explicación posible sería que la inactivación por el procesamiento UV-C/T incrementa con la temperatura hasta llegar a un umbral, a partir del cual la tasa de inactivación pasaría a depender de la resistencia al calor de las células microbianas. Adicionalmente, los autores resaltaron la importancia de optimizar las condiciones de los tratamientos UV-C/T con el objetivo de alcanzar la inactivación más alta posible.

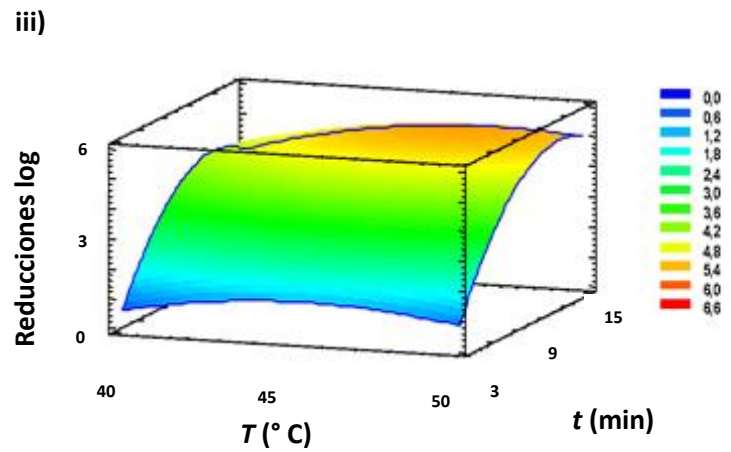
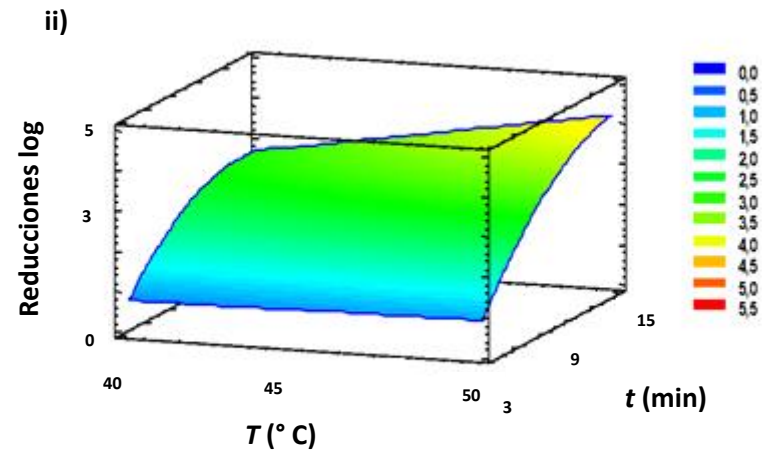
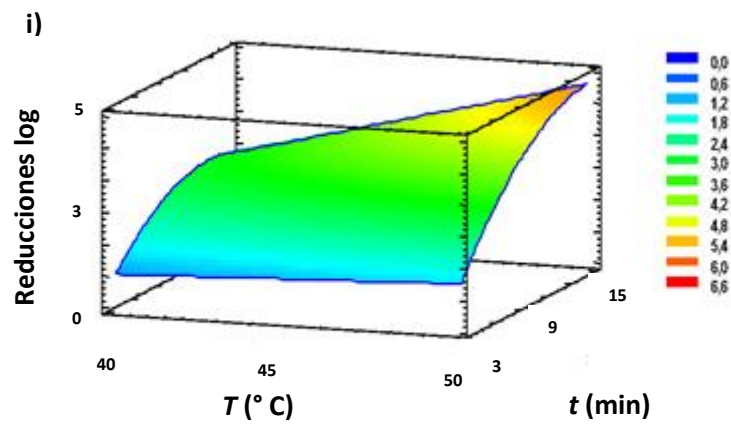


Figura 4.9. Superficies de respuesta ilustrando el efecto de la temperatura (T) y el tiempo de tratamiento UV-C (t) sobre las reducciones logarítmicas logradas ($\text{Log } N/N_0$) para *E. coli* ATCC 35218 (i), *S. cerevisiae* KE 162 (ii), y *P. fluorescens* ATCC 49838 (iii) en jugo mezcla de zanahoria-naranja. La referencia de colores al costado de los gráficos representa las reducciones logarítmicas alcanzadas para cada combinación de temperatura y tiempo.

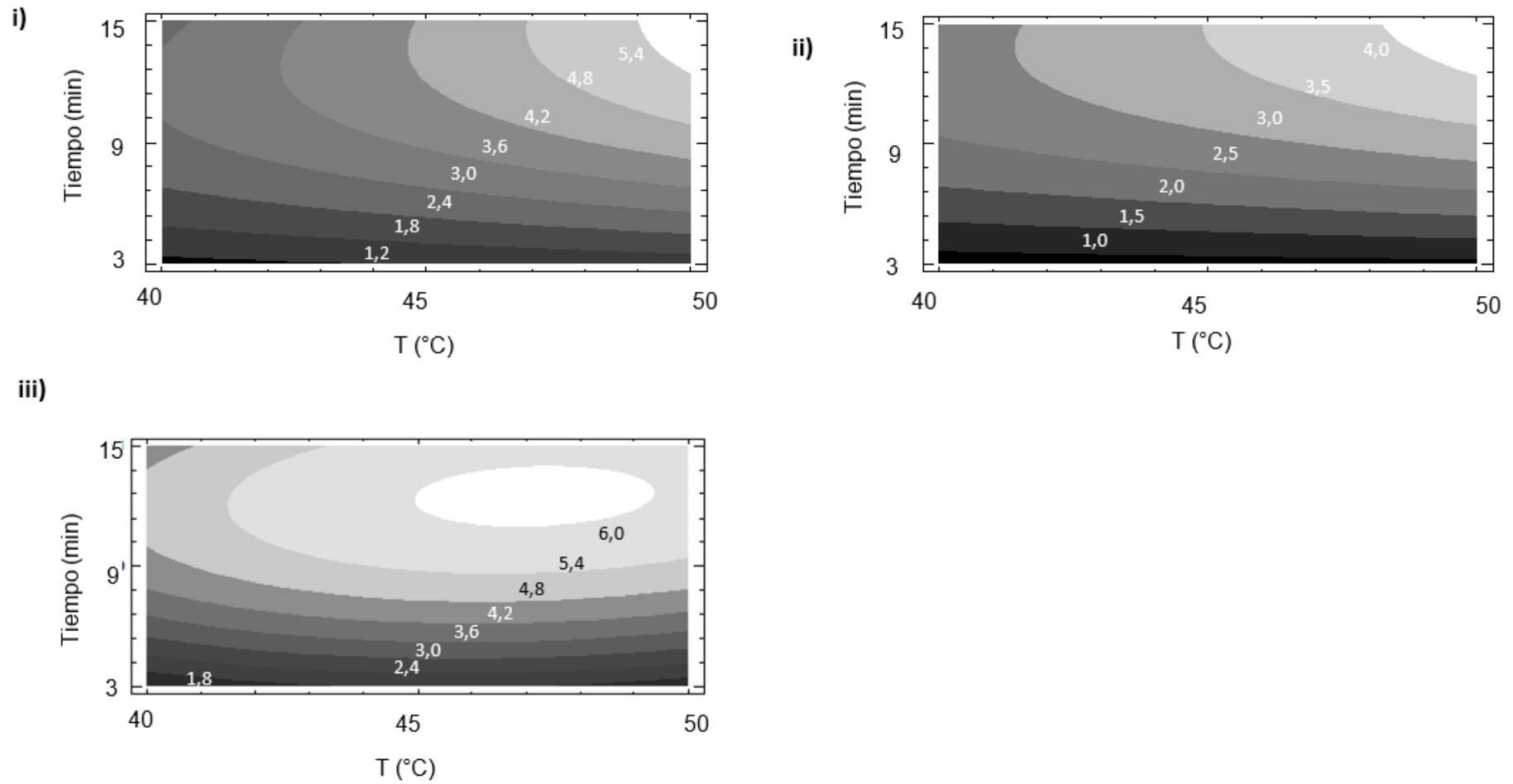


Figura 4.10. Superficies de contorno ilustrando el efecto de la temperatura (T) y el tiempo de tratamiento UV-C (t) sobre las reducciones logarítmicas logradas ($\text{Log } N/N_0$) para *E. coli* ATCC 35218 (i), *S. cerevisiae* KE 162 (ii), y *P. fluorescens* ATCC 49838 (iii) en jugo mezcla de zanahoria-naranja. Los números representan las reducciones logarítmicas alcanzadas para cada combinación de temperatura y tiempo.

4.11. Determinación de la energía eléctrica por orden (E_{EO})

Las energías eléctricas por orden (E_{EO}) calculadas para la descontaminación mediante el uso de la temperatura moderada simple (T:50 °C) de *P. fluorescens* ATCC 49838, *E. coli* ATCC 35218, y *S. cerevisiae* KE 162 fueron de 17,1; 45,5 y 50,0 kW*h/m³/orden, respectivamente (**Fig. 4.9**). Por su parte, las energías eléctricas por orden obtenidas para el procesamiento con T:50 °C simple de coliformes totales, hongos y levaduras, y mesófilos aerobios fueron de 3,7; 48,0 y 62,5 kW*h/m³/orden, respectivamente (**Fig. 4.11**). Los valores de E_{EO} más bajos para el tratamiento con temperatura simple fueron obtenidos para *P. fluorescens* y coliformes totales, demostrando que este tratamiento resultó más eficiente en inactivar estas poblaciones microbianas.

Por otro lado, las energías eléctricas por orden calculadas para el procesamiento con UV-C simple fueron considerablemente menores a las obtenidas para la aplicación de T:50 °C simple para todas las cepas y poblaciones bajo estudio, obteniéndose valores de E_{EO} en el rango de los 0,2-0,5 kW*h/m³/orden (**Fig. 4.11**). Estos menores valores de E_{EO} podrían explicarse por la menor energía eléctrica consumida por las lámparas UV-C (0,03 kW) en comparación a la energía usada por la fuente de calor moderado (2,50 kW).

A pesar del hecho de que el tratamiento asistido UV-C/T implica la aplicación simultánea de luz UV-C y temperatura moderada, se alcanzaron valores de E_{EO} considerablemente menores a los obtenidos mediante la aplicación de T:50 °C simple (3,3-7,3 kW*h/m³/orden). Estos bajos valores logrados para los tratamientos asistidos UV-C/T evidencian la alta efectividad de este tipo de procesamiento para la descontaminación microbiana.

Existe poca información disponible respecto de la estimación de la E_{EO} para reducir la carga microbiana en jugos u otras matrices alimentarias procesadas mediante luz UV-C, lo cual dificulta poder establecer comparaciones. En un estudio previo, Ferrario y Guerrero (2016) analizaron la eficacia en la descontaminación mediante el procesamiento con luz pulsada en un equipo de flujo continuo (17,5 mJ/mL; T < 25 °C; tasa de flujo: 155 mL/min) de jugos de manzana comerciales (pH=3,5; 11,1 °Brix) y frescos (pH=3,5; 12,6 °Brix) inoculados con *Escherichia coli* ATCC 35218, *Salmonella* Enteritidis MA44 y *Saccharomyces cerevisiae* KE 162. Los valores de E_{EO} obtenidos en ese estudio resultaron mayores a los presentados en esta tesis, estando en el rango de los 1,8*10³-4,1*10³ kW*h/m³/orden, evidenciando que el tratamiento UV-C/T resultó más energéticamente eficiente que la luz pulsada para reducir la carga microbiana en las condiciones evaluadas.

Por otro lado, se registraron valores de energía eléctrica por orden en el rango de los 0,006-0,464 kW*h/m³/orden para el tratamiento de *Escherichia coli* K12 en suspensión acuosa sometida a distintas fuentes de luz UV-C (Beck y col., 2017). Esos valores de E_{EO} son similares a los reportados en esta tesis para el procesamiento con luz UV-C simple.

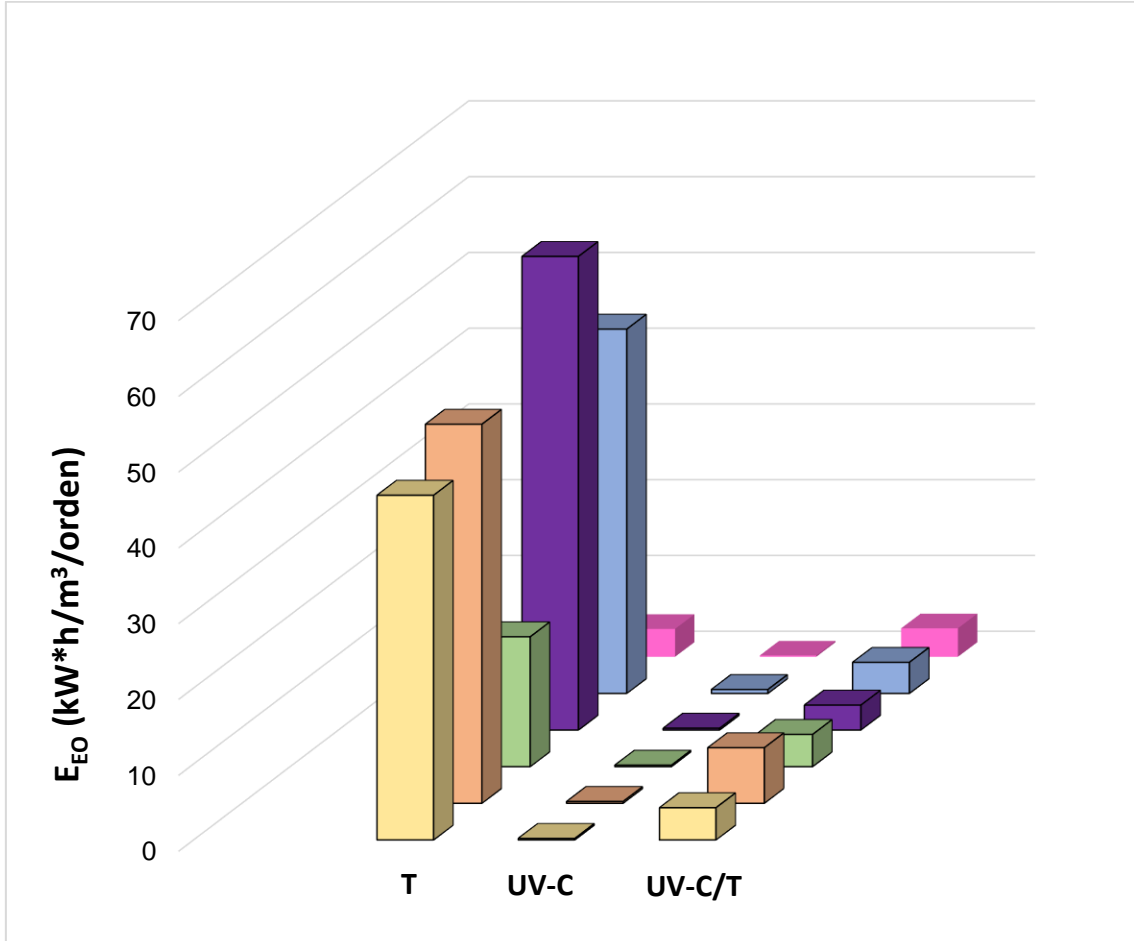


Figura 4.11. Energía eléctrica por orden (kW*h/m³/orden) calculada para *E. coli* ATCC 35218 (■), *S. cerevisiae* KE 162 (■), *P. fluorescens* ATCC 49838 (■), mesófilos aerobios (■), hongos y levaduras (■), y coliformes totales (■) tras la aplicación de los tratamientos con temperatura moderada simple (T; 50 °C), con luz UV-C simple (UV-C) o luz asistida por temperatura moderada (UV-C/T).

Tercera parte

4.12. Estudio del daño en células de *S. cerevisiae* KE 162 tratadas por luz UV-C asistida por temperatura moderada (UV-C/T)

4.12.1. Estudio del estado fisiológico celular causado por el procesamiento UV-C/T mediante citometría de flujo (CF)

En primer lugar, se obtuvieron las curvas de supervivencia de *S. cerevisiae* KE 162 en agua peptonada (AP) y en un jugo mezcla de zanahoria-naranja procesado con UV-C simple, T:50 °C simple y UV-C/T asistido (**Fig. 4.12**). En general, las curvas de inactivación presentaron un comportamiento bifásico y se caracterizaron por una rápida caída de la población durante los primeros minutos de tratamiento, seguida por la presencia de una cola marcada.

La inactivación de *S. cerevisiae* KE 162 en AP tratada con UV-C simple mostró la mayor caída inicial lográndose 2,5 reducciones logarítmicas tras 1 minuto de tratamiento, mientras que una caída menos marcada fue detectada en el jugo mezcla (0,3 reducciones logarítmicas). Una mayor efectividad del tratamiento UV-C simple fue obtenida en AP en comparación con el jugo mezcla ($p < 0,05$), lo cual podría vincularse al hecho de que presenta mejores propiedades ópticas en términos del uso de tecnologías basadas en la aplicación de luz (menores valores para el coeficiente de absorción, turbidez y tamaño de partícula). La curva de inactivación de *S. cerevisiae* en el jugo mezcla de zanahoria-naranja tratado con temperatura moderada simple (T:50 °C) presentó un patrón similar: una concavidad hacia arriba con una caída marcada en la población (2,2 reducciones logarítmicas) durante los primeros 5 minutos de tratamiento seguidos por una cola marcada (**Fig. 4.12**). La ocurrencia de esta cola, como ya se ha explicado, podría deberse a la presencia de miembros más resistentes en la población microbiana y/o a la presencia de sólidos suspendidos otorgando a la matriz una alta absorción UV (Rowan y col., 2015).

Los tratamientos T:50 °C y UV-C simples produjeron una inactivación moderada de 2,6 y 3,3 reducciones logarítmicas, respectivamente. Además, ambas curvas de inactivación presentaron una cola marcada. En contraste, la curva de inactivación correspondiente al tratamiento UV-C/T asistido careció de cola. Adicionalmente, el tratamiento UV-C/T causó una disminución significativamente mayor en la población de *S. cerevisiae* KE 162 de 4,7 ciclos logarítmicas tras 15 minutos de procesamiento ($p < 0,05$) en comparación a los tratamientos simples.

Por otra parte, la rápida caída detectada en los recuentos de *S. cerevisiae* KE 162 en AP tratada con UV-C simple se condice con el rápido incremento en el porcentaje de células que tomaron PI tras 2 minutos de tratamiento (**Fig. 4.12**). A su vez, el incremento en el

porcentaje de células teñidas con PI fue mucho más lento para las células inoculadas en el jugo mezcla de zanahoria-naranja sometidas a los tratamientos simples (UV-C; T:50 °C), detectándose bajos niveles de células marcadas (10,15-39,15 %) con PI al cabo de 15 minutos de procesamiento (**Fig. 4.12**). La mayor transmitividad de la luz UV-C en un medio claro como el AP permite alcanzar una mayor inactivación microbiana en comparación con un medio turbio como el jugo de zanahoria-naranja. Mientras tanto, las células de *S. cerevisiae* inoculadas en jugo sometidas a UV-C/T alcanzaron niveles de marcación con PI (93,05 %) similares a los registrados para las células tratadas con UV-C simple en AP (99,00 %) a los 15 minutos de procesamiento, si bien el incremento en la marcación fue más lento durante los primeros 5 minutos de tratamiento (**Fig. 4.12**). Esto indicaría la mayor efectividad en la inactivación del tratamiento con UV-C/T en comparación a los tratamientos simples (UV-C, T:50 °C) en jugo mezcla de zanahoria-naranja.

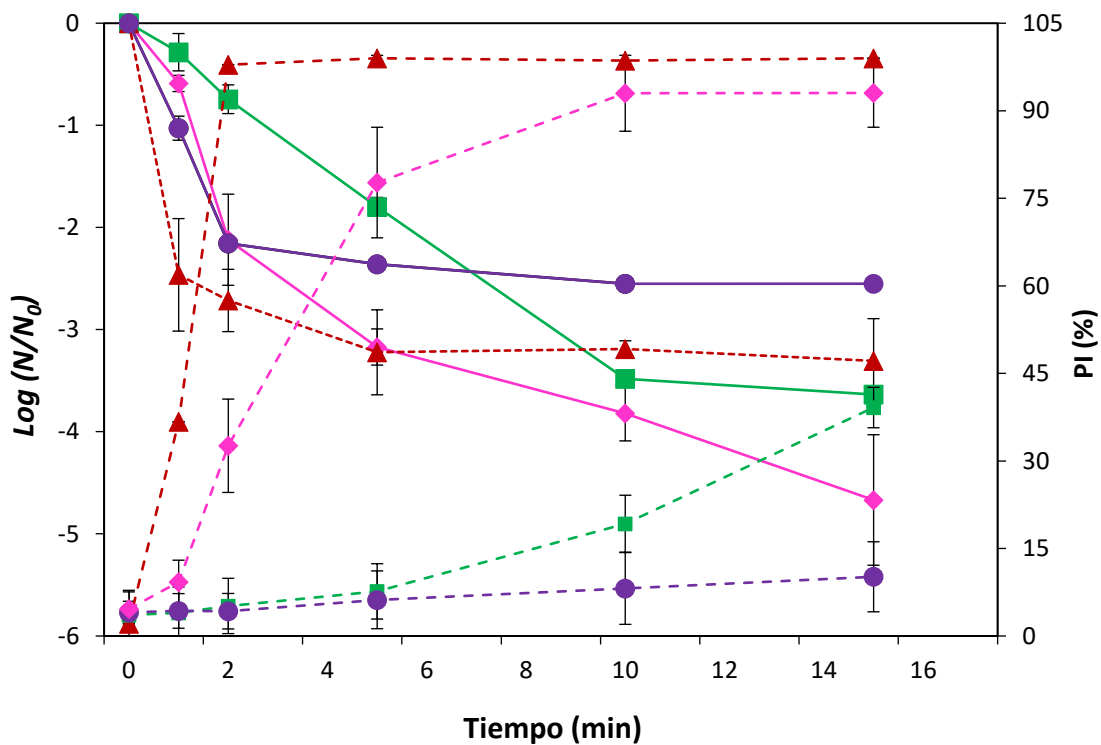


Figura 4.12. Curvas de inactivación de *S. cerevisiae* KE 162 en agua peptonada (---; ▲) y en jugo de zanahoria-naranja (—) procesado con UV-C simple (■), T:50 °C (●), y UV-C/T a 50 °C (◆) (0,0-2032,0 mJ/cm²) determinada por recuento en placa, junto a la cinética del aumento en la población microbiana marcada con PI (células en el cuadrante IV, - - -) sometida a UV-C (■), T:50 °C (●), y UV-C/T a 50 °C (◆) en jugo de zanahoria-naranja o por UV-C simple en agua peptonada (▲). Desvío estándar (I).

Por un lado, se obtuvieron los gráficos de puntos correspondientes a las células de *S. cerevisiae* KE 162 control y a las sometidas a los tratamientos UV-C simple, T:50 °C simple y UV-C/T asistido (**Fig. 4.13**). Las células de *S. cerevisiae* no tratadas (**Fig. 4.13, a.1.-d.1**) produjeron un agrupamiento unimodal respecto las señales de SSC y FSC, incluyendo de pequeños a grandes tamaños y granulometrías, pero concentradas en el rango de los valores pequeños e intermedios. La heterogeneidad observada para el tamaño celular a partir de la señal FSC puede atribuirse a la presencia de células que no alcanzaron la fase estacionaria, pero se esperaría que la mayoría de la población presentase la misma edad y forma celular ya que fue cultivada al comienzo de la fase estacionaria. En consecuencia, esta heterogeneidad puede ser principalmente atribuida a la distintas orientaciones adoptadas por las levaduras al atravesar por el rayo láser (Schenk y col., 2011).

El tratamiento simple con T:50 °C no redujo las señales de FSC o SSC (**Fig. 4.13, c.2**), pero se detectó una reducción marcada en ambas señales (17,7 y 23,5 %) para *S. cerevisiae* en el jugo mezcla de zanahoria-naranja procesado por luz UV-C simple (**Fig. 4.13, b.2**) respecto de las células no tratadas. Por otro lado, se observaron reducciones notorias en tamaño celular (28,0 %) y granularidad (45,5 %) para las células en agua peptonada tratadas con UV-C simple (**Fig. 4.13, a.2**) en comparación con las muestras de jugo sometidas al mismo procesamiento. Este hecho sugiere que las partículas de jugo protegieron a las células ante posibles cambios en su granularidad provocados por el procesamiento UV-C, que podrían incluir la coagulación y vacuolización de su contenido interno.

El tratamiento con UV-C/T asistido del jugo mezcla de zanahoria-naranja causó una disminución del tamaño celular (42,1 %) con respecto a los tratamientos UV-C y T:50 °C simples, pero se detectó una reducción similar de la señal SSC (11,1 %) con respecto al procesamiento UV-C simple (**Fig. 4.13, d.1 y d.2**). En base a estos resultados, el tratamiento UV-C/T podría generar desperdicios celulares.

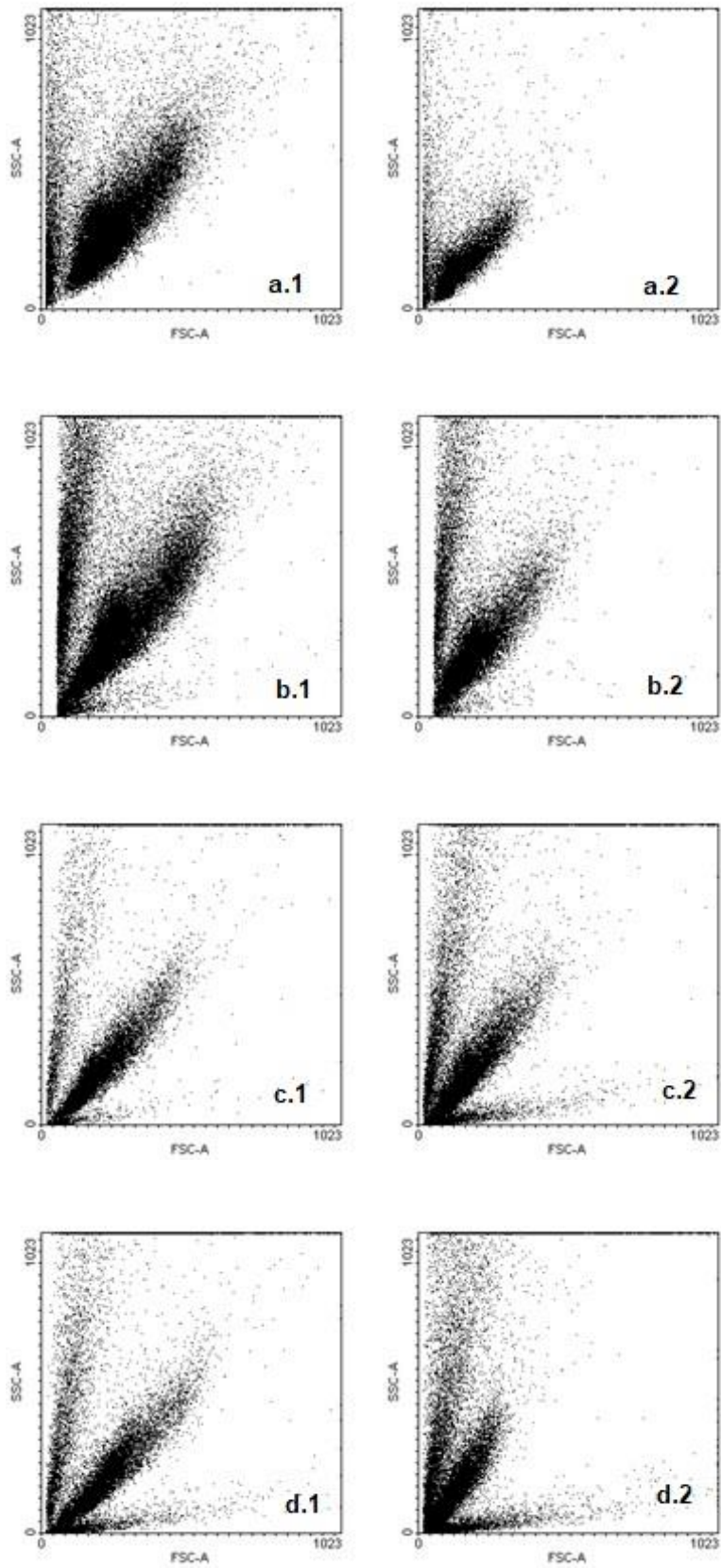


Figura 4.13. Gráficos de puntos ilustrando la dispersión hacia delante de la luz (FSC) versus la dispersión lateral de la luz (SSC) de células de *S. cerevisiae* KE 162 sin tratar o tratadas con luz UV-C. 1) células sin tratar; 2) células tratadas; a) agua peptonada (AP/UV-C), pH=3,8; b) jugo (J/UV-C)

tratado con UV-C simple; c) jugo tratado con temperatura moderada simple (J/T:50 °C); d) jugo tratado con UV-C asistido a 50 °C (J/ UV-C/T).

La **Fig. 4.14** muestra los gráficos de densidad bi-paramétrica de la fluorescencia verde (eje Y) y de la roja (eje X). Estos gráficos representan la capacidad de las células de *S. cerevisiae* en agua peptonada (AP) y en el jugo de zanahoria-naranja para acumular y retener FDA como indicador de la integridad de membrana y actividad enzimática, junto a la capacidad de incorporar PI como marcador del daño de membrana tras la exposición a los tratamientos con luz UV-C simple y UV-C/T asistida. Los porcentajes de las células presentes en cada cuadrante pueden verse sobre los bordes de cada gráfico.

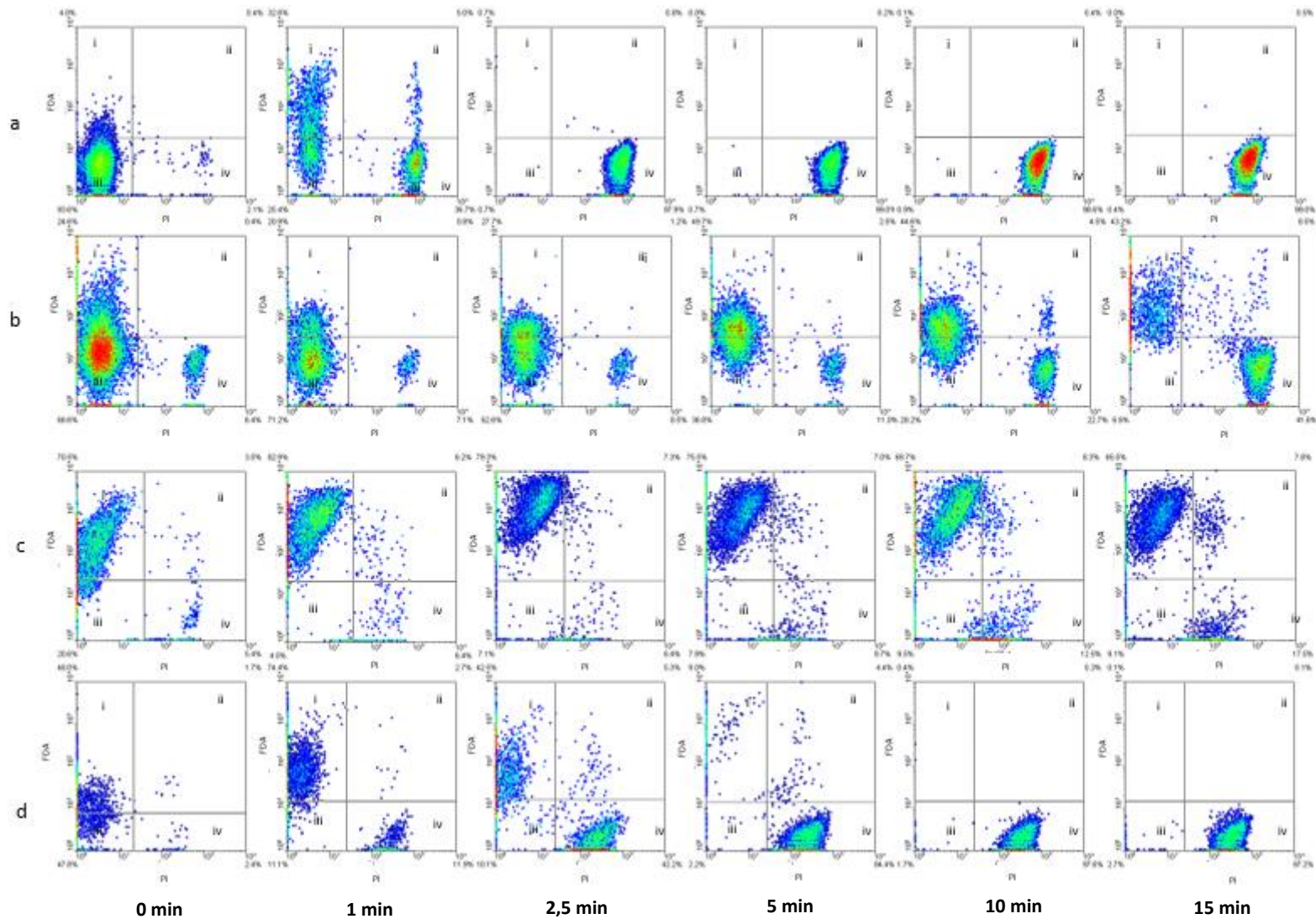


Figura 4.14. Gráficos de densidad de fluorescencia de *S. cerevisiae* KE 162 tras la exposición a los distintos tratamientos (0-15 min; 0,0-2032,0 mJ/cm²). **(a)** UV-C simple en AP; **(b)** UV-C simple en jugo de zanahoria-naranja; **(c)** T:50 °C simple en jugo mezcla; **(d)** UV-C/T en jugo mezcla. Los porcentajes de las poblaciones microbianas en cada cuadrante se muestran en las esquinas del gráfico.

Las células de *S. cerevisiae* sin tratar en AP (**Fig. 4.14.a; 0 min**) o en el jugo mezcla (**Fig. 4.14.b,e,d; 0 min**) teñidas con FDA mostraron un patrón similar en sus propiedades de marcación. Como era esperado, no todas las células exhibieron fluorescencia verde por lo que aparecieron en el Cuadrante I. Algunos autores han señalado que los derivados de fluoresceína son expulsados activamente de células cultivadas en medio con lactosa (Breeuwer y col., 1996; Konings y col., 1997). Por lo tanto, la falta de fluorescencia verde reportada aquí podría atribuirse a una posible extrusión mediada por un sistema de transporte mediado por ATP. Este posible eflujo del fluorocromo podría considerarse como un indicador extra de la vitalidad celular (Bunthof y col., 2001). Es importante señalar que las células correspondientes a los tratamientos con temperatura moderada simple (**Fig. 4.14.c; 0 min**) y UV-C/T asistido (**Fig. 4.14.d; 0 min**) presentaron un mayor porcentaje de fluorescencia verde (48,0-70,5 %) que las células tratadas con UV-C simple en AP (**Fig. 4.14.a; 0 min**) y el jugo (**Fig. 4.14.b; 0 min**) (4,0-24,6 %). Esta conducta podría deberse al procedimiento de inoculación usado en los sistemas controlados termostáticamente a 50 °C. El tiempo necesario para obtener un adecuado mezclado del sistema una vez que se sumó el inóculo con lámparas apagadas fue de 2 minutos, lo que podría haber promovido la adquisición de FDA.

Un incremento en la exposición de las células de *S. cerevisiae* a los tratamientos UV-C, T:50 °C y UV-C/T (**Fig. 4.14.a,e,d; 1-15 min**) en el AP y en el jugo generó un desplazamiento gradual de las mismas del Cuadrante I (células con actividad esterasa y membrana intacta) al Cuadrante IV (células con membrana permeabilizadas). Además, los tratamientos dañaron la integridad de membrana lo que permitió al PI ingresar a las células y luego acumularse, uniéndose al ADN y provocando un aumento de la fluorescencia roja. Sin embargo, el pasaje al cuadrante correspondiente a células muertas (Cuadrante IV) fue más pronunciado para el tratamiento de *S. cerevisiae* mediante UV-C en AP y para el UV-C/T en el jugo mezcla detectando un 97,2-99,0 % de células marcadas con PI al término del procesamiento (15 min). Una fracción más reducida de células teñidas con PI fue observada para los tratamientos UV-C (41,6 %) y T:50 °C (17,5 %) en el jugo mezcla.

El comportamiento detectado en los gráficos de densidad se correlacionó con la curva de inactivación determinada mediante el método de recuento en placa (**Fig. 4.12**). Los recuentos tras 2,5 minutos de tratamiento UV-C en AP disminuyeron 2,7 ciclos logarítmicos, lo cual concordaba con el declive marcado en la subpoblación exhibiendo fluorescencia verde (**Fig. 4.14.a, Cuadrante I**). En ese tiempo de tratamiento, se pudo distinguir una gran subpoblación de células muertas (97,9 %; Cuadrante IV). En contraste, el mismo tiempo de procesamiento UV-C en el jugo mezcla sólo causó 0,7 reducciones logarítmicas, permaneciendo activa una subpoblación resistente. Este hecho se evidenció

en la menor proporción de células dañadas identificada en el Cuadrante IV (8,5 %) para el jugo mezcla en comparación con el mismo tratamiento en AP (**Fig. 4.14.a y b; 2,5 min**). De hecho, se detectó un valor máximo de sólo 41,6 % de células muertas en el jugo tras 15 minutos comparado con AP (99,0 %). Las diferencias detectadas para ambas matrices podrían ser atribuidas a la menor absorbancia y turbidez de la AP, lo cual incrementó la efectividad de la inactivación.

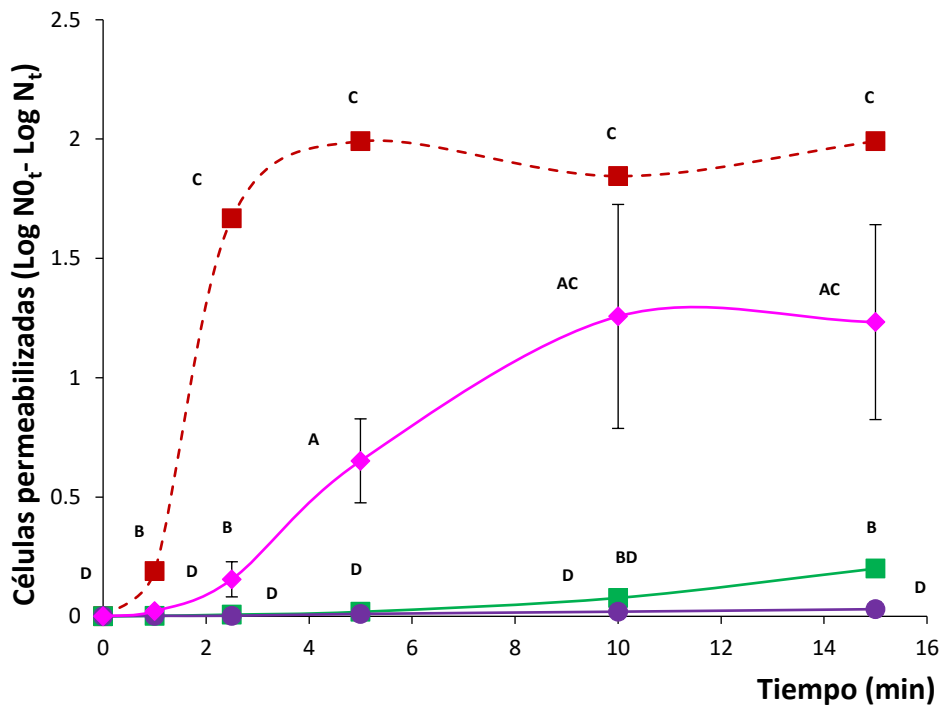
Tras 15 minutos de tratamiento con luz UV-C simple en el jugo mezcla, se observó una fracción importante de células FDA+ PI+ (Cuadrante II; 8,5 %). Mientras que pasado sólo 1 minuto de exposición UV-C simple en AP, se distinguió un 5 % de células doblemente marcadas. El tratamiento T:50 °C simple en el jugo mezcla también produjo células doblemente teñidas (2,3-8,3 %). La presencia de estas células podría deberse a que los tratamientos afectaron su integridad de membrana, pero retuvieron la actividad esterasa hidrolizando el fluorocromo FDA. Esta población subletal podría influenciar seriamente la vida útil del jugo (Zhao y col., 2011) dado que las células son metabólicamente activas, pero no pueden detectarse por métodos de cultivo tradicionales (Ueckert y col., 1995). La presencia de “células viables, pero no cultivables” también fue reportada por Schenk y col. (2011), quienes estudiaron el estado fisiológico de células de *Listeria innocua* ATCC 33090 tratadas con UV-C (0,0-500,0 mJ/cm²) en AP (0,1 %; 10 mL) por citometría de flujo con tinción doble con FDA y PI. Estos autores observaron células doblemente teñidas entre los 1 a 8 minutos de exposición a luz UV-C.

Asimismo, se reporta un incremento en el número de células permeabilizadas (teñidas con PI) según el tiempo de tratamiento en AP o jugo mezcla tratado con UV-C simple, T:50 °C simple, o UV-C/T asistido (**Fig. 4.15.a**). Además, se presenta el porcentaje de actividad esterasa residual según el tiempo de tratamiento con UV-C, T:50 °C y UV-C/T (**Fig. 4.15.b**). El número de células permeabilizadas en el AP tratadas con UV-C simple que tomaron PI aumentó hasta los 5 minutos y luego permaneció casi constante (1,99 ciclos logarítmicos) durante el resto del procesamiento (15 min; 2032,0 mJ/ cm²). Mientras, la actividad esterasa residual decayó hasta los 2,5 minutos de tratamiento UV-C simple, llegando a niveles no detectables.

En oposición, las células de *S. cerevisiae* inoculadas en el jugo mezcla tratadas con UV-C simple mostraron una escasa permeabilización de membrana (0,20 ciclos logarítmicos) a todos los tiempos de exposición comparadas con las del sistema en AP. Un patrón semejante fue detectado para las células tratadas con T:50 °C simple (0,06 ciclos logarítmicos), mientras que para las tratadas con UV-C/T se detectó un aumento progresivo en el número de células permeabilizadas alcanzando 1,59 ciclos logarítmicos de la mano de

niveles despreciables de actividad esterasa a los 10 minutos de exposición. La diferencia en los niveles de permeabilización de membrana observados entre el AP y el jugo mezcla sometidos al mismo tratamiento UV-C, puede relacionarse al hecho de que el jugo presenta compuestos coloreados y partículas en suspensión, responsables de un efecto de sombreado que reduciría la eficiencia de la luz UV-C.

El rápido incremento del número de células permeabilizadas y la caída en la actividad esterasa durante los primeros 5 minutos de exposición a UV-C/T (**Fig. 4.15.a y 4.15.b**) están en concordancia con la alta tasa de inactivación detectada mediante el recuento en placa (**Fig. 4.12**). Es importante señalar que solamente se detectaron 1,6 ciclos logarítmicos de células permeabilizadas, mientras que se observaron 4,7 reducciones logarítmicas mediante el recuento en placa de las muestras. Este hecho sugiere que existen otros mecanismos, además de la permeabilización de membranas, que jugarían un rol importante en la inactivación de las levaduras, generando tanto su muerte como daño subletal.



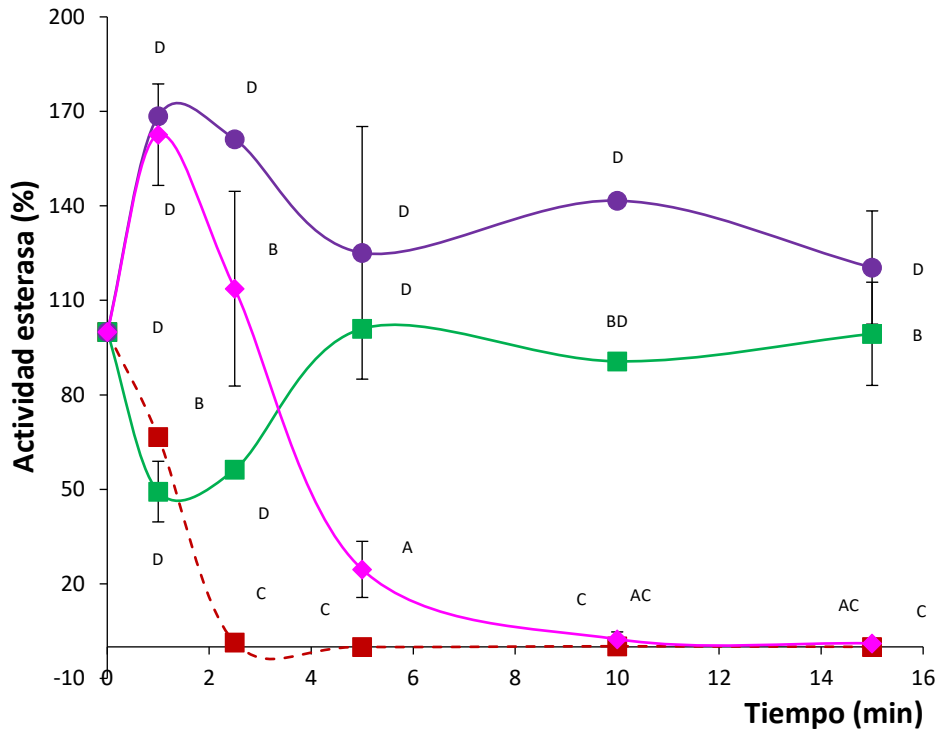


Figura 4.15. a) Células de *S. cerevisiae* permeabilizadas determinadas según la incorporación de PI ($\text{Log } N_{0t} - \text{Log } N_t$) en función del tiempo de tratamiento. b) Cambios relativos en la actividad esterasa, % AE según el tiempo de tratamiento (min). Tratamiento UV-C simple en AP (---; ■) o en jugo mezcla (—, ■); tratamiento con T:50 °C simple (—, ●) y tratamiento UV-C/T a 50 °C (—, ◆) (0,0-2032,0 mJ/cm²) en jugo de zanahoria-naranja. Las letras en mayúscula representan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las medias multivariadas según la prueba de Hotelling basada en la corrección de Bonferroni. Desvío estándar (I).

4.12.2. Estudio del daño microbiano por microscopía electrónica de transmisión (MET)

A continuación, se presentan imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (MET) de células de *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 no tratadas (control) o tratadas con UV-C simple, T:50 °C simple, y con UV-C/T asistido en agua peptonada (AP) o en jugo mezcla de zanahoria-naranja tras 15 minutos de procesamiento (**Fig. 4.16**). Las células de *S. cerevisiae* control presentaron la forma elipsoidal típica (**Fig. 4.16.a,e,c**). Las estructuras celulares se vieron intactas tanto en AP como en el jugo mezcla de zanahoria-naranja, exhibiendo alta densidad electrónica, paredes celulares sin discontinuidades y organelas no dañadas como mitocondrias (M), vacuolas (V), vacuolas de gemación (BV), núcleo celular (N), lisosomas, retículo endoplásmico (ER), gránulos de reserva (SG) y gemas (flechas blancas).

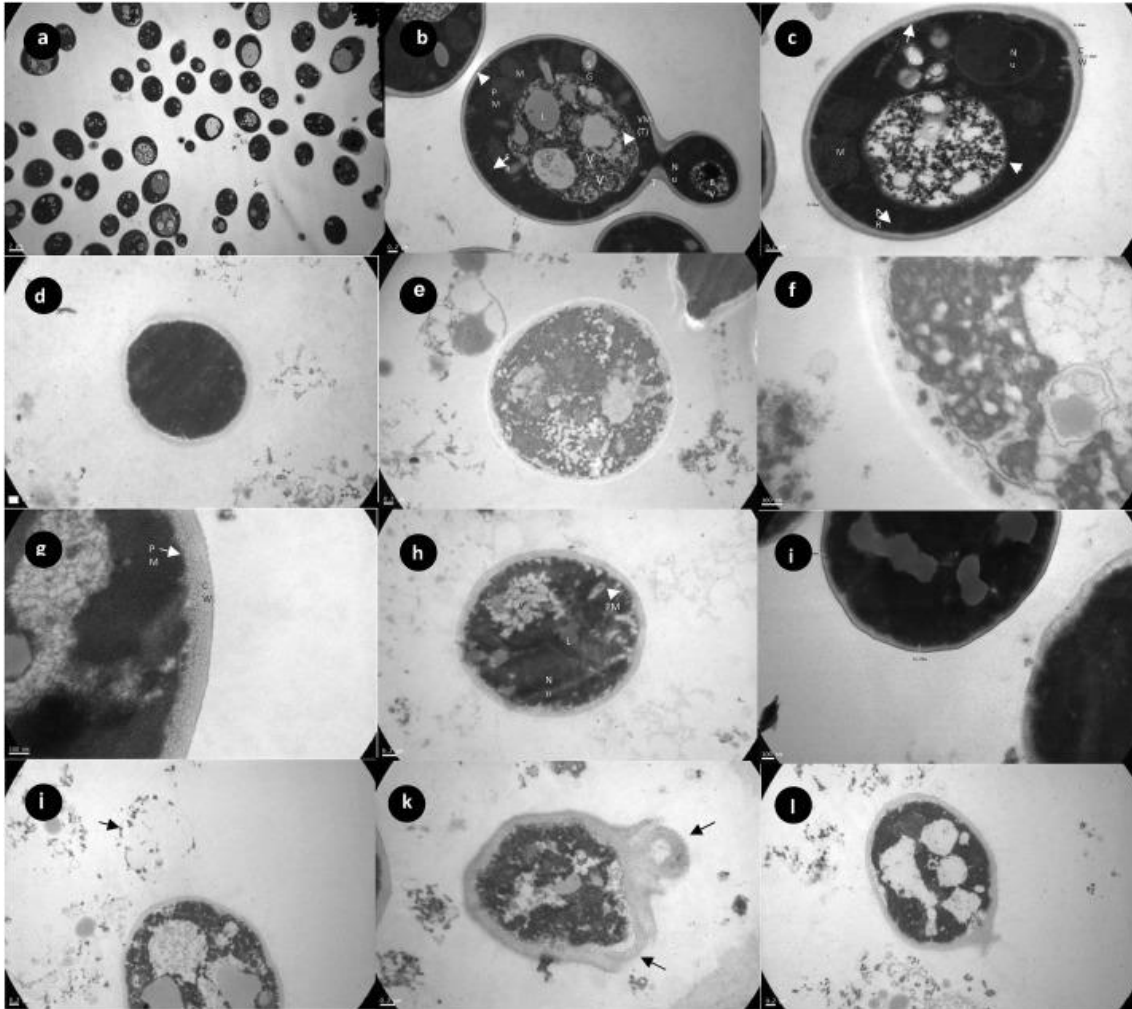


Figura 4.16. Imágenes de MET correspondientes a *S. cerevisiae*. a, b, c: células sin tratar; d, e, f: células expuestas a T: 50 °C (15 min); g, h, i: células tratadas con UV-C (15 min); j, k, l: células tratadas con UV-C/T (50 °C, 15 min); a) Grupo de células intactas con aspecto similar; b) Célula madre e hija intactas, mostrando organelas y membranas definidas; c) Célula intacta con organelas y membranas definidas; d, e) Célula redondeada con estructura interna afectada pero sin rotura de pared celular y membrana plasmática; f) Detalle de célula con membrana plasmática dañada y contenido interno indistinguible; g) Detalle de célula con estructura interna desordenada; h, i) Célula deformada con estructura interna desordenada; j) Célula con lumen desorganizado y residuos de contenido interno sin membrana plasmática ni pared celular visible (“célula fantasma”) (flecha); k) Pared celular rota con plasmalema y contenido interno dispersándose de la célula (flecha); l) Contenido interno vacuolado y desorganizado. Medios: a, i: AP (pH=3,8); b, c, d, e, f, g, h, j, k, l: jugo de zanahoria-naranja. Escala usada: b, c, d, h, j, k, l: 0,2 μm ; a: 2 μm ; f, g, i: 100 nm. Mitocondria (M), vacuola (V), núcleo (N), lisosoma (L); gránulo de reserva (SG); pared celular (CW), membrana plasmática (PL), vacuola de gemación (BV), membrana vacuolar (VM), retículo endoplásmico (ER).

Transcurridos 15 minutos de tratamiento con T:50 °C simple, las células de *S. cerevisiae* KE 162 presentaron una forma más redondeada no natural (**Fig. 4.16.d,e**), con

citoplasmas menos diferenciados (**Fig. 4.16.e,f**). Si bien su pared celular se veía intacta, la membrana plasmática mostró alteraciones (**Fig. 4.16.10.e,f**). Del mismo modo, las células de *S. cerevisiae* KE 162 sometidas a 15 minutos de tratamiento UV-C simple, mostraron un citoplasma menos diferenciado (**Fig. 4.16.g,h**) y una forma más redondeada que la de las células control no tratadas (**Fig. 4.16.h**). La pared celular se vio preservada, pero se detectó daño en la membrana (**Fig. 4.16.g,h**). Además, organelas como las mitocondrias, el núcleo y los lisosomas mostraron alteraciones (**Fig. 4.16.h**).

Con relación a las células sometidas al procesamiento UV-C/T asistido, se observaron múltiples cambios en distintos niveles, indicando la mayor severidad de este tratamiento en comparación a los simples. En específico, se vio una discontinuidad de la membrana plasmática con pérdida del contenido celular (**Fig. 4.16.k**) y separación de la membrana plasmática de la pared celular (**Fig. 4.16.k,l; flecha negra**). Adicionalmente, se detectó la disrupción de las organelas y ruptura generalizada de membranas, no logrando distinguir claramente las distintas estructuras celulares (**Fig. 4.16.j,k,l**). Además, muchas células presentaron vacuolas expandidas (**Fig. 4.16.j,l**). También se detectaron restos de células que habían perdido su contenido celular (“células fantasma”, flecha negra) (**Fig. 4.16.j**).

En contraste con estos resultados, Takeshita y col. (2003) evaluaron daños estructurales de *S. cerevisiae* IFO 2347 inoculada en buffer fosfato de potasio (pH=7,0; 0,067 M) tratadas con UV-C (100 V; 3 s; 60,0 mJ/cm²) y no detectaron cambios en la estructura celular en comparación con las células no tratadas. Las diferencias observadas podrían atribuirse al uso de una menor dosis de UV-C.

Por otro lado, Schenk (2010) evaluó por MET el daño celular en *Escherichia coli* ATCC 11229 en agua peptonada sometida a UV-C (8 min; 390,0 mJ/cm²). En acuerdo con los resultados presentados en esta tesis, los autores reportaron cambios estructurales en las células tratadas con UV-C, incluyendo la presencia de una pared celular suavizada con zonas indefinidas y una invaginación leve de la membrana plasmática de las células tratadas al compararlas con el control. A pesar de las diferencias entre las células procariontas y las eucariotas, se observaron alteraciones a nivel de la membrana en ambas cepas microbianas tras el procesamiento con luz UV-C.

Con respecto a aquellos daños estructurales provocados por tratamientos térmicos moderados, Guerrero y col. (2001) reportaron contenido interno coagulado, lumen vacuolizado y disrupción de las membranas de las células de *S. cerevisiae* KE 162 en caldo SAB acidificado a pH=3,0 tras un tratamiento térmico suave (55 °C; 2,5 min). Adicionalmente, detectaron la ruptura de la pared celular.

Se observaron múltiples cambios estructurales en las células de *S. cerevisiae* KE 162 tales como la coagulación y/o disrupción de su contenido interno, así como la distorsión en la forma celular tras la exposición a UV-C simple, T:50 °C simple o UV-C/T asistido, evidenciando la existencia de muchos blancos además de las membranas que podrían haber contribuido a la inactivación microbiana, que no hubieran sido detectados mediante citometría de flujo.

Resulta importante señalar que las observaciones de la microscopía electrónica de transmisión, que revelaron que las células de *S. cerevisiae* KE 162 sometidas a los distintos tratamientos presentaron una forma más redondeada y pérdida parcial de su contenido interno, se correlacionaron con la reducción en tamaño celular y granularidad determinada mediante las señales FSC y SSC de la citometría de flujo (**Fig. 4.16**).

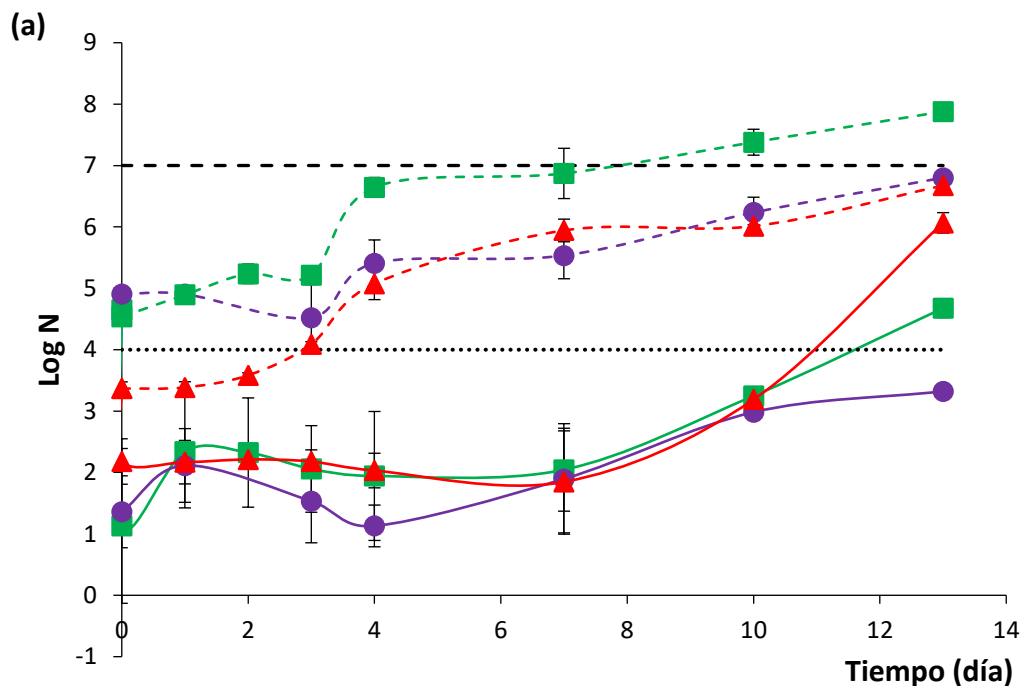
Cuarta parte

4.13. Evaluación de la calidad microbiológica y físico-química del jugo de zanahoria-naranja procesado con luz UV-C asistida por temperatura moderada (UV-C/T) durante el almacenamiento refrigerado

4.13.1. Evolución de la flora nativa

La Fig. 4.18 presenta la evolución de la flora nativa (mesófilos aerobios, hongos y levaduras, coliformes totales) a lo largo del almacenamiento refrigerado (4 °C) para las muestras de jugo mezcla de zanahoria-naranja tratadas con UV-C simple, T:50 °C simple y UV-C/T asistido a 50 °C. En el caso de las muestras no tratadas y las sometidas a los tratamientos simples con UV-C y T:50 °C, se siguió la evolución hasta el día 13 de almacenamiento, punto en el cual las muestras alcanzaron los niveles límites aceptables para las poblaciones de flora nativa analizadas según la Health Protection Agency del Reino Unido (HPA, 2009). Por su parte, se siguió la evolución de la flora nativa de las muestras de jugo procesadas con UV-C/T hasta el día 21 de almacenamiento refrigerado.

Adicionalmente, se presentan las diferencias observadas entre los distintos tratamientos en los niveles de inactivación alcanzados para las poblaciones de mesófilos aerobios, hongos y levaduras, y coliformes totales según la prueba de Tukey (Fig. 4.19). Las interacciones *Tratamiento*nivel* resultaron significativas ($p < 0,001$).



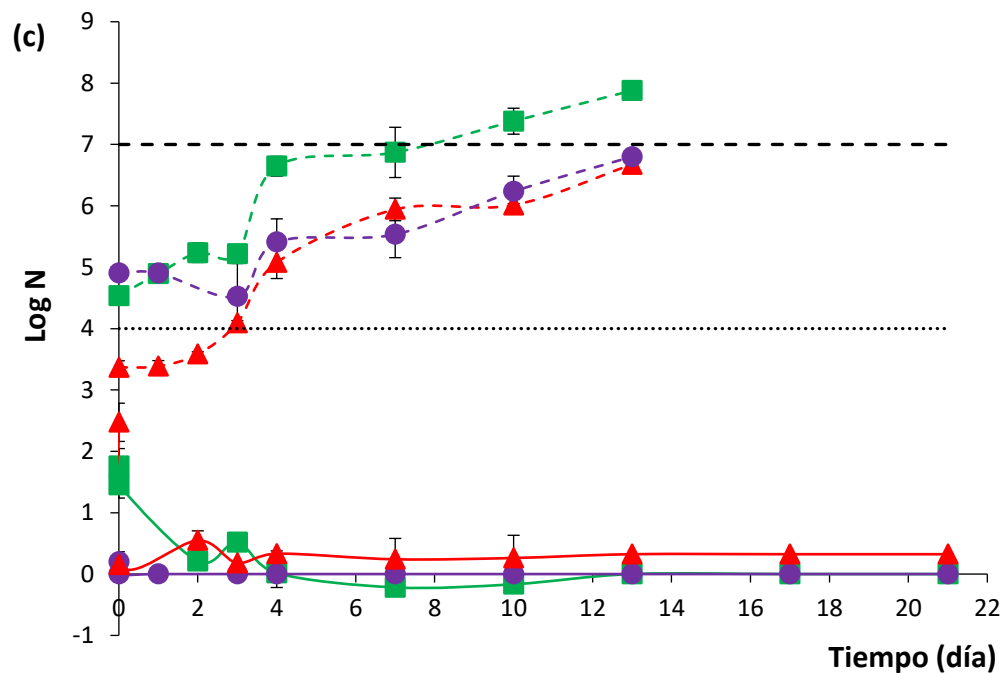
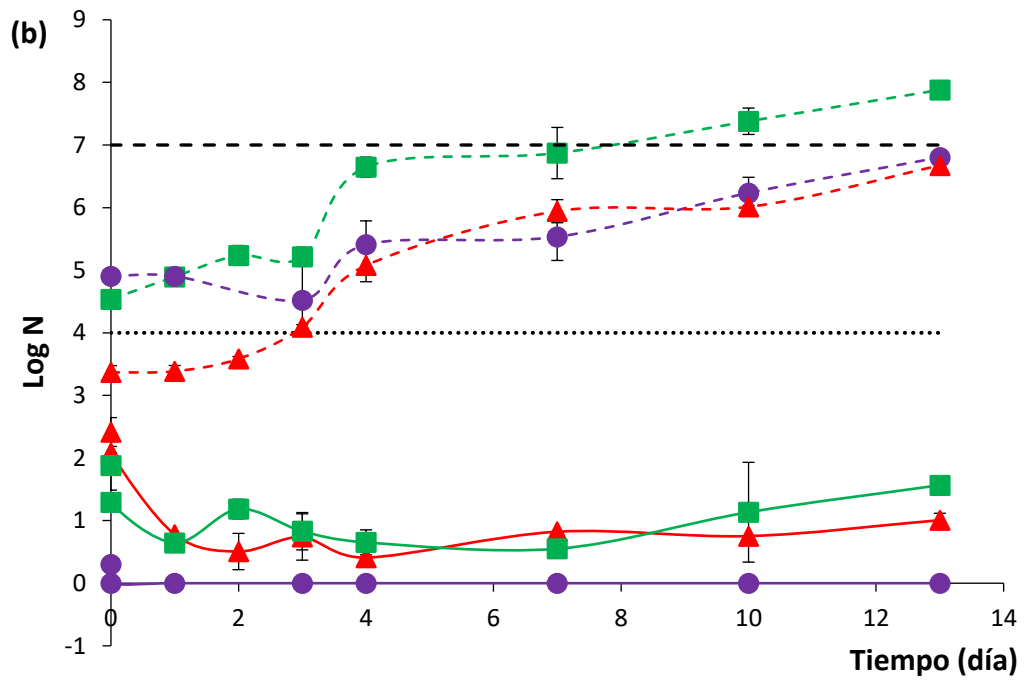


Figura 4.18. Evolução de la flora nativa de los recuentos de mesófilos aeróbios (■), hongos y levaduras (▲), y coliformes totales (●) en el jugo mezcla de zanahoria-naranja durante su almacenamiento (4 ± 1 °C). Muestras: jugo control no tratado (---) y jugo procesado (—) por: **(a)** UV-C simple; **(b)** temperatura moderada simple (T: 50 °C); y **(c)** UV-C/T asistido. Desvío estándar (I). Límite establecido (HPA, 2009) para el crecimiento de mesófilos aeróbios en jugos frutihortícolas (---) y para coliformes totales (...).

En el caso de los mesófilos aerobios en las muestras control sin tratar, se vio un aumento en la población a lo largo de los 13 días de almacenamiento refrigerado. Además, esta población sobrepasó el límite aceptable de 10^7 UFC/mL establecido por la Health Protection Agency del Reino Unido (HPA, 2009) en el 7^{mo} día. En el caso de la población de hongos y levaduras en las muestras no tratadas, se detectó un incremento de 3,44 ciclos logarítmicos durante el almacenamiento, alcanzado un nivel final de 7 ciclos a los 13 días. Para las poblaciones de coliformes totales, las muestras sin tratar superaron el límite aceptable de 10^4 UFC/mL para Enterobacteriaceae en el día inicial (HPA, 2009) y continuaron haciéndolo hasta alcanzar los 7 ciclos logarítmicos al día 13 de almacenamiento refrigerado.

El tratamiento UV-C simple del jugo zanahoria-naranja redujo significativamente la población de mesófilos aerobios inicial (3,5 reducciones logarítmicas); mientras que para hongos y levaduras totales se lograron 1,2 reducciones logarítmicas respecto del recuento inicial. Además, se observó un comportamiento similar en la evolución de estas muestras a lo largo de los 13 días del almacenamiento refrigerado. En el caso de los coliformes totales, la población inicial se redujo en 3,54 ciclos logarítmicos.

Respecto a la evolución de las muestras en el almacenamiento refrigerado, las distintas poblaciones de las muestras control (no tratadas) comenzaron a crecer a partir del 1^{er} o 3^{er} día, alcanzando niveles entre los 6,7-7,9 ciclos logarítmicos a los 13 días. En oposición, el tratamiento UV-C simple previno la recuperación de los mesófilos aerobios, hongos y levaduras, y coliformes totales a lo largo de 7 días de almacenamiento refrigerado. A pesar de que las poblaciones de mesófilos comenzaron a crecer, el límite recomendado de mesófilos aerobios (10^7 UFC/mL) no fue excedido durante 10 días. Adicionalmente, en 13 días de almacenamiento refrigerado, los coliformes totales no superaron el límite de 10^4 UFC/mL establecido para las enterobacterias (HPA, 2009).

Tras el tratamiento T:50 °C simple, los niveles de mesófilos aerobios y de hongos y levaduras en el jugo mezcla fueron de 1,3 y de 2,1 ciclos logarítmicos, respectivamente. El tratamiento térmico a T:50 °C sólo causó una escasa reducción de los niveles iniciales de flora nativa (0,4-0,6 reducciones logarítmicas). Sin embargo, se lograron 0,7-2,0 reducciones logarítmicas de mesófilos aerobios y de hongos y levaduras a lo largo del almacenamiento. Este hecho sugiere que el tratamiento T:50 °C simple generó daño subletal, que podría haber sensibilizado a la flora nativa en el almacenamiento refrigerado posterior. Para los coliformes totales, se lograron 5 reducciones logarítmicas tras el tratamiento simple T:50 °C. Además, no se observó su recuperación durante 13 días de almacenamiento y nunca se excedió el límite recomendado (HPA, 2009).

Respecto del tratamiento UV-C/T asistido a 50 °C, si bien solamente provocó 0,3 reducciones logarítmicas de los niveles iniciales de mesófilos aerobios, se terminaron alcanzando 1,6 reducciones logarítmicas a lo largo del almacenamiento refrigerado. Esto indicaría que la combinación del tratamiento UV-C/T asistido con la refrigeración del almacenamiento tuvo un efecto sinérgico sobre la inactivación de los mesófilos. Más aún, la población de mesófilos permaneció constante a lo largo de 24 días de almacenamiento a 4 °C. Para hongos y levaduras, se consiguieron 2,3 reducciones logarítmicas iniciales, siendo no detectables por 17 días de almacenamiento. En el caso de los coliformes totales, se alcanzaron 5 reducciones logarítmicas tras el tratamiento UV-C/T, sin detectarse su recuperación tras 24 días de almacenamiento a 4 °C. Estos resultados están en concordancia con los estándares establecidos. Por su parte, las muestras procesadas con UV-C/T mostraron menores recuentos de flora nativa que las de los tratamientos simples UV-C y T:50 °C (**Fig. 4.18**).

De acuerdo con los resultados aquí expuestos, Pala y Toklucu (2013) analizaron la inactivación de aerobios totales y de hongos y levaduras en jugo de naranja (pH=4,0; 11,6 °Brix) tras el procesamiento con luz UV-C (0,0-48120,0 mJ/mL). La carga de microbios aerobios totales en el jugo de naranja fue reducida en 1,18 (36,3 %); 2,22 (68,3 %); 2,80 (86,2 %) y 2,96 (91,0 %) ciclos logarítmicos tras la aplicación de luz UV-C correspondiente a dosis de 12030; 24000; 36090 y 48120 mJ/mL, respectivamente. Además, se detectaron 0,08 (3,1 %) a 0,52 (20,2 %) reducciones logarítmicas en las poblaciones iniciales de hongos y levaduras para las mismas dosis UV-C (12030,0-48120,0 mJ/mL). Estos autores señalaron que las bacterias resultaron más sensibles a la luz UV-C que los hongos y levaduras en el jugo de naranja, atribuyendo esas diferencias a la menor proporción de bases de timina presentes en estos últimos, que son el principal blanco de acción de la luz UV-C. A su vez, Chia y col. (2012) observaron que el jugo de ananá (pH=3,9; 13,5 °Brix) irradiado con luz UV (53,42 mJ/cm²) alcanzó una vida útil de hasta 7 semanas por debajo del límite de carga aceptable (6 ciclos logarítmicos) a lo largo de su almacenamiento refrigerado a 4 °C, en oposición a la vida útil de 1 semana para el mismo jugo sin tratar.

Por su lado, Feng y col. (2013) estudiaron la influencia de la luz UV-C (2700,0 mJ/mL) sobre los aerobios totales, coliformes totales y hongos y levaduras en jugo de sandía (pH=5,3; 9,47 °Brix). En el caso de los aerobios, detectaron sólo una reducción logarítmica en el jugo procesado. Sin embargo, para el día 13 de almacenamiento, los aerobios totales en las muestras tratadas estaban por debajo de los 2 ciclos logarítmicos mientras que en las no tratadas habían superado el límite de 6 ciclos logarítmicos. Para los coliformes totales, vieron una reducción inicial de aproximadamente 3 ciclos logarítmicos en muestras tratadas con respecto a los controles. Hasta los 13 días de almacenamiento se observó que

las muestras procesadas se mantenían en los mismos niveles iniciales. En concordancia con los resultados de esta tesis, las muestras tratadas se mantuvieron por debajo de 1 ciclo logarítmico a lo largo de 20 días de almacenamiento refrigerado. Para las poblaciones de hongos y levaduras, el tratamiento UV-C previno la recuperación hasta los 13 días del almacenamiento en el jugo de la sandía.

Respecto a las diferencias en la vida útil detectadas entre los resultados de esta tesis y aquellos expuestos en el trabajo de Chia y col. (2012), las mismas podrían ser atribuidas a la alta eficiencia del procesamiento UV-C dado que el jugo de ananá usado presentaba menor absorbividad UV-C y menor turbidez que el jugo mezcla de zanahoria y naranja usado en esta tesis.

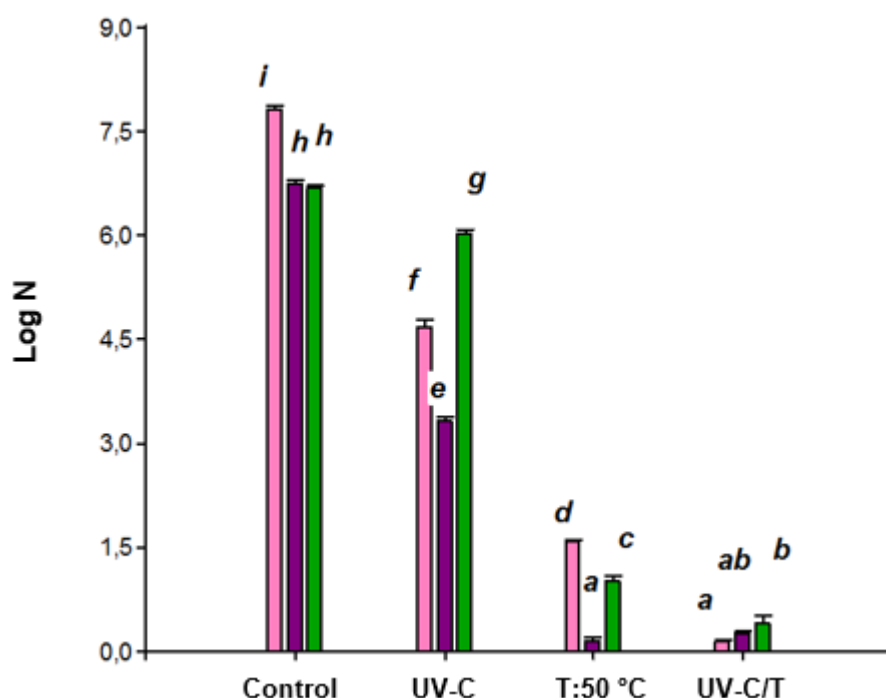


Figura 4.19. Prueba de Tukey para detectar diferencias significativas entre tratamientos en los recuentos logarítmicos de las poblaciones de aerobios mesófilos (■), hongos y levaduras (■), y coliformes totales (■) en jugo mezcla de zanahoria-naranja sin tratar y procesado con UV-C simple, T:50 °C simple, y UV-C/T asistido almacenados a 4 ± 1 °C. Las distintas letras sobre las barras representan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

4.13.2. Evolución del contenido de polifenoles (CPo) y actividad antioxidante (AAT)

Las muestras control (sin tratar) de jugo mezcla de zanahoria-naranja presentaron un contenido de polifenoles (CPo) de $205,0 \pm 55,9$ $\mu\text{g GAE/mL}$ y una actividad antioxidante

total (AAT) de $0,7\pm 0,6$ mg Trolox Eq/mL en el día 0 de almacenamiento refrigerado. Por su parte, las muestras tratadas con UV-C simple presentaron valores mayores (CPo= $306,1\pm 31,0$ $\mu\text{g GAE/mL}$; AAT= $0,7\pm 0,3$ mg Trolox Eq/mL) a los del control sin tratar, al igual que las procesadas con UV-C/T asistido (CPo= $302,1\pm 90,1$ $\mu\text{g GAE/mL}$; AAT= $1,6\pm 1,4$ mg Trolox Eq/mL) en el día 0 de almacenamiento. En consecuencia, los tratamientos generaron un incremento al inicio del almacenamiento del contenido de compuestos bioactivos.

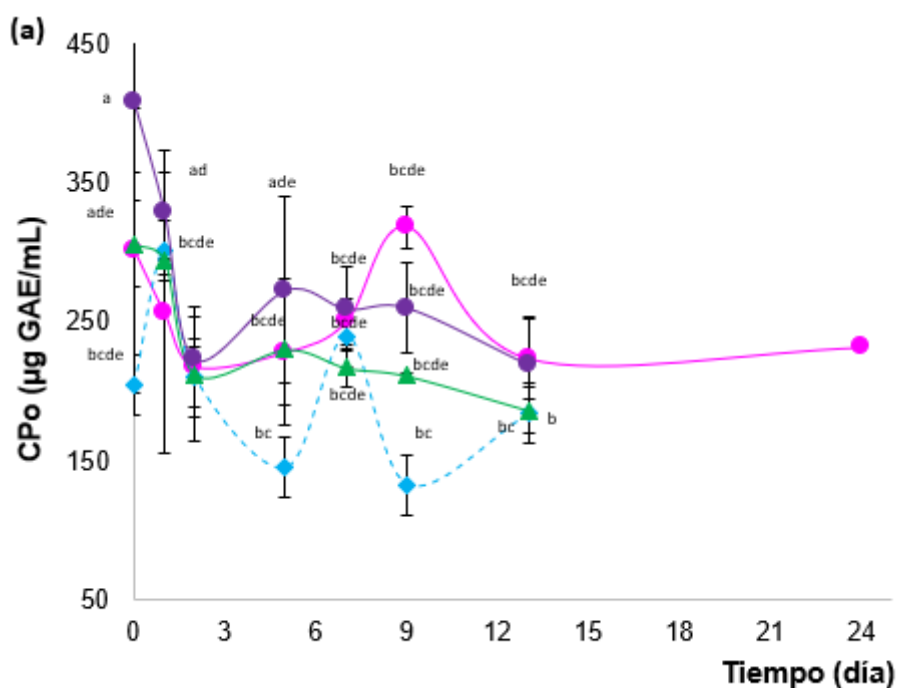
Es importante recalcar que las muestras de jugo no tratadas y las sometidas a los tratamientos simples (UV-C; T:50 °C) fueron estudiadas sólo por 13 días, puesto que para ese momento habían excedido los límites recomendados para las poblaciones de la flora nativa (HPA, 2009). Por su parte, las muestras sometidas al tratamiento asistido con UV-C/T fueron analizadas a lo largo de 24 días de almacenamiento refrigerado. Además, no se detectaron diferencias significativas entre las muestras de jugo control, las procesadas con UV-C y las tratadas con UV-C/T durante el almacenamiento refrigerado ($p < 0,05$) (**Fig. 4.20**).

En relación con el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante de jugos procesados con UV-C, los valores reportados en la literatura son variables según el tipo de jugo, las condiciones de procesamiento UV-C y el método de determinación elegido para detectar este tipo de compuestos bioactivos. Pala y Tokuculu (2011) estudiaron el CPo y la AAT mediante la técnica del radical ABTS (2,20-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) de un jugo de granada (pH=3,3; 16,3 °Brix) sometido a UV-C (0,0-62400,0 mJ/mL). En concordancia con los resultados aquí expuestos, el tratamiento UV-C no afectó el CPo y la AAT de las muestras tratadas en comparación a los controles no tratados. De modo similar, Caminiti y col. (2012) no detectaron cambios significativos en el CPo y la AAT de un jugo de zanahoria-naranja (1:1; pH=3,8; 9 °Brix) tratado con luz UV-C (10600,0 mJ/cm²) en comparación al jugo fresco sin tratar. Además, estos autores reportaron valores de polifenoles totales en un rango similar (498-505 $\mu\text{g GAE/mL}$) al de los aquí presentados (205-306 $\mu\text{g GAE/mL}$) para las muestras del jugo de zanahoria-naranja control y las tratadas con UV-C.

Adicionalmente, Noci y col. (2008) aplicaron UV-C estático por 30 minutos a muestras de jugo de manzana (pH=3,7; 12,8 °Brix) y no vieron alteraciones significativas en la AAT tras la exposición a UV-C, mientras que registraron una disminución significativa en el CPo en comparación con las muestras no tratadas. Por su parte, Bhat y Stamminger (2015) evaluaron el CPo y AAT por los métodos de Folin-Ciocalteu y de DPPH, respectivamente, de un jugo de frutilla (pH=3,2; 4,5 °Brix; 99 NTU) sometido a un tratamiento UV-C estanco (215,8 mJ/cm²; 25°C). Estos autores observaron una caída en el

CPo, mientras que la AAT no resultó afectada para las muestras tratadas en comparación con los controles.

En relación con el uso de temperaturas moderadas, Ferrario y col. (2017) estudiaron el efecto sobre la AAT mediante el método de DPPH en jugo de zanahoria (pH=6,4; 11,3 °Brix) de distintos tratamientos térmicos moderados (56, 58 y 60 °C) a varios tiempos de exposición (2, 4 y 6 min) en combinación con un tratamiento de acidificación (pH=4,5; 5,0 y 5,5). En contraste con el aumento en la AAT detectado tras el procesamiento a T:50 °C individual del jugo mezcla de zanahoria-naranja, ellos detectaron una caída en la misma al aumentar la temperatura. Sin embargo, las temperaturas usadas en ese estudio eran mayores que las evaluadas en esta tesis.



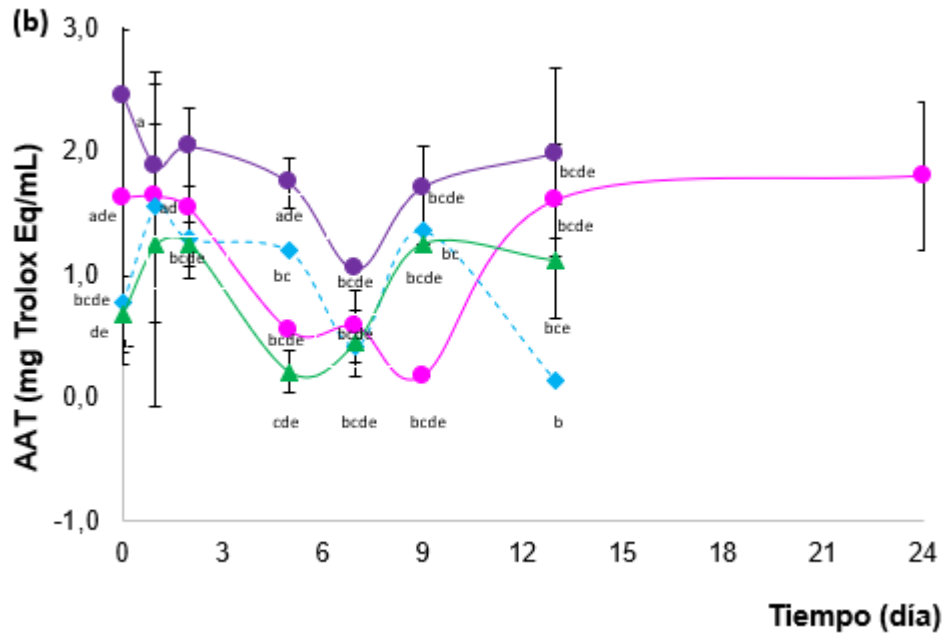


Figura 4.20. (a) Contenido de polifenoles totales (CPo, $\mu\text{g GAE/mL}$); **(b)** Actividad antioxidante total (AAT, mg Trolox Eq/mL) de jugo de zanahoria-naranja sin tratar (---, ◆), procesado con UV-C simple (—, ▲), T:50 °C simple (—, ●) y UV-C/T asistido a 50 °C (—, ●) a lo largo de su almacenamiento (4 °C). Desvío estándar (I).

4.13.3. Evolución del color, pH, °Brix y turbidez

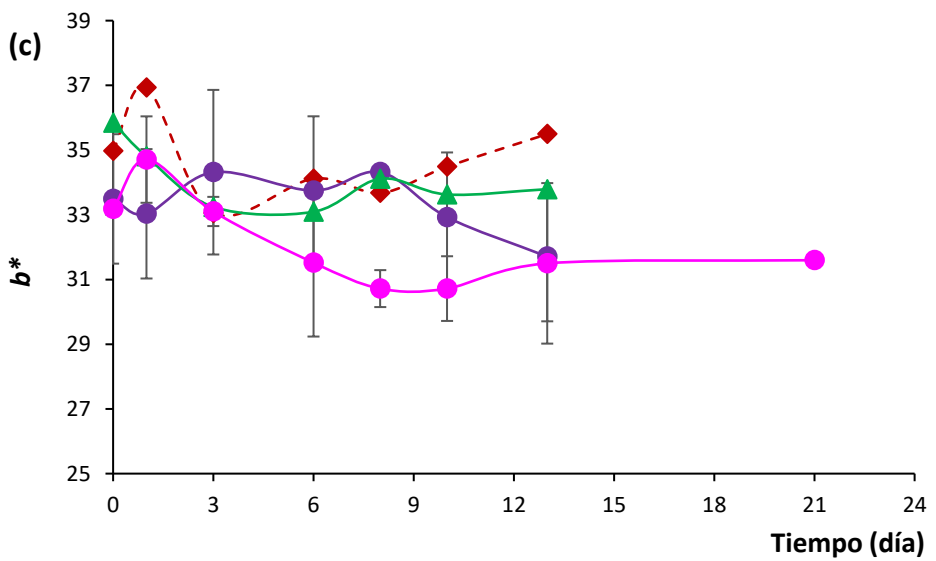
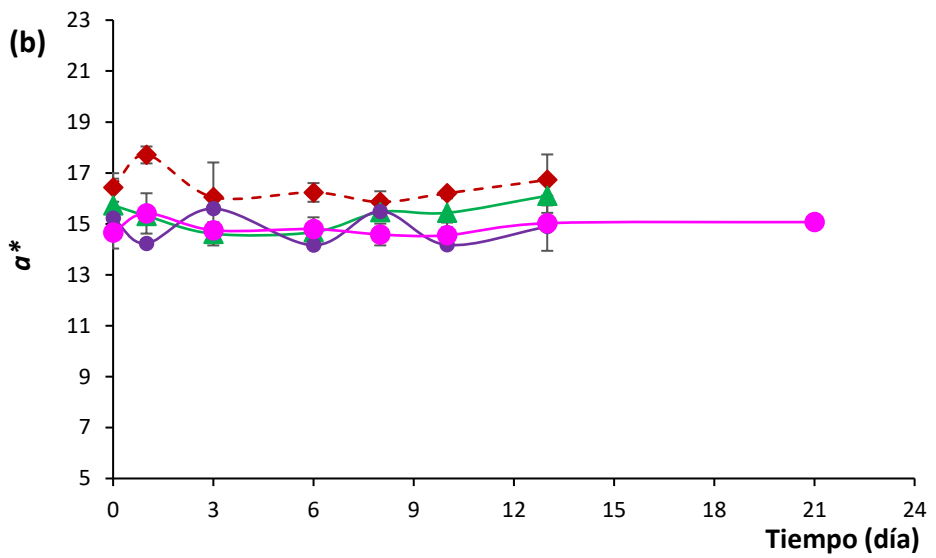
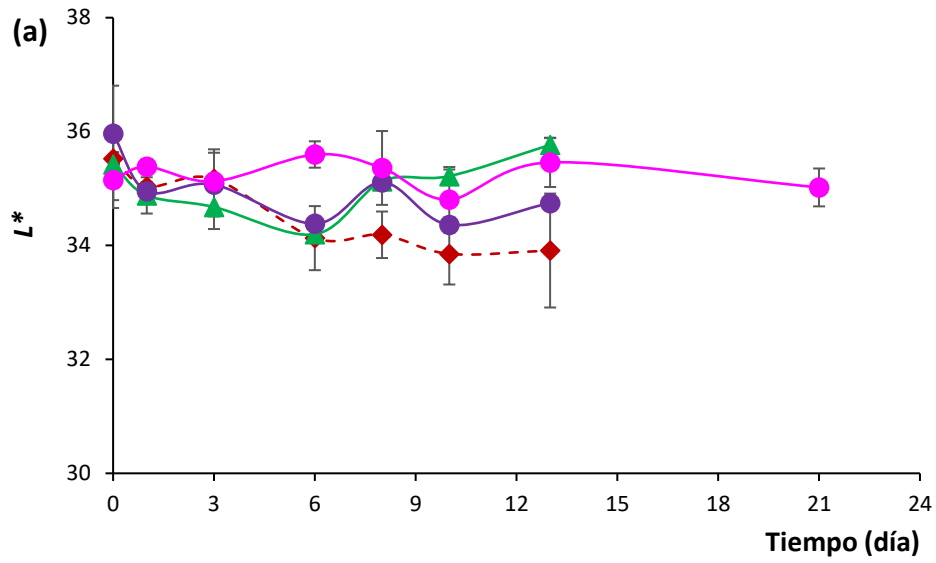
En primer lugar, no se registraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los valores de los parámetros asociados al color (L^* , a^* , y b^*) entre las muestras de jugo de zanahoria-naranja no tratadas y las tratadas con UV-C simple, T:50 °C simple y UV-C/T asistido a lo largo del almacenamiento refrigerado (**Fig. 4.21.a**). En el diagrama de cromaticidad CIE x,y se ilustra la evolución del color de las distintas muestras estudiadas, observándose sólo diferencias muy sutiles (**Fig. 4.21.b**).

Por su parte, no se detectaron cambios significativos en los valores de pH entre las muestras control y las muestras correspondientes a los distintos tratamientos durante el almacenamiento refrigerado (pH=4,15-4,24) (**Tabla 4.9**). Además, no se vieron diferencias en los valores de °Brix y turbidez entre las muestras control (7,8-8,0 °Brix; 2912-3138 NTU), las tratadas con UV-C simple (7,6-8,0 °Brix; 3016-3420 NTU), con T:50 °C simple (7,5-8,0 °Brix; 2540-3394 NTU), y con UV-C/T (7,6-8,2 °Brix; 2762-3356 NTU) desde el comienzo de las determinaciones y durante todo el almacenamiento (**Tabla 4.9**).

Además, se realizó un PCA para evaluar la asociación entre los °Brix, el CPo, la AAT, el pH, la turbidez, las funciones de color (L^* , a^* , b^*) y las muestras de jugo de zanahoria-

naranja no tratadas y las sometidas a los distintos tratamientos: UV-C simple, T:50 °C simple, y UV-C/T (**Fig. 4.22**). El valor del CCC obtenido fue adecuado (0,82), indicando que el análisis logró una buena reducción de la dimensionalidad. Las primeras dos componentes principales (CP1 y CP2) explicaron el 49 % de la variabilidad total. La CP1 separó a^* y b^* , quienes mostraron asociación positiva entre sí, de L^* , pH, °Brix y CPo (negativamente asociados). Por otro lado, la CP2 se asoció positivamente a b^* , CPo y AAT. Este análisis mostró que las muestras control (sin tratar) presentaron los mayores valores de a^* y de b^* , a la par de poseer los menores valores de L^* , pH, °Brix, y CPo. Esto indica que las muestras de jugo no tratadas resultaron más rojo-amarillentas y presentaron menor contenido de polifenoles, menos partículas suspendidas y menos sólidos solubles que las muestras sometidas a los distintos tratamientos a lo largo del almacenamiento. Adicionalmente, no se registraron diferencias significativas entre las muestras tratadas con UV-C simple, las tratadas con T:50 °C simple, y las procesadas con UV-C/T asistido respecto de su CPo, AAT, pH, °Brix, turbidez y funciones de color (L^* , a^* , b^*) durante su almacenamiento refrigerado.

En concordancia con estos resultados, Caminiti y col. (2012) analizaron cambios sobre el pH, los °Brix y el color de un jugo mezcla de zanahoria-naranja (1:1; pH=3,8; 9,0 °Brix) tratada con UV-C (10600,0 mJ/cm²) y no observaron cambios en el pH, °Brix, y los parámetros asociados al color (L^* , a^* y b^*) tras el procesamiento UV-C respecto del jugo sin tratar. Por su parte, Riganakos y col. (2017) no detectaron cambios en los parámetros asociados al color de un jugo de zanahoria (pH=6,3; >11000 NTU) tras su tratamiento UV-C (1200,0 mJ/mL). Por otro lado, Kaya y col. (2015) estudiaron cambios en el pH, °Brix, turbidez y color de un jugo mezcla de limón-melón (pH=3,9) tras su procesamiento UV-C (2500,0 mJ/mL). Estos autores reportaron la ausencia de cambios en los valores de los parámetros de color L^* y a^* tras el tratamiento UV-C, mientras que el valor de b^* se vio significativamente reducido. De manera concordante, un aumento en la turbidez fue registrado para las muestras tratadas con UV-C en comparación con sus controles.



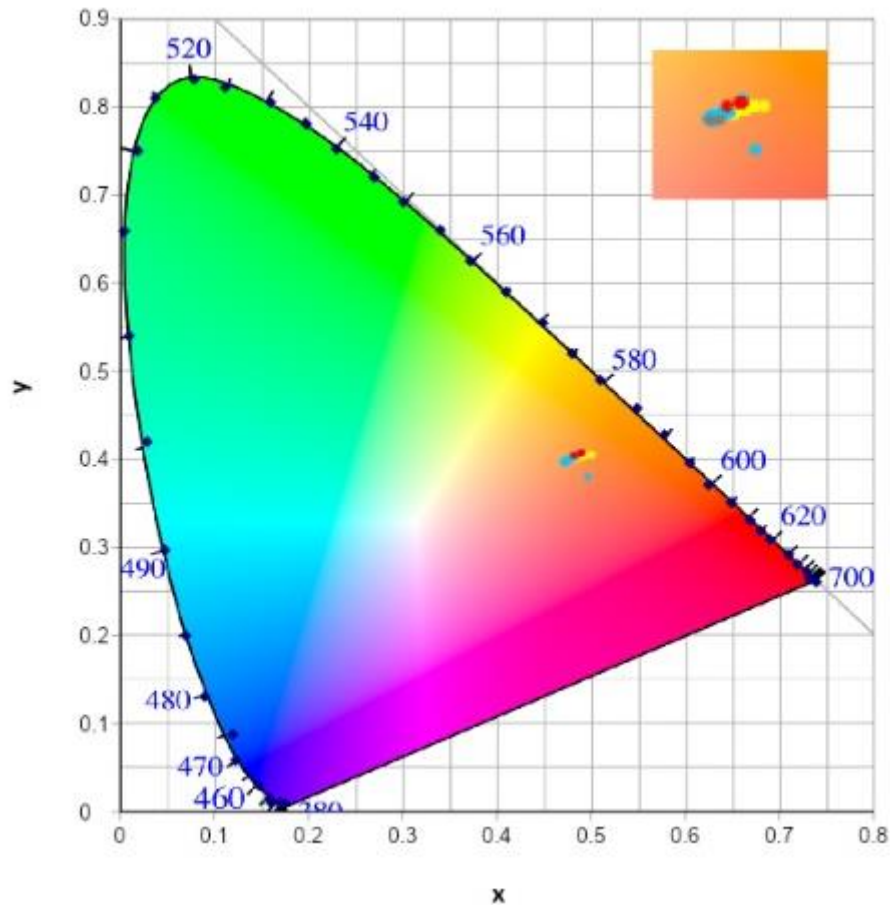


Figura 4.21. (a) Evolución del color de jugo de zanahoria-naranja no tratado (- - -, \blacklozenge), procesado por UV-C simple (—, \blacktriangle), procesado por T:50 °C simple (—, \bullet) o por UV-C/T (—, \bullet) a lo largo del almacenamiento refrigerado (4 °C). Desvío estándar (I). **(b)** Evolución del color de jugo zanahoria-naranja control (\bullet) o procesado por UV-C (\bullet), por T:50 °C (\bullet), o por UV-C/T (\bullet) en el diagrama de cromaticidad CIE x,y durante el almacenamiento (4 °C).

Tabla 4.9. Valores de pH, turbidez y °Brix al día 0 (inicio) y día 13 de almacenamiento refrigerado para jugo de zanahoria-naranja no tratado, procesado con UV-C simple, con T:50 °C simple, y con UV-C/T asistido a 50 °C.

Sistema	Día	pH	°Brix	Turbidez (NTU)
Control	0	4,21±0,01	7,78±0,02	3030±247
	3	4,15±0,01	7,85±0,07	2788±381
	10	4,18±0,01	7,98±0,02	3138±41
	13	4,22±0,00	7,85±0,11	2912±233
T:50 °C	0	4,24±0,02	7,87±0,06	3038±86
	3	4,18±0,03	7,90±0,05	3088±175
	10	4,18±0,03	7,98±0,02	2776±319
	13	4,20±0,04	7,76±0,15	3322±47
UV-C	0	4,21±0,03	7,73±0,14	2956±78
	3	4,18±0,01	7,88±0,07	3282±46
	10	4,17±0,01	8,03±0,11	3244±41
	13	4,18±0,01	7,95±0,02	3300±85
UV-C/T	0	4,20±0,04	7,63±0,05	3278±92
	3	4,18±0,00	7,85±0,05	3117±46
	10	4,18±0,00	7,95±0,11	2886±132
	13	4,17±0,01	7,97±0,06	2989±134

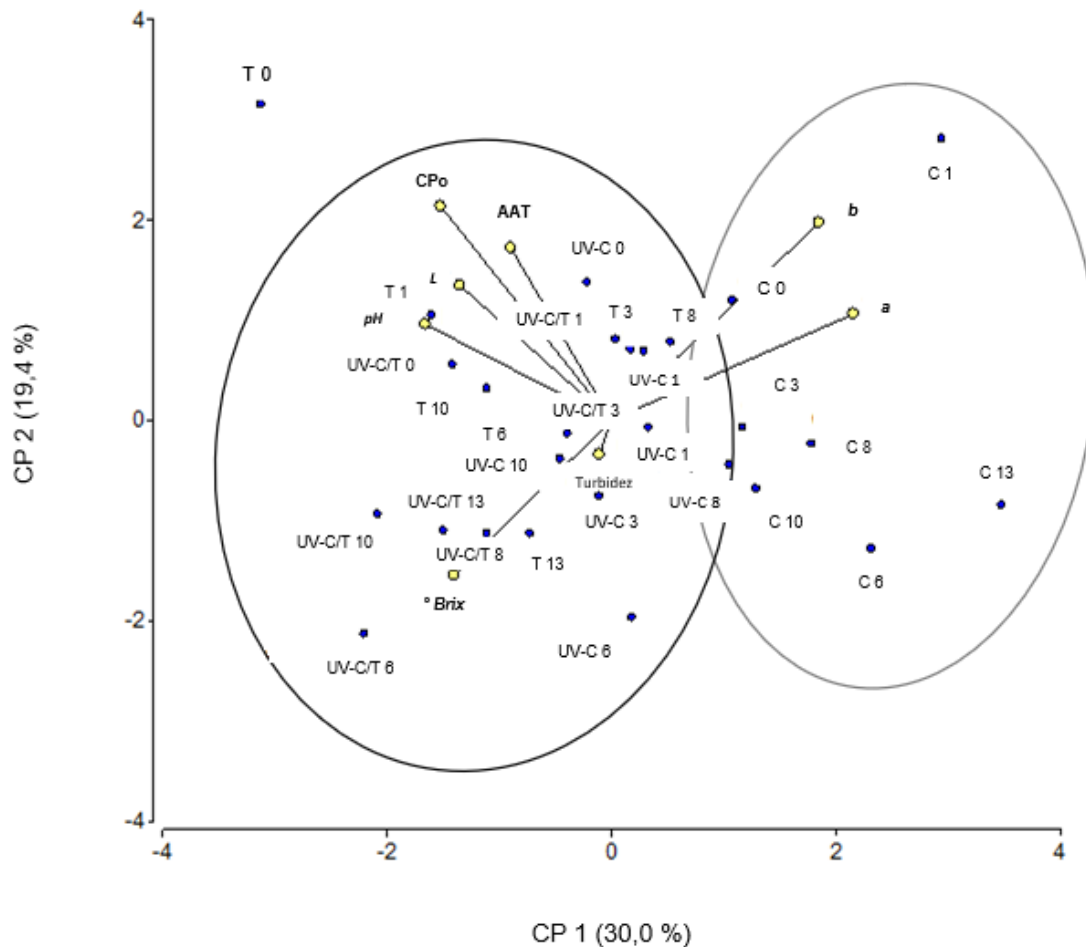


Figura 4.22. Gráfico bidimensional del análisis de componentes principales (PCA) ilustrando la relación entre el pH, turbidez, °Brix, y las funciones asociadas al color de jugo zanahoria-naranja y las distintas muestras analizadas a distintos tiempos del almacenamiento refrigerado (días: 0, 1, 3, 6, 8, 10 y 13). Muestras: control (C), procesadas con UV-C simple (UV-C), con T:50 °C simple (T), y con UV-C asistido (UV-C/T:50 °C).

4.14. Análisis sensorial

4.14.1. Estudio conjunto

Se evaluó el efecto de las características del jugo de zanahoria-naranja procesado con UV-C/T y del tipo de procesamiento aplicado sobre la percepción de saludable y sobre la voluntad de probarlo. Considerando todos los consumidores, la voluntad promedio de probar el jugo fue de $5,9 \pm 1,3$ puntos de la escala de 7 puntos usada, estando cercano a la categoría “Definitivamente lo probaría”. Mientras que la salubridad del producto percibida por los panelistas promedió los $6,4 \pm 0,9$ puntos, lo cual estuvo cerca de la categoría “Muy saludable”. No se detectaron diferencias significativas entre los panelistas con respecto al impacto de la información dada por las cuatro cartillas provistas ($p > 0,05$). Además, los panelistas percibieron al jugo como saludable, independientemente de la información

proporcionada. Adicionalmente, no se detectaron diferencias en los puntajes hedónicos cuando se les informó a los consumidores en la cartilla sobre los beneficios para la salud asociados al producto (Cartillas 3 y 4) en comparación a los que no recibieron tal información (Cartilla 1) ($p>0,05$).

En concordancia con este trabajo, Endrizzi y col. (2015) realizaron un estudio conjunto para evaluar la aceptabilidad general sobre una escala hedónica de 9 puntos de discos de manzana, brindando información respecto a su contenido de fibra y antioxidantes. Los autores no observaron un efecto significativo de la información nutricional sobre la aceptabilidad general promedio. En consecuencia, propusieron que la percepción sobre lo saludable podría depender del tipo de producto bajo estudio, dado que es difícil para los consumidores estimar qué tan saludable resulta un alimento que ya de por sí es considerado como tal, como las manzanas o el jugo de zanahoria-naranja.

Es importante recalcar que las mujeres mostraron una mayor voluntad de probar el jugo ($6,6\pm 0,9$) que los hombres ($5,3\pm 0,8$) ($p<0,05$), siendo estas diferencias más marcadas para aquellas mujeres que recibieron la Cartilla 3 (*100 % natural, Sin preservantes o azúcar agregada, Rico en antioxidantes*). No se detectaron diferencias significativas entre géneros respecto a la percepción de salubridad ($p>0,05$). De manera similar, Ares y col. (2009) observaron que las mujeres mostraron mayor disposición a probar un yogur funcional que los varones y lo caracterizaron como más saludable.

Respecto al factor "*Tipo de procesamiento*", los panelistas no asociaron el uso de altas temperaturas a una pérdida en la calidad nutricional. Es importante señalar que un 85 % de los participantes de este estudio tenían 18-29 años. Por lo tanto, se podría concluir que los jóvenes no están atentos a los beneficios en la salud provistos por aquellos productos alimentarios ricos en compuestos bioactivos, los cuales podrían ser alterados por el uso de métodos de preservación a altas temperaturas. Múltiples estudios han reportado que gente de mayor edad y personas con mayor conocimiento sobre nutrición presentan una actitud más positiva hacia los alimentos funcionales, siendo más receptivos a los reclamos vinculados a la salud (Lalor y col., 2011; Žeželj y col., 2012).

4.14.2. Test de campo

En primer lugar, la prueba de campo con consumidores permitió determinar la impresión global y percepción acerca de algunos atributos sensoriales para las muestras de jugo de zanahoria-naranja procesadas con UV-C/T y con T:80 °C. La aceptabilidad global promedio de las muestras procesadas con UV-C/T fue de 6,0 puntos lo cual correspondió a

la categoría “*Me gusta algo*” de la escala hedónica de 9 puntos. Sin embargo, al aplicar un análisis de conglomerados, emergieron dos grupos diferenciados (clústeres) de panelistas. Por un lado, el Grupo 1 (C1), con 78 consumidores e incluyendo los puntajes en el rango de 6 a 8 de la escala hedónica. Por otro lado, el Grupo 2 (C2), conteniendo 52 consumidores e incluyendo los puntajes en el rango de los 2 a 5 puntos (**Fig. 4.23**). El valor del coeficiente de correlación cofenética obtenido mostró que el análisis de conglomerados resultó adecuado (CCC=0,81). El C1 mostró un interés marcado en el producto, presentando una aceptabilidad global de 6,9 en la escala hedónica (cercana a la categoría “*Me gusta moderadamente*” de la escala hedónica). Por otro lado, la técnica de PCA reveló que el C1 asoció las muestras tratadas con UV-C/T a un sabor herbal adecuado, gusto a zanahoria adecuado, amargor y cuerpo adecuado junto a un aroma frutal intenso (**Fig. 4.23**). Por lo tanto, las muestras procesadas con UV-C/T presentaron un mayor atractivo para un grupo particular de consumidores, lo cual concuerda con el enfoque de segmentación de productos aplicado por los fabricantes de alimentos en los últimos años. Este enfoque considera que resulta mejor desarrollar distintos productos apuntados a grupos de consumidores con diferentes preferencias alimentarias, que desarrollar un solo producto para el conjunto entero de consumidores a fines de lograr altos niveles de aceptabilidad (Lawless, 2013).

De modo similar, las muestras pasteurizadas (T:80 °C) presentaron una aceptabilidad global promedio de 6,1±1,7 puntos, lo cual correspondió a la categoría “*Me gusta algo*” de la escala hedónica de 9 puntos. El análisis de conglomerados permitió detectar la existencia de dos grupos diferenciados de consumidores. Por un lado, el Grupo 1 (C1), conteniendo 87 panelistas e incluyendo los puntajes comprendidos en el rango de los 6 a 9 puntos de la escala. Por otro lado, se identificó el Grupo 2 (C2), con 43 panelistas e incluyendo los puntajes en el rango de los 2 a 5 puntos. El valor de CCC obtenido (CCC=0,81) marcó que el análisis de conglomerados presentó buen ajuste.

Kaya y col. (2015) reportaron que un jugo mezcla de limón-melón (pH=4,0) procesado con luz UV-C (0,0-2,5 J/mL) presentó una aceptabilidad global de 3,7±1,0 puntos, correspondiente a la categoría “*Me gusta*” en una escala hedónica de 5 puntos, lo cual es similar a lo reportado en esta tesis para la evaluación del jugo de zanahoria-naranja tratado con UV-C/T. Por su parte, un estudio reveló una aceptabilidad global promedio de 6,0 puntos, correspondiente a la categoría “*Me gusta algo*”, sobre una escala hedónica de 9 puntos (con el mismo sistema de puntaje que la usada en esta tesis) para un yogur formulado usando leche procesada con luz UV-C asistida por el uso de temperatura (T:85 °C) y vacío (Vásquez-Mazo y col., 2019).

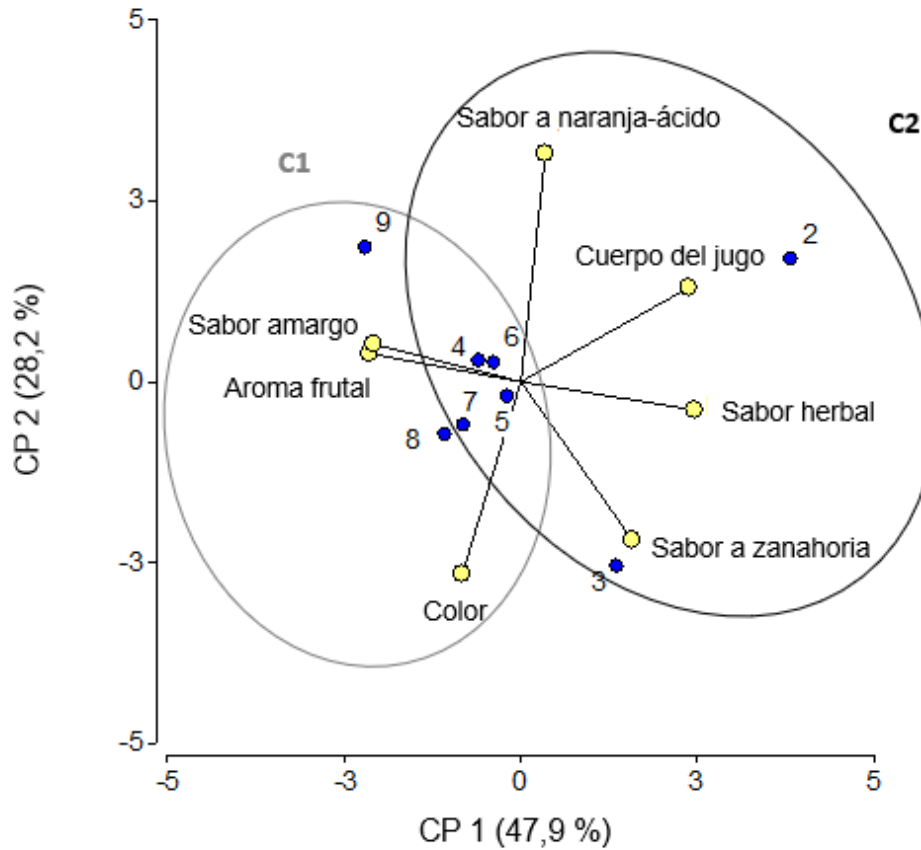


Figura 4.23. Gráfico bidimensional del PCA ilustrando la relación entre los puntajes asignados en la prueba de aceptabilidad global y los asignados durante la evaluación de los atributos individuales del jugo de zanahoria-naranja procesado con UV-C/T. Los círculos encierran los puntajes asociados al Grupo 1 (C1) y al Grupo 2 (C2) de consumidores provenientes del análisis de conglomerados.

4.14.3. Cuestionario CATA (*Check-all-that-apply*)

En general, los panelistas usaron entre uno y diez términos para describir las muestras de jugo de zanahoria-naranja en el cuestionario CATA. Los términos más usados para describir las muestras tratadas con UV-C/T y las pasteurizadas a T:80 °C fueron: *Gusto a zanahoria*, *Sabor natural*, y *Color intenso*. Por otro lado, los gustos menos usados resultaron: *Sabor cocido*, *Gusto a hierbas*, y *Aroma herbal*.

Se realizó un análisis de correspondencias (CA) a partir de las frecuencias de los términos usados en el cuestionario CATA (**Fig. 4.24**). La primera y segunda dimensión del CA representaron un 95,8 % y 3,2 % de la varianza de los datos experimentales, respectivamente. El jugo procesado con UV-C/T exhibió valores positivos y negativos según los ejes 1 y 2, respectivamente siendo descrito por los panelistas mediante los siguientes términos: *Gusto a zanahoria*, *No afrutado*, *Sabor extraño*, y *Aroma extraño*. Por su parte, el

jugo tratado a T:80 °C mostró valores positivos para ambos ejes, siendo descrito mediante los siguientes términos: *Sabor cocido*, *Sabor artificial*, *Demasiado particulado*, *Sabor persistente (con regusto)*, *Color intenso*, *Gusto a hierbas*, y *Sabor intenso a fruta-hortaliza*. Mientras tanto, los panelistas definieron que el jugo ideal debería presentar las siguientes características: *Sabor natural*, *Gusto a naranja*, *Cuerpo agradable*, y *Color agradable*. En consecuencia, la comparación de muestras de jugos reales con una bebida ideal definida por los consumidores permitiría efectuar mejoras futuras a los productos bajo análisis. En particular, los consumidores deseaban una bebida frutihortícola con un sabor a naranja más fuerte y un sabor a zanahoria más débil que aquellos percibidos en las muestras de jugo procesadas con UV-C/T.

Múltiples estudios han solicitado a un grupo de consumidores que definiesen su producto ideal, para poder realizar modificaciones sobre las formulaciones en desarrollo con el fin de aumentar la aceptabilidad. En un caso, se evaluaron distintas formulaciones de un postre lácteo mediante un cuestionario CATA (Bruzzzone y col., 2015). Los panelistas definieron que el producto ideal debía ser: *“Cremoso”*, *“Espeso”*, *“Dulce”*, *“Con sabor a vainilla”*, *“Homogéneo”*, *“Suave”*, *“Sin regusto”*, y *“Sin sabores extraños”* (off-flavors).

Por otro lado, se solicitó a un grupo de consumidores que definieran su aderezo para ensaladas ideal mediante un cuestionario CATA que también fue usado para evaluar los atributos de tres aderezos distintos: jugo de limón, vinagre de vino blanco, y jugo de uva inmadura (De-Matos y col., 2018). Según los panelistas, el aderezo para ensaladas ideal debía presentar *“Dulzor moderado”* y *“Aroma vegetal”*.

Adicionalmente, la frecuencia a la cual los consumidores describieron los jugos procesados mediante descriptores no sensoriales fue evaluada por una prueba de χ^2 . El descriptor no sensorial más usado para caracterizar tanto las muestras UV-C/T como las T:80 °C fue *“Saludable”* (76 %), seguido por *“Para consumir en el desayuno”* (51-53 %), *“Para dietas”* (45 %), *“Refreshante e hidratante”* (36,9-39,2 %), *“Para consumir ocasionalmente”* (36,0-42,3 %), *“Para días calurosos”* (32,3-35,3 %), *“Para practicar deportes”* (20,8-23,1 %), *“Para consumir todos los días”* (18,5-21,5 %). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre las muestras procesadas con UV-C/T y T:80 °C con respecto a cualquiera de los descriptores no sensoriales analizados.

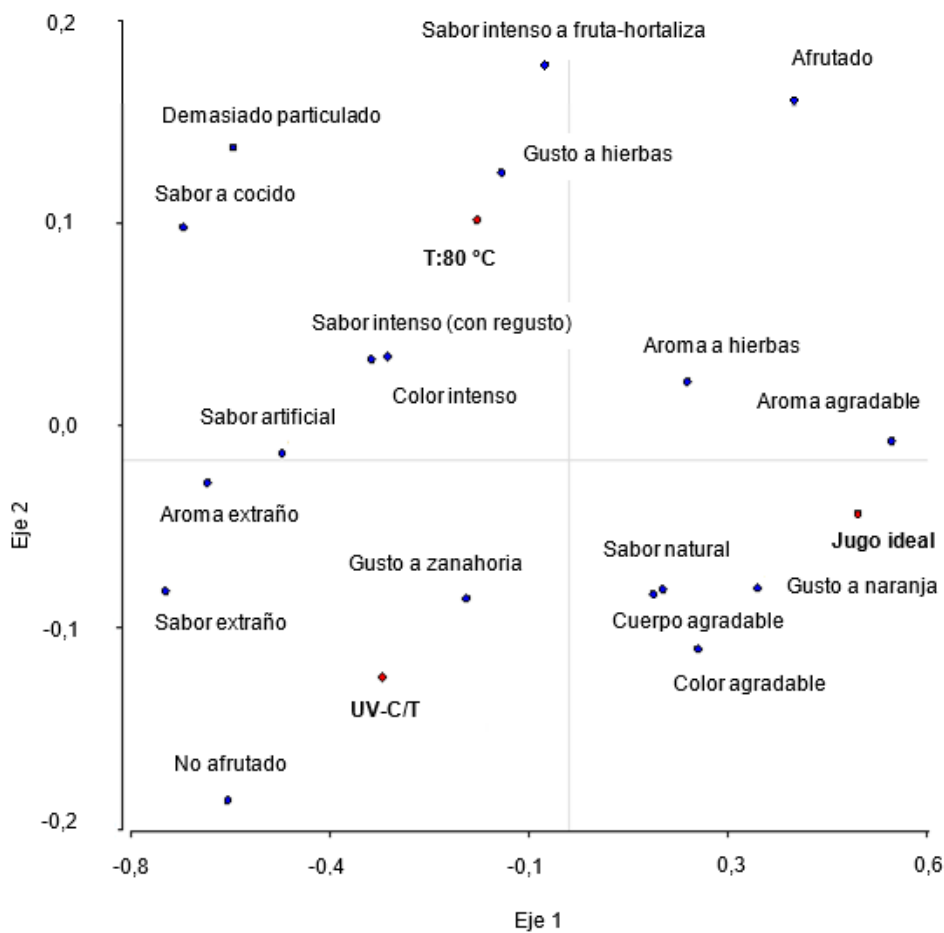


Figura 4.24. Gráfico bidimensional del CA representando la frecuencia de mención de cada término CATA para un jugo zanahoria-naranja procesado con UV-C/T, un jugo sometido a un tratamiento de pasteurización (T:80 °C), y para una muestra ideal definida por los consumidores.

4.14.4. Análisis de penalización

Con el objetivo de dilucidar qué atributos del jugo contribuyeron en disminuir su puntaje hedónico, se efectuó un análisis de penalización sobre las muestras de jugo mezcla de zanahoria-naranja tratadas con UV-C/T (**Fig. 4.25**).

Un porcentaje importante de los panelistas redujeron puntos de la impresión global de las muestras de jugo mezcla procesadas con UV-C/T, puesto a que percibieron en las mismas un *Mucho gusto a zanahoria* y *Poco sabor frutal*. Por su parte, los atributos restantes no contribuyeron en disminuir el puntaje hedónico de las muestras de jugo mezcla tratadas con UV-C/T, puesto que provocaron un cambio muy mínimo en el puntaje hedónico promedio al haber sido sólo percibidos por un porcentaje reducido de los panelistas. En consecuencia, deberían introducirse modificaciones en la proporción de la zanahoria y la

naranja empleadas en la mezcla (y, por lo tanto, en el sabor a cada una) para mejorar la aceptabilidad global del producto final.

Si bien el análisis de penalización es una herramienta poco explorada en el campo del análisis sensorial de alimentos, ha sido empleada por algunos estudios. En un caso, se vio que un grupo de consumidores dio un menor puntaje hedónico a muestras de yogur elaboradas con leche tratada con UV-C/T (1060 mJ/cm²; T:85 °C) debido a su baja acidez y bajo gusto a vainilla (Vásquez-Maso y col., 2019). En otro estudio, se vio que había una penalización con respecto a la cremosidad en pasteles de queso diseñados con el objetivo de lograr una mayor sensación de saciedad (Rodríguez, 2015). En adición, algunas muestras fueron penalizadas con relación a su contenido de humedad.

Por otra parte, se observó una penalización en la aceptabilidad global vinculada a un exceso en la dureza y sensación seca en la boca para bizcochos con distintos contenidos lipídicos y de grasa (Laguna y col., 2013).

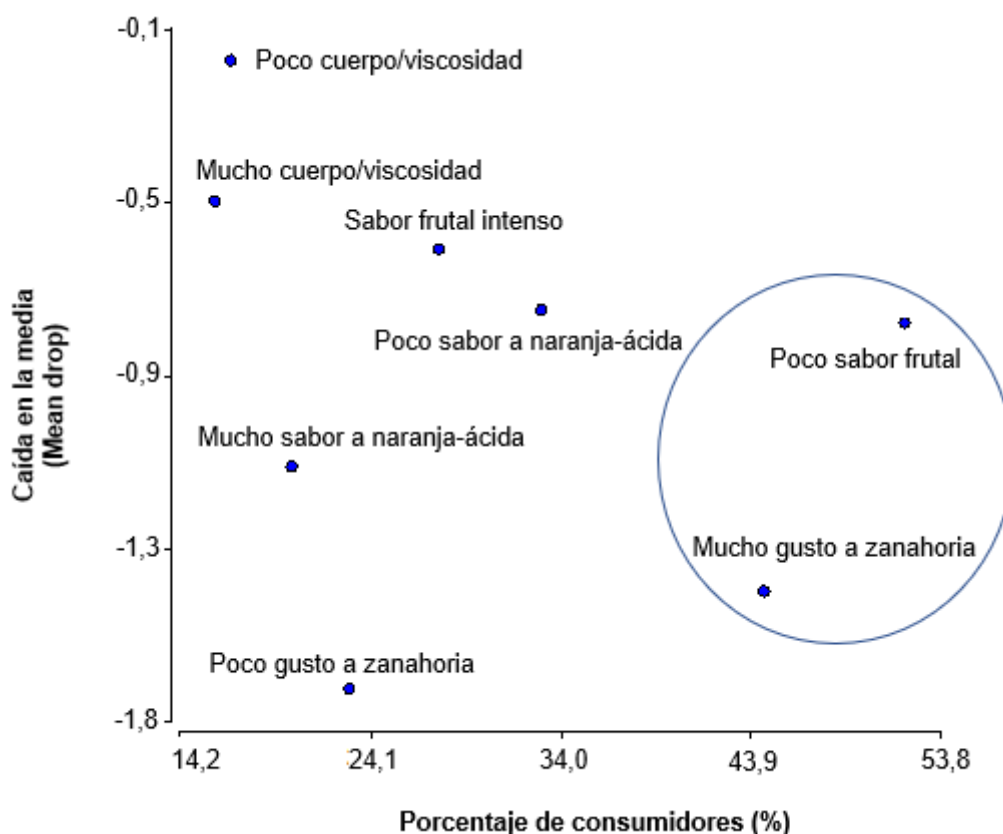


Figura 4.25. Análisis de penalización para las muestras de jugo procesadas con UV-C/T.



5. Conclusiones

5. Conclusiones

Esta investigación produjo información cuantitativa relevante sobre la aplicación de una novedosa tecnología asistida para la preservación de jugos frutihortícolas de alta turbidez. La propuesta analizada consiste en el empleo de la luz UV-C asistida por temperatura moderada (UV-C/T) para el procesamiento de un jugo de zanahoria-naranja con el objetivo de disminuir la intensidad de los tratamientos térmicos tradicionales, permitiendo obtener un producto de mejor calidad organoléptica que cumpla los requisitos respecto los niveles de inactivación para patógenos relevantes.

El empleo de múltiples herramientas vinculadas al análisis de la inactivación microbiana (microbiología predictiva, citometría de flujo y microscopía electrónica de transmisión) para los distintos tratamientos bajo estudio, fue útil para comprender mejor su modo de acción. Estos datos, junto a los de la metodología de superficies de respuesta, resultaron de suma utilidad a la hora de optimizar el tratamiento asistido UV-C/T. La condición óptima resultó ser el tratamiento UV-C/T asistido a 50 °C de temperatura (UV-C/T:50 °C).

Adicionalmente, los experimentos brindaron información relevante acerca de los efectos del tratamiento asistido UV-C/T y los simples (UV-C; T:50 °C) sobre la estabilidad microbiológica (estudio de la evolución de la flora nativa en el almacenamiento) y la calidad fisicoquímica y sensorial de los jugos de zanahoria-naranja.

En base a los resultados aquí presentados, el tratamiento óptimo con luz UV-C asistida por temperatura moderada (UV-C/T:50 °C) representa una alternativa promisoriosa para la preservación de jugos frutihortícolas turbios, logrando los niveles de inactivación requeridos por la FDA para la inactivación de un patógeno relevante (5 ciclos logarítmicos) y una retención de los factores de calidad asociados a los jugos frescos.

A continuación, se enumeran las conclusiones relativas a los objetivos particulares planteados en esta tesis doctoral.

5.1. Primera parte

- El jugo mezcla de zanahoria-naranja resultó ser una matriz de alta turbidez y elevado coeficiente de absorción UV. Al ser una matriz líquida turbia con baja transmisividad UV, la eficiencia de la luz UV-C simple para su preservación se ve disminuida.
- La determinación del número de Reynolds permitió establecer que el flujo en el reactor era de tipo laminar. A pesar de ello, la recirculación del jugo

permitió un procesamiento adecuado. El volumen del reactor fue efectivamente utilizado, lo cual se evidenció en el hecho de que el cociente entre el tiempo de residencia medio del flujo y el tiempo de residencia teórico fue cercano a 1.

- La técnica de radiometría permitió determinar la dosis de UV-C emitida por las lámparas del reactor, mientras que la técnica de actinometría química permitió cuantificar adecuadamente la dosis de UV-C absorbida por la muestra.

- La técnica de biodosimetría permitió determinar una dosis diferente, la cual tiene en cuenta tanto la distribución de tiempos de residencia de los elementos de volumen como la distribución de dosis UV-C en el reactor. Es de destacar que esta biodosis medida mediante un pulso microbiano en una corriente no es tenida en cuenta en la mayoría de las investigaciones realizadas y trabajos publicados al momento de aplicar tratamientos que involucran luz ultravioleta en sistemas líquidos.

5.2. Segunda parte

- El tratamiento con luz UV-C simple produjo una inactivación moderada (2,5-2,9 reducciones logarítmicas) de *E. coli* ATCC 35218, *P. fluorescens* ATCC 49838 y *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 en el jugo de zanahoria-naranja, sin detectarse diferencias significativas entre cepas. Sin embargo, los niveles de inactivación observados no resultaron cercanos a las 5 reducciones logarítmicas requeridas por la USFDA (2001) puesto que la efectividad del tratamiento UV-C se ve reducida por la baja transmitancia del jugo turbio. En general, las curvas de inactivación para los tratamientos UV-C simples presentaron un hombro pequeño y carecieron de cola.

- La aplicación de luz UV-C asistida por temperatura moderada (T: 40-50 °C) representa una buena alternativa para el mejoramiento de la inactivación de *E. coli*, *P. fluorescens* y *S. cerevisiae* en un jugo natural de zanahoria-naranja de alta turbidez. Todos los tratamientos UV-C/T produjeron inactivación microbiana de moderada a alta (2,6-6,0 reducciones logarítmicas), dependiendo de la temperatura y el microorganismo. Ciertos tratamientos UV-C/T (45 °C; 50 °C) exhibieron efectos sinérgicos sobre la inactivación de *E. coli* y *P. fluorescens*. Por otro lado, solamente se detectó un efecto aditivo para la inactivación de *P. fluorescens* con UV-C/T a 40 °C. El resto de los tratamientos UV-C/T resultaron indiferente para la inactivación microbiana respecto al tratamiento UV-C simple. En general, para los tratamientos UV-C/T se detectaron curvas con ausencia de hombro y presencia de cola.

- Los valores de energía eléctrica por orden (E_{EO}) determinados para la inactivación de *E. coli*, *P. fluorescens* y *S. cerevisiae* en el jugo de zanahoria-naranja para los tratamientos con luz UV-C simple y UV-C/T asistida estuvieron en el rango de 0,35-0,83 kW*h/m³/orden, resultando una alternativa eficiente en términos energéticos para la preservación de jugos.

- Los modelos de Gompertz y de Geeraerd exhibieron un mejor ajuste que el de Weibull, permitiendo una estimación precisa de los parámetros vinculados a la inactivación microbiana mediante la aplicación de UV-C simple y UV-C/T asistido. De acuerdo con el grado de ajuste y parsimonia, el modelo de Gompertz caracterizó mejor las curvas de inactivación que el Geeraerd. Ambos modelos aportaron información relevante sobre la tasa de inactivación y la longitud del hombro (fase lag) y/o cola de las curvas observadas. Por otro lado, el modelo de Weibull brindó información extra relativa al espectro de resistencias dentro de las poblaciones microbianas.

- La aplicación de la MSR permitió establecer que el tratamiento UV-C/T a 50 °C por 15 minutos era el óptimo para maximizar la inactivación microbiana de *E. coli*, *P. fluorescens* y *S. cerevisiae*. Adicionalmente, la MSR reveló un aumento exponencial de las reducciones logarítmicas según el tiempo de tratamiento aplicado.

5.3. Tercera parte

- Las técnicas de citometría de flujo y microscopía electrónica de transmisión contribuyeron de forma complementaria a un mejor entendimiento de la inactivación de las células de *S. cerevisiae* KE 162 en el jugo de zanahoria-naranja y en agua peptonada sometidas a los tratamientos simples (UV-C; T:50 °C) y al asistido (UV-C/T:50 °C).

- La técnica de citometría de flujo permitió un seguimiento a tiempo real del efecto de los distintos tratamientos e identificar la presencia de células doblemente marcadas pertenecientes a una población celular subletal.

- Las imágenes de las células microbianas tratadas por UV-C/T obtenidas por microscopía electrónica de transmisión revelaron cambios en la estructura tales como alteración de la forma, vacuolización, coagulación del contenido interno, rotura de la pared celular y permeabilización de la membrana. Estos fenómenos podrían estar implicados en la inactivación microbiana.

5.4. Cuarta parte

- La flora nativa del jugo mezcla zanahoria-naranja sin tratar empezó a crecer al tercer día de almacenamiento. El tratamiento UV-C/T provocó 0,3-5,0 reducciones logarítmicas en las poblaciones de mesófilos aerobios, hongos y levaduras, y coliformes totales inmediatamente tras el tratamiento.

- Los jugos tratados con T:50 °C y con luz UV-C simple no sobrepasaron los límites establecidos por la Health Protection Agency del Reino Unido (HPA, 2009) respecto a los coliformes totales y aerobios mesófilos totales para jugos frutihortícolas durante 13 días almacenamiento refrigerado. El jugo procesado con UV-C/T se mantuvo por debajo de esos límites por 24 días de almacenamiento refrigerado. En cambio, el jugo de zanahoria-naranja sin tratar excedió el límite recomendado de coliformes totales inicialmente y durante su almacenamiento por 13 días.

- El tratamiento UV-C/T a 50 °C acoplado al almacenamiento refrigerado generó mayores niveles de inactivación de la población de mesófilos aerobios en comparación a los alcanzados inmediatamente tras el procesamiento. Esto representa una estrategia multiobjetivo de conservación de alimentos, en la que la refrigeración representa un obstáculo adicional.

- El tratamiento UV-C/T óptimo preservó el color, pH, °Brix y turbidez del jugo zanahoria-naranja a lo largo de su almacenamiento refrigerado (21 días).

- El jugo de zanahoria-naranja procesado con UV-C/T presentó un contenido de polifenoles y una actividad antioxidante total similares que las muestras de jugo no tratadas y las procesadas con UV-C simple, permaneciendo sus valores constantes a lo largo del almacenamiento refrigerado. Las muestras tratadas con T:50 °C simple presentaron un incremento en los valores de CPo y de AAT en los primeros 5 días de almacenamiento refrigerado.

- En una primera instancia, los estudios sensoriales revelaron que el jugo de zanahoria-naranja procesado con UV-C/T fue percibido como “*Muy saludable*”, detectándose una gran voluntad de probarlo y mostrándose las mujeres más interesadas en el producto que los hombres. La información respecto al tipo de procesamiento que recibió el jugo no influyó en la percepción de saludable o en la intención de probarlo.

- La prueba de campo determinó que la aceptabilidad global del jugo de zanahoria-naranja tratado con UV-C/T fue moderada, obteniéndose un puntaje promedio de 6,0 sobre una escala hedónica de 9 puntos, correspondiente a la categoría “*Me gusta algo*”.

- El análisis de agrupamiento permitió detectar un grupo de consumidores con un interés más marcado en las bebidas frutihortícolas procesadas con UV-C/T. Esto se condice con el enfoque actual de segmentación de productos alimenticios.
- El jugo tratado mediante una pasteurización a T:80 °C fue evaluado como artificial y con gusto a cocido, mientras que el cuestionario CATA reveló que el jugo UV-C/T fue evaluado mejor respecto de estos descriptores. El CATA también reveló que ciertas modificaciones deberían introducirse al jugo zanahoria-naranja tratado con UV-C/T para cumplir las expectativas de los panelistas respecto de lo que sería un producto ideal, en particular se debería incrementar el sabor a la naranja a la par de disminuir el de zanahoria.
- El análisis de penalidad permitió establecer que los atributos que contribuyeron en disminuir el puntaje hedónico del jugo de zanahoria-naranja procesado con UV-C/T fueron el “*Sabor intenso a zanahoria*” y el “*Poco gusto afrutado*”. En conclusión, sería necesario reducir la proporción de jugo de zanahoria y aumentar la de jugo de naranja a fin de incrementar la aceptabilidad global del producto.

5.5. Investigaciones futuras

En el futuro cercano, se desea avanzar en distintos aspectos de la investigación hasta el momento aún no caracterizados en profundidad o abordados. En primer lugar, se desea estudiar la combinación de la luz UV-C con otras tecnologías emergentes para la preservación de jugos frutihortícolas turbios. Adicionalmente, se busca evaluar la inactivación microbiana y diversos factores de calidad en jugos procesados con UV-C/T con el agregado de antimicrobianos naturales. Además, se pretende estudiar la efectividad del tratamiento asistido UV-C/T sobre múltiples microorganismos de relevancia no evaluados en los experimentos realizados. Por ejemplo, se podría analizar la inactivación de hongos deteriorativos presentes en la superficie de naranjas (por ejemplo: *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus*) y de zanahorias (*Cladosporium*, *Fusarium*, entre otros).

Por otro lado, se desea evaluar otros factores relacionados a la calidad del jugo mezcla de zanahoria-naranja procesado con UV-C simple y UV-C/T asistido. Por un lado, sería necesario medir la actividad antioxidante total de los jugos mediante técnicas adicionales, que brinden información complementaria a la obtenida mediante el ensayo de DPPH, como la de ABTS, ORAC y FRAP. Por otro lado, sería importante determinar los contenidos de vitamina C y de carotenos para los jugos tratados y sin tratar mediante la

técnica de HPLC. Adicionalmente, se desea medir las actividades de enzimas vinculadas a la calidad de jugos turbios tales como polifenoloxidasas, pectinmetilesterasa y peroxidasas.

Finalmente, se desea estudiar el impacto de la introducción de modificaciones en la proporción de zanahoria y naranja empleadas sobre la calidad sensorial y la aceptabilidad global del jugo mezcla.



6. Anexo estadístico

6. Anexo estadístico

6.1. Significación estadística

La significación estadística es la probabilidad de que una relación entre dos o más variables no sea azarosa, establecida mediante un *p valor* generado por una prueba de hipótesis. Generalmente, un *p valor* del 5 % o inferior resulta estadísticamente significativo.

La significación es usada para aceptar o no la **hipótesis nula** (H_0), que establece que no existe relación entre las variables medidas. Cuando el resultado de la prueba excede el *p valor*, se acepta H_0 . Pero cuando es inferior al *p valor*, H_0 es rechazada.

La **hipótesis nula** asume que cualquier diferencia observada en un conjunto de datos se debe al azar, siendo su inverso la **hipótesis alternativa** (H_1). H_0 postula que un parámetro (como la media o el desvío estándar) no es rechazable salvo que los datos de la muestra indiquen que es falso. Si los resultados de la muestra no respaldan H_0 , se la rechaza y se acepta H_1 .

El **nivel de significación** es la chance de rechazar H_0 cuando es verdadera (error de tipo I o α) o de aceptarla cuando es falsa (error de tipo II o β). En este proceso, se emplea el *p valor*: $p=1-\alpha$. Por lo tanto, el valor obtenido es comparado con el valor correspondiente a la tabla (según el nivel de significación y los grados de libertad). Si el valor experimental/observacional es mayor al de tablas, H_0 resulta rechazada. Mientras que, si es menor, H_0 es aceptada para ese nivel de significación (α).

Tabla 6.1. Resumen de los posibles resultados para una prueba de hipótesis, mostrando los distintos tipos de errores (tipo I y II).

	Decisión tomada	
	Rechazar H_0	Aceptar H_0
H_0 es verdadera	Error de tipo I (α)	Decisión correcta
H_0 es falsa	Decisión correcta	Error de tipo II (β)

Al efectuarse este tipo de contrastes, se debe considerar si se trata de un ensayo unilateral o bilateral. Para una prueba unilateral usando un $\alpha=0,05$; significa que 5 valores de cada 100 podrían deberse al azar, por lo que la probabilidad de que no sea así es $p=1-0,05=0,95$. Por el contrario, si la prueba fuese bilateral para la misma situación: $p=1-2*\alpha=0,90$.

El nivel de significación se simboliza con uno, dos o tres asteriscos, siendo los niveles: (a) $p \geq 0,95$ ($\alpha \leq 0,05$); (b) $p \geq 0,99$ ($\alpha \leq 0,01$); y $p \geq 0,999$ ($\alpha \leq 0,001$). Si el valor obtenido es menor al de tablas, “no hay significación” y se denota con (-) o (NS). Si el valor es mayor al tabulado para $p \leq 0,95$ pero no para el tabulado para $p \geq 0,99$; se marca con un asterisco (*). Si el valor es mayor que el tabulado para $p \geq 0,99$; se usan dos asteriscos (**), y para $p \geq 0,999$ tres (***). Según la situación de la que se trate:

- Valor experimental/observacional < Valor tabla (NS)/(-)
- Valor experimental/observacional > Valor tabla ($p \geq 0,95$) (*)
- Valor experimental/observacional > Valor tabla ($p \geq 0,99$) (**)
- Valor experimental/observacional > Valor tabla ($p \geq 0,999$) (***)

Comúnmente, para las experiencias en el área de tecnología y procesamiento de alimentos, los niveles de significación (*) y (**) son considerados adecuados.

6.2. Análisis de la varianza (ANOVA)

El **análisis de la varianza** es una herramienta usada para testear diferencias entre medias grupales experimentales u observacionales (Sawyer, 2009). Se emplea en diseños experimentales conteniendo una variable paramétrica dependiente, continua y medible junto a varios grupos experimentales con una o más variables independientes (categóricas). Las variables independientes se llaman **factores**, mientras que los grupos dentro de un factor representan sus **niveles**.

En el ANOVA, se comparan múltiples medias muestrales para verificar si todas forman parte de la misma población o no, resultando ser significativamente distintas. La variabilidad total de una distribución de valores puede ordenarse en diversas categorías, plasmando aquellos efectos identificables y aquella variación no identificable. El conjunto de la variación del set de datos es la **Suma de Cuadrados Totales (SST)**, que se compone de dos aportes: la **Suma de Cuadrados a causa de la Regresión (SSR)**, y la **Suma de Cuadrados Residual (SSE)**.

- **Suma de Cuadrados Totales (SST)**: es la suma de los cuadrados de las desviaciones del valor observado en cada muestra Y_i respecto de la media \bar{Y} .

$$(6.1) \quad SST = \sum_{i=1}^N (Y_i - \bar{Y})^2$$

La SST posee “N-1” grados de libertad asociados puesto que existe la siguiente restricción:

$$(6.2) \quad \sum_{i=1}^N Y_i - \bar{Y} = 0$$

- Suma de Cuadrados a causa de la Regresión (SSR): da cuenta de la variabilidad resultante de considerar, por un lado, la relación de la variable independiente con la dependiente en base al modelo de regresión escogido y, por otro, la medición de la variable independiente. Es la sumatoria de N elementos de la población de los cuadrados de la diferencia entre la media muestral \bar{Y} y el valor predicho del modelo \hat{Y}_i para una corrida i .

$$(6.3) \quad SSR = \sum (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2$$

Los grados de libertad se definen según el número de parámetros, P , usados por el modelo para establecer la relación entre las variables medidas. Los grados de libertad asociados a la suma de cuadrados son “ $P-1$ ”.

- Media de Cuadrados a causa de la regresión (MSR): se obtiene dividiendo la SSR por “ $P-1$ ”:

$$(6.4) \quad MSR = \frac{SSR}{P-1}$$

- Suma de cuadrados residual (SSE) y Media de Cuadrados residual (MSE): la SSE representa la variabilidad observada por razones no identificables y da cuenta del error de las variables medidas (en el caso de que el modelo sea el correcto). Es la suma de los cuadrados de las diferencias entre los valores determinados para N elementos poblacionales y los valores de esos elementos predichos según el modelo.

$$(6.5) \quad SSE = \sum_{i=1}^N (Y_i - \hat{Y})^2 = \sum_{i=1}^N r_i^2$$

Para la SSE , son asociados “ $N-P$ ” grados de libertad. La SSE se emplea con el fin de obtener la Media de Cuadrados Residual (MSE) **(Ec. 6.6)**.

$$(6.6) \quad MSE = \frac{SSE}{N-P}$$

Los residuos son claves para evaluar el ajuste del modelo a los valores experimentales/observacionales. La suma de cuadrados teórica de cada experiencia/observación es cero. Sin embargo, en la práctica podría no serlo, pero debería ser cercana.

6.2.1. Modelo de los parámetros de un análisis de la varianza

Tabla 6.2. Tabla exhibiendo los diferentes parámetros que componen un ANOVA.

<i>FUENTE</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Media de Cuadrados</i>
A causa de la regresión	P-1	SSR	MSR= SSR/ P-1
Residual	N-P	SSE	MSE= SSE/ N-P
TOTAL	N-1	SST	

6.2.2. El análisis de la varianza como un modelo de regresión

Una forma alternativa de explicar el ANOVA consiste en considerar a cada tratamiento (nivel) del experimento como una variable cuantitativa codificable como +1 (presente) y como 0 (ausente). Para cada elemento se puede construir un vector tratamiento (vector diseño) denominado z , de modo que los elementos que reciben el primer tratamiento obtienen $(1, 0, \dots, 0)$; mientras que los que reciben el segundo $(0, 1, \dots, 0)$. Por lo que $z_i=1$ para los elementos, dado el tratamiento número i , y $z_j=0$ para todo $j \neq i$.

Si se cuenta con P tratamientos y una variable respuesta, los datos pueden considerarse puntos en un espacio dimensional " $P+1$ ". Esta reformulación del ANOVA de un factor puede expresarse mediante una regresión múltiple (RM):

$$(6.7) \quad X_{i,j} = b_1 Z_{i1} + b_2 Z_{i2} + \dots + b_p Z_{ip} + e_i$$

Entonces, al ser un modelo de regresión deben considerarse sus pros y contras. La H_0 en la prueba F sostiene que *todos los parámetros son nulos* ($\beta_j=0$). En cambio, la H_1 postula que *al menos un parámetro es distinto a cero* ($\beta_j \neq 0$).

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

En el caso de que la H_0 resulte verdadera, el valor del estadístico F presenta una distribución con " $P-1$ " y " $N-P$ " grados de libertad en el numerador y denominador de su ecuación, respectivamente:

$$(6.8) \quad F = \frac{MSR}{MSE} = \frac{SSR (P-1)}{SSE (N-P)}$$

Tras calcular el valor de F , se lo compara con busca su valor respectivo en tablas para el nivel de significación escogido con " $P-1$ " grados de libertad y " $N-P$ ". Si el F calculado resulta superior al de tablas, H_0 es rechazada para α , por lo que al menos un parámetro posee un efecto sobre la variable respuesta. Cuanto mayor sea el valor de F calculado, la regresión explica mejor el modelo postulado ya que es mayor la razón de la varianza a causa de la regresión respecto de la varianza atribuida a causas no identificables.

6.2.3. La prueba F de significación de la regresión

La **prueba F** es frecuentemente usada para comprobar la significación de la regresión. Si el valor calculado de F es mayor al de tablas, es posible asumir que la variabilidad de la información explicada por el modelo es significativamente superior a la variación por causas desconocidas (residuales) y que el efecto observado no resultó azaroso (Cayuela, 2014).

6.3. Métodos de múltiples comparaciones por mínima diferencia significativa

El ANOVA resulta útil para determinar si hay diferencias entre las medias muestrales observadas, pero no da cuenta de cuáles son diferentes. Para entender las **diferencias grupales** dentro de un ANOVA, se deben efectuar pruebas que den cuenta de las diferencias entre pares de datos: pruebas post hoc. Dentro de las mismas, existen las **pruebas por comparaciones múltiples** (McHugh, 2011).

Una forma de ver diferencias entre pares sería realizar pruebas t de Student. Esto no es adecuado por dos motivos: **(1)** efectuar repetidas pruebas sobre el mismo set de datos genera un aumento del α ; y **(2)** los resultados seguirán sin poder interpretarse ya que las pruebas t permiten analizar sólo dos grupos a la vez. Cada uno de los subgrupos de un ANOVA posee su propia media y el total de medias se remueve del análisis cuando se usan repetidas pruebas t . Ignorar que existen muchas medias de los subgrupos, incrementa artificialmente la cantidad de diferencias significativas, y lo que es más grave, los estadísticos t individuales de los pares serán mayores cuando ciertos subgrupos sean excluidos de las pruebas post hoc. Entonces, podría darse una sobreestimación del tamaño de las pruebas t individuales. En consecuencia, la suma de los valores t de las pruebas entre pares va a exceder el valor del estadístico t calculado por las técnicas de comparación múltiple. Por lo tanto, usar múltiples pruebas t conducirá a una mayor chance de cometer un error de Tipo I.

Por otro lado, se puede desear detectar diferencias entre uno o más grupos bajo estudio y un set combinado de grupos bajo estudio. Las pruebas t de a pares no sirven para eso. Sin embargo, existe un grupo de estadísticos multivariados que permiten sobrellevar estas limitaciones (**análisis de comparaciones múltiples**). Se debe usar alguno de estos estadísticos de comparaciones múltiples para detectar diferencias entre pares y entre grupos una vez que el ANOVA resultó significativo. Las pruebas más importantes de diferencias entre pares son las de Bonferroni, Sheffèe, Tukey, Newman-Keuls y Dunnett.

6.3.1. Test de mínima diferencia significativa de Fisher (MDS)

El MDS es una prueba de alta potencia ya que permite determinar el rango más estrecho de valores, de entre todas las de comparaciones múltiples. Es una de las menos conservativas y debe usarse para comparar un número bajo de medias. Esto se debe a que es una *prueba t modificada* y, por eso, vuelve a surgir la chance de cometer un error de Tipo I. Previo a aplicar el MDS, debe verificarse que existan diferencias significativas entre las medias usando la prueba F del ANOVA.

Para obtener el estadístico se emplea la siguiente expresión:

$$(6.9) \quad MDS = t_{\frac{\alpha}{2}, GLE} \sqrt{\frac{2 * MSE}{n}}$$

Donde: $t_{\alpha/2, GLE}$ es mayor a $\alpha/2$ % de puntos que obedecen la distribución t-Student con GLE grados de libertad; GLE : grados de libertad del residual obtenido en el ANOVA; n : cantidad de medidas realizadas.

Si un par de medias presenta una diferencia que supera al valor del MDS para un nivel de significación α , es entonces estadísticamente diferente.

6.3.2. Prueba de Tukey

En la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, se evalúa cada grupo experimental versus cada grupo control. Esta prueba es recomendable si existen tamaños grupales desiguales entre los grupos control y experimentales. Su metodología involucra primero en testear la diferencia entre pares más grande (Montgomery, 2013). Con tal fin, se emplea el estadístico q para establecer si las diferencias entre grupos son significativas. El q se calcula sustrayendo la media más pequeña respecto de la mayor, y luego dividiendo ese producto por el error estándar total de la media grupal (**Ec. 6.10**). El error estándar total grupal es un estadístico provisto por los programas estadísticos.

$$(6.10) \quad q_s = \frac{Y_A - Y_B}{ES}$$

Donde: Y_A es la mayor de las medias del par siendo comparadas, Y_B es la menor de las medias, y ES corresponde al error estándar de la suma de las medias (error estándar total).

El valor de q puede compararse con los valores en tablas para determinar si el q de un par particular supera el valor crítico para conseguir significancia. Si el valor de q calculado es igual o mayor al valor crítico, la diferencia de ese par es significativa.

Si la diferencia entre medias del primer par resultó significativa (lo cual es el caso si el ANOVA global dio significativo), entonces se somete al segundo par a la prueba. Las pruebas entre pares siguen hasta obtener un valor de q no significativo. Es importante señalar que la prueba de Tukey usa un estimador de α conservador. Esto permite evaluar todos los *contrastos como una familia*, en consecuencia, su potencia resulta menor para hallar diferencias entre pares. En este contexto, debe entenderse como familia a la tasa de error familiar. Este término da cuenta de la probabilidad de cometer un error de Tipo I (asunción falsa).

Las pruebas de tipo familiar reducen la chance de hacer falsas asunciones. Este tipo de pruebas debería usarse cuando las consecuencias de reportar una diferencia significativa falsa son mayores que las de no hallar diferencia entre pares.

En resumen, las ventajas de la metodología de Tukey son que evalúa todas las diferencias entre pares, es fácil de computar, y reduce las chances de cometer un error de Tipo I. Sus desventajas son su menor potencia y el hecho de que no sirve para evaluar comparaciones complejas.

6.4. Criterios para la comparación de modelos de regresión

La **raíz cuadrada de los cuadrados medios del error (RMSE)** es un criterio para la comparación de modelos, buscándose obtener el menor valor posible. Mide la desviación media entre los valores observados y los predichos por un modelo (**Ec. 6.11**).

$$(6.11) \quad RMSE = \sqrt{\frac{\sum(\mu_{observados} - \mu_{predichos})^2}{n}}$$

Existen otros criterios que no buscan que la raíz cuadrada de los cuadrados medios del error sea la menor posible, sino que la cantidad de parámetros del modelo sea la menor posible (principio de parsimonia), que el error estándar de los parámetros sea lo menor posible, y que los coeficientes estimados por el modelo no estén altamente relacionados entre sí.

Los **criterios de Akaike (AIC)** y el **Bayesiano (BIC)** se usan para determinar si hay sobreestimación por parte de los modelos. Según estos criterios similares, el modelo más parsimonioso y propicio es aquel con los menores valores de estos criterios (Quinn y Keough, 2002). Sin embargo, el de BIC es más conservador ya que su penalización de parámetros innecesarios es superior.

$$(6.12) \quad AIC = N \left[\ln \left(\frac{2\pi\sigma^2}{N} \right) + 1 \right] + 2$$

$$(6.13) \quad BIC = N \left[\ln \left(\frac{2\pi\sigma^2}{N} \right) + 1 \right] + P \times \ln(N)$$

En donde, N corresponde al número de observaciones; μ de la ecuación del RMSE es el valor respuesta; σ^2 es la varianza basada en los cuadrados medios del error (CM); SSE simboliza la suma de cuadrados residual; mientras que SST representa la suma de cuadrados total, y P es la cantidad de parámetros del modelo.

6.5. Regresión múltiple (RM) y metodología de superficies de respuesta (MSR)

La metodología de superficies de respuesta (MSR) es una técnica estadística ampliamente usada en el estudio de procesos complejos. La MSR permite analizar la relación entre una variable respuesta y varios factores relacionados. Aplicando la MSR, es posible establecer las condiciones óptimas o más deseables para un determinado proceso (**Fig. 6.1**). Cada factor implicado presenta un número de variables, es decir, el rango de valores para los cuales el factor es variable. Cuando esos niveles se combinan para todos los factores afectando la variable, se obtiene el número total de combinaciones de nivel (Reyes y col., 2005).

La optimización de procesos mediante MSR le permite a la industria alimenticia minimizar costos e incrementar las características deseables de un producto sin afectar su inocuidad. Las superficies de respuesta son determinadas matemáticamente mediante funciones de regresión. Sin embargo, como estas funciones pueden no conocerse o resultar muy complejas, es necesario aproximarlas empleando funciones más sencillas, tales como polinomios de segundo orden. La expresión correspondiente a un modelo polinómico de segundo orden es la siguiente (**Ec. 6.14**):

$$(6.14) \quad Y_i = \beta_0 + \sum_{\mu=1}^k \beta_{\mu} \times X_{\mu} + \sum_{\mu=1}^k \beta_{\mu\mu} \times X_{\mu}^2 + \sum_{\mu=1}^k \sum_{j=\mu+1}^k \beta_{\mu j} \times X_{\mu} X_j + \varepsilon_i$$

Siendo Y_i =valor de la variable respuesta; $X_{\mu j}$ =valores de las variables independientes ($\mu, j=1\dots k$); ε_i =error experimental en la corrida i ; β_0 =término constante; y β_{μ} , $\beta_{\mu\mu}$ y $\beta_{\mu j}$ = coeficientes regresionales.

Los parámetros β_{μ} , $\beta_{\mu\mu}$ y $\beta_{\mu j}$ son denominados coeficientes regresionales y son calculados mediante cuadrados mínimos.

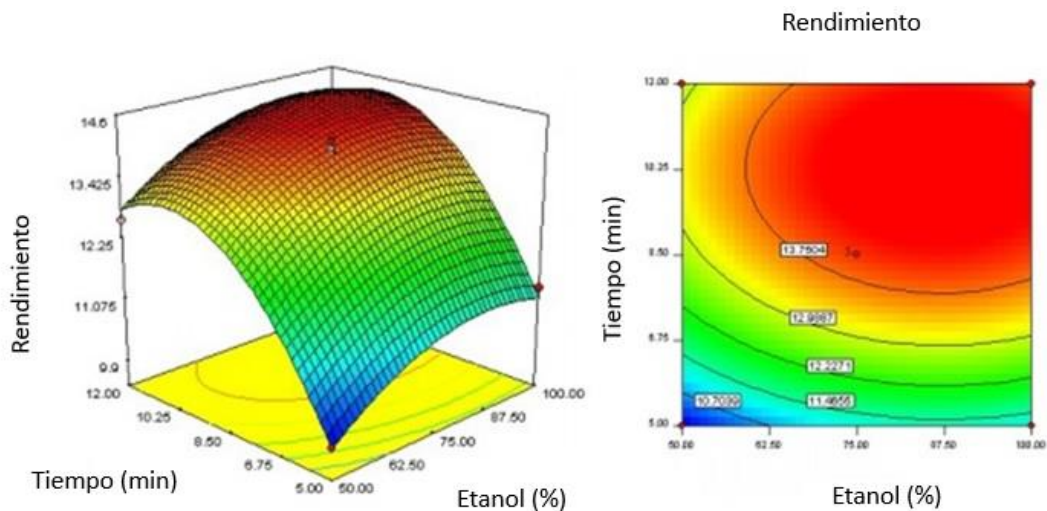


Figura 6.1. Ejemplo de gráfico de superficie de respuesta y gráfico de contorno en donde se visualiza el rendimiento de una extracción de según el porcentaje de etanol empleado (% Etanol) y el tiempo de extracción (min) (adaptado de Zhao y col., 2012).

6.6. Análisis multivariado

Consiste en un conjunto de metodologías apropiadas para describir situaciones en las que se cuenta con *dos o más variables respuesta* (V_j) para cada caso (individuo u observación). Por ejemplo, si se tienen dos variables aleatorias determinadas para cada individuo, es posible representar gráficamente esas mediciones bivariadas. Pero cuando se trata de tres o más variable, ya no resulta posible y se tornan relevantes las herramientas de reducción de la dimensión.

6.6.1. Análisis multivariado de la varianza (MANOVA)

El MANOVA evalúa la relación entre más de una variable dependiente cuantitativa Y en función de una o más variables independientes X determinadas sobre una misma unidad experimental. Su es establecer comparaciones de la respuesta multivariada entre los grupos. La hipótesis nula es que las medias de los distintos grupos de observaciones son idénticas, por lo que su rechazo permite concluir que estos grupos son diferentes, o que fueron generados por distintos procesos, o de que provienen de distintas poblaciones. Estas medias de los g grupos que son iguales en las p variables dependientes se llaman centroides, y pueden expresarse como g vectores. H_0 postula que todos los centroides son iguales entre sí:

$$\left. \begin{array}{l} H_0 : \left(\begin{array}{c} \mu_{11} \\ \mu_{12} \\ \mu_{13} \end{array} \right) = \left(\begin{array}{c} \mu_{21} \\ \mu_{22} \\ \mu_{23} \end{array} \right) = \left(\begin{array}{c} \mu_{31} \\ \mu_{32} \\ \mu_{33} \end{array} \right) \\ \underbrace{\hspace{1.5cm}}_{G1} \quad \underbrace{\hspace{1.5cm}}_{G2} \quad \underbrace{\hspace{1.5cm}}_{G3} \\ H_1 : \text{Al menos dos difieren} \end{array} \right\} \text{Que equivale a } H_0 : (v_1 = v_2 = v_3)$$

Figura 6.2. Matriz para la hipótesis nula en un MANOVA.

En donde, v_k son las medias de cada tratamiento en el conjunto multivariado.

Es importante señalar que, aunque existen cuatro estadísticos distintos (Shapiro-Wilks, Lawley-Hotelling, Pillai, raíz de Roy) para poder evaluar la significación en MANOVA, aquí se empleó el de Hotelling corregido por Bonferroni. Estos estadísticos están basados sobre dos matrices SCPC (suma de cuadrados y productos cruzados), que en muchos programas se muestran al efectuar la prueba de hipótesis:

- ❖ La mencionada matriz de H (hipótesis) vinculada con cada término, conocida como la matriz de sumas de cuadrados entre muestras.
- ❖ Una matriz de E (error) asociada con el error para la prueba estadística. Es la denominada matriz de sumas de cuadrados dentro de las muestras.

La desventaja de analizar información multivariada mediante el uso de múltiples ANOVA univariados es que aumenta la chance de incurrir en un error de Tipo I y la tasa de error global. Por lo tanto, resulta más adecuado analizarla mediante un MANOVA, que presenta una menor probabilidad de cometer error de Tipo I y permite evaluar las asociaciones entre las variables respuestas. Además, el MANOVA es capaz de detectar diferencias que no serían captadas mediante un ANOVA.

6.6.2. Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales (PCA) es una herramienta de reducción dimensional usada para reducir un gran set de variables a un set más pequeño, que aún retenga la mayor parte de la información presente en el set original. Consiste en un procedimiento matemático que transforma una cantidad de variables, posiblemente, correlacionadas en una cantidad menor de variables no correlacionadas conocidas como componentes principales (CP's).

La primera CP obtenida da cuenta de la mayor variabilidad presente en los datos como sea posible, y luego cada CP explica en el mayor grado posible la variabilidad remanente. El PCA reduce el espacio de los atributos de una elevada cantidad de variables

a una menor. Sin embargo, no existe garantía alguna de que las dimensiones obtenidas sean interpretables. Este es un hecho que muchas veces no es apreciado por investigadores con menos experiencia en estadística.

La meta del PCA es poder seleccionar un subconjunto de variables a partir del conjunto inicial, basándose en cuáles de las variables originales poseen las mayores correlaciones con la CP. En términos de álgebra vectorial, el PCA busca una combinación lineal de variables nuevas, que permitan extraer la mayor varianza posible a partir de las originales. Luego, procede a remover esta varianza y buscar una segunda combinación capaz de explicar la mayor proporción de la varianza restante, y así subsecuentemente. Esto se conoce como método del eje principal y resulta en la obtención de factores ortogonales (no correlacionados). Es importante recalcar que el PCA analiza la varianza total de los datos.

Las componentes extraídas reflejan tanto la varianza única como la compartida de las variables. Son combinaciones lineales (CL) de las p variables originales ponderadas según su contribución en explicar la varianza (autovector) de una dimensión ortogonal particular. La j -ésima CP se expresa en términos algebraicos como una CL de las p variables:

$$Y_j = e_j X = e_{1j} X_1 + e_{2j} X_2 + \dots + e_{pj} X_p$$

En la expresión de arriba $j= 1, \dots, p$; donde e_j representa el j -ésimo autovector. Cuanto mayor resulte el módulo del coeficiente del autovector, mayor es la contribución de esa variable en la CL para cada componente.

La proporción de la variabilidad explicada por cada CP está representada por los autovalores obtenidos (λ). La varianza de la j -ésima CP es igual a:

$$Var(Y_j) = e_j \times \sum e_j = \lambda_j$$

En donde el j -ésimo λ es el autovalor asociado al j -ésimo autovector.

6.6.3. Análisis de correspondencias (CA)

El análisis de correspondencias (CA) permite resumir grandes cantidades de información en un número reducido de factores o dimensiones. Cuando los datos a analizar tienen forma de tabla de contingencia y se evalúan las relaciones existentes entre dos variables, estamos en presencia de un análisis de correspondencias simple (SCA). En cambio, si se cuentan con dos o más variables nominales, se debe aplicar un análisis de correspondencias múltiple (MCA) (Greenacre, 2008).

El CA reduce los datos existentes en dos o tres dimensiones, donde sitúa las categorías de las variables analizadas y los individuos que forman parte del análisis. Con tal fin:

- ❖ Toma los n casos (individuos) como las filas de una tabla, en la cual cada una de sus columnas v_i es una variable analizada.
- ❖ Cada casillero de esa tabla puede ser considerarse un punto dotado de una masa obtenida a partir de su frecuencia.

El CA es muy similar al PCA, pero emplea variables cualitativas. Cuando se analizan dos o más variables cualitativas, cada una presenta una serie de valores nominales posibles o categorías. Un ejemplo de variable cualitativa/nominal podría ser género, en donde contamos con las categorías “Hombre” y “Mujer”.

El fin del CA consiste en generar un mapa de la posición relativa de las variables analizadas con cada uno de sus valores posibles. Se busca una posición que refleje el grado de asociación entre las mismas. Se busca representar cada uno de los valores posibles de cada variable en un plano en que la posición relativa de los puntos de cuenta del grado de asociación entre cada uno de los conceptos representados (Greenacre, 2008).

El CA posee autovalores (cantidad de varianza explicada) y coeficientes asociados a cada valor de cada variable cuantitativa (o sea, los autovectores), que representan el peso que cada uno de los mismos posee en la nueva dimensión (de menor tamaño que la original).

6.6.4. Análisis de conglomerados

El análisis de conglomerados es una técnica multivariante que se propone dividir un conjunto de objetos en grupos (clústeres) según su grado de similitud. Busca agrupar objetos de modo que los objetos perteneciente un mismo grupo sean muy parecidos entre sí, por lo que el grupo tendría cohesión interna. Por otro lado, se desea que los objetos pertenecientes a grupos distintos se porten diferente con respecto a las variables analizadas. En otras palabras, se busca que cada grupo esté aislado externamente del resto (De La Fuente, 2011).

Es una herramienta de tipo exploratoria debido a que no suele emplear un modelo estadístico a priori para clasificar los objetivos, siendo apropiado para extraer información de un conjunto de datos sin forzar restricciones previas. Por tal motivo, es una herramienta de elaboración de hipótesis útil.

No obstante, deben tomarse precauciones para no conseguir una disección de los datos en grupos artificiales generados por el procesamiento computacional que no reflejen una clasificación válida. En este sentido, es importante que el investigador conozca de cerca su problema para saber cuáles de grupos conseguidos resultan significativos.

Para aplicar el análisis de conglomerados, se deben establecer, en primer lugar, las variables y los objetos a clasificar. Después, se elige una medida de proximidad o de distancia entre los objetos que mida el grado de similitud entre cada par. Las medidas de proximidad (similitud) permiten medir el grado de semejanza entre dos objetos de forma que, cuanto mayor es su valor, mayor es su grado de similitud y los métodos de clasificación tenderán a reunirlos en el mismo grupo con mayor probabilidad. Las medidas de disimilitud (distancia) establecen la distancia entre dos objetos de modo que cuanto mayor sea su valor, más distintos son. Así, resulta menor la probabilidad de que los métodos clasificatorios los sitúen dentro del mismo grupo.

Existen distintos tipos de datos usados para obtener clasificaciones:

- ❖ De intervalo: se cuenta con una matriz de N objetos por p variables, en la que todas las variables son cuantitativas y medidas como intervalos/razones.
- ❖ Frecuencias: las variables son categóricas de modo que, por filas, hay objetos o categorías y, por columnas, las variables con sus distintas categorías. Dentro de la tabla, se cuenta entonces con frecuencias.
- ❖ Datos binarios: se tiene una matriz del tipo “objetos \times variables”, pero las variables son binarias. Un valor de “0” indica la ausencia de una característica, mientras que “1” su presencia.

Respecto a las medidas de disimilitud, la medida de distancia euclídea (d_{ij}) determina el nivel de similitud entre unidades de análisis evaluadas en un grupo de variables cuantitativas (métricas) **(Ec. 6.15)**.

$$(6.15) \quad d_{ij} = \sqrt{\sum_{k=1}^K (x_{ik} - x_{jk})^2}$$

Esta distancia acarrea el problema de qué depende de las escalas usadas para medir las distintas variables. Una solución posible es estandarizar los datos.

Para variables categóricas, existen en los programas estadísticos, medidas de distancia que no necesitan transformarlas en variables dicotómicas. Por ejemplo, se pueden usar distancias chi-cuadrado o phi-cuadrado. La distancia phi-cuadrado es calculada dividiendo la chi-cuadrado por la raíz cuadrada del total de observaciones.

En adición a las medidas de distancia, pueden emplearse una gran número de medidas de similitud. Para variables cuantitativas se suele aplicar el coeficiente de correlación de Pearson.

Obtenida la matriz de (di)similitud, se procede a usar un algoritmo de clasificación que permita agrupar a los objetos y variables parecidas entre sí (De La Fuente, 2011). Existen dos tipos de algoritmos clasificatorios:

- ❖ Jerárquicos: distancia mínima, distancia máxima, y distancia media.
- ❖ No jerárquicos (de partición): K-medias.

Para determinar la calidad o bondad de los agrupamientos, existen diferentes medidas. Una clase de medidas son las de calidad interna, que permiten la comparación de distintos clústeres sin la existencia de una referencia externa y es empleada como una medida de similitud general basada en la similitud de a pares entre los elementos de un clúster. Dentro de estos métodos de calidad interna para determinar la similitud entre entidades, se halla la correlación de los puntajes de las entidades sobre las dimensiones del agrupamiento denominada correlación cofenética (Saraçlı y col., 2013).

El coeficiente de correlación cofenética es una medida de qué tan confiablemente un dendrograma conserva las distancias pareadas entre los puntos de los datos originales sin modelar. Un coeficiente de correlación (CCC) cercano a 1 simboliza una resolución de alta calidad del agrupamiento generado en el análisis.

6.7. Análisis multivariado de la covarianza (MANCOVA)

El MANCOVA es una extensión del análisis de la covarianza en donde se tiene más de una variable dependiente y se requiere que haya cierto control de las variables independientes continuas. La ventaja que un diseño de tipo MANCOVA presenta sobre un simple MANOVA es que la consideración del ruido del error ha sido eliminada por la introducción del covariante (George y Mallery, 2016).

De modo parecido a las otras pruebas similares al ANOVA, el objetivo primario del MANCOVA es evaluar si existen diferencias significativas entre medias grupales. La parte del proceso que genera un covariante a partir de los datos muestrales, permite una disminución del término asociado al error (MS_{error}). De este modo, el estadístico de Lambda de Wilks (que representa la proporción entre la varianza del error y aquella del efecto) va a ser mayor y, posiblemente, resulte significativo. Esto permite contar con mayor potencia estadística para percibir diferencias entre los datos.

Las asunciones del MANCOVA son las siguientes:

- ❖ Normalidad.
- ❖ Independencia entre las observaciones.
- ❖ Homogeneidad de varianzas (homocedasticidad).
- ❖ Homogeneidad de covarianzas.



7. Referencias

7. Referencias

1. Abdelaali, S. B., Rodrigo, M. J., Saddoud, O., Zacarías, L., Hajlaoui, M. R., & Mars, M. (2018). Carotenoids and colour diversity of traditional and emerging Tunisian orange cultivars (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Scientia Horticulturae*, 227, 296-304.
2. Acevedo, B. A., Sgroppo, S. C., & Dellacassa, E. (2018). Effects of ultraviolet radiation on the microbiological, physicochemical, and sensory properties of Rangpur lime juice. *International Food Research Journal*, 25(3), 958-965.
3. Akusu, O. M., Kiin-Kabari, D. B., & Ebere, C. O. (2016). Quality characteristics of orange/pineapple fruit juice blends. *American Journal of Food Science and Technology*, 4(2), 43-47.
4. Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
5. Alberini, F., Simmons, M. J., Parker, D. J., & Koutchma, T. (2015). Validation of hydrodynamic and microbial inactivation models for UV-C treatment of milk in a swirl-tube 'SurePure Turbulator™'. *Journal of Food Engineering*, 162, 63-69.
6. Alvarado, J. D. (1993). Viscosidad y energía de activación de jugos filtrados. *Revista española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 33(1), 87-93.
7. Alves-Filho, E. G., Silva, L. M. A., de Brito, E. S., Wurlitzer, N. J., Fernandes, F. A., Rabelo, M. C., & Rodrigues, S. (2018). Evaluation of thermal and non-thermal processing effect on non-prebiotic and prebiotic acerola juices using 1H qNMR and GC-MS coupled to chemometrics. *Food Chemistry*, 265, 23-31.
8. Alzamora, S. M., Guerrero, S., Viollaz, P. E., & Welte-Chanes, J. (2004). Experimental protocols for modeling the response of microbial populations exposed to emerging technologies: Some points of concern. En G. Barbosa-Cánovas, *Novel food processing technologies* (pp. 613-630). Florida, Estados Unidos: CRC Press.
9. Alzamora, S. M., Guerrero, S. N., López-Malo, A., Welte-Chanes, J., Palou, E., Argai, A., & Tapia, M. S. (2005). Combined preservation techniques for fresh fruit. En W. Jongen (Ed.), *Improving the safety of fresh fruit and vegetables* (pp. 599-630). Cambridge, Reino Unido: Woodhead Publishing.
10. Alzamora, S. M., Guerrero, S. N., López-Malo, A., Palou, E., Char, C. D., & Raffellini, S. (2010). Models for microorganism inactivation: application in food preservation design. En E. Ortega-Rivas (Ed.), *Processing effects on safety and quality of foods* (pp. 87-115). Florida, Estados Unidos: CRC Press.

11. Alzamora, S. M., López-Malo, A., Guerrero, S. N., & Tapia, M. S. (2016.a). The hurdle concept in fruit processing. En A. Rosenthal, R. Deliza, G. Barbosa-Cánovas, & J. Welti-Chanes (Eds.), *Fruit Preservation* (pp. 93-126). Nueva York, Estados Unidos: Springer.
12. Alzamora, S. M., Guerrero, S. N., Raffellini, S., Ferrario, M., & Schenk, M. (2016.b). Hurdle technology in fruit processing. En S. Pareek (Ed.), *Fresh-Cut Fruits and Vegetables* (pp. 131-168). Florida, Estados Unidos: CRC Press.
13. Ananta, E., Heinz, V., & Knorr, D. (2004). Assessment of high pressure induced damage on *Lactobacillus rhamnosus* GG by flow cytometry. *Food Microbiology*, *21*(5), 567-577.
14. Ananta, E., & Knorr, D. (2009). Comparison of inactivation pathways of thermal or high pressure inactivated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 by flow cytometry analysis. *Food Microbiology*, *26*(5), 542-546.
15. Anderson, J. G., Rowan, N. J., MacGregor, S. J., Fouracre, R. A., & Farish, O. (2000). Inactivation of food-borne enteropathogenic bacteria and spoilage fungi using pulsed-light. *IEEE Transactions on Plasma Science*, *28*(1), 83-88.
16. Aneja, K. R., Dhiman, R., Aggarwal, N. K., Kumar, V., & Kaur, M. (2014). Microbes associated with freshly prepared juices of citrus and carrots. *International Journal of Food Science*, 2014.
17. Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, *127*(1), 183-198.
18. Antonio-Gutiérrez, O. T., López-Díaz, A. S., López-Malo, A., Palou, E., & Ramírez-Corona, N. (2019.a). UV-C Light for Processing Beverages: Principles, Applications, and Future Trends. En A. Grumezescu & A.M. Holban (Eds.), *Processing and Sustainability of Beverages* (pp. 205-234). Cambridge, Reino Unido: Woodhead Publishing.
19. Antonio-Gutiérrez, O., López-Díaz, A., Palou, E., López-Malo, A., & Ramírez-Corona, N. (2019.b). Characterization and effectiveness of short-wave ultraviolet irradiation reactors operating in continuous recirculation mode to inactivate *Saccharomyces cerevisiae* in grape juice. *Journal of Food Engineering*, *241*, 88-96.
20. Ares, G., Giménez, A., & Gámbaro, A. (2009). Consumer perceived healthiness and willingness to try functional milk desserts. Influence of ingredient, ingredient name and health claim. *Food Quality and Preference*, *20*(1), 50-56.

21. Ares, G., Tárrega, A., Izquierdo, L., & Jaeger, S. R. (2014). Investigation of the number of consumers necessary to obtain stable sample and descriptor configurations from check-all-that-apply (CATA) questions. *Food Quality and Preference*, *31*, 135-141.
22. Arias, C. R., Burns, J. K., Friedrich, L. M., Goodrich, R. M., & Parish, M. E. (2002). Yeast species associated with orange juice: evaluation of different identification methods. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(4), 1955-1961.
23. Artés, F. & Allende, A. (2014). Minimal processing of fresh fruit, vegetables, and juices. En Da-Wen Sun (Ed.), *Emerging technologies for food processing* (pp. 583-597). San Diego, Estados Unidos: Academic Press.
24. Aschoff, J. K., Kaufmann, S., Kalkan, O., Neidhart, S., Carle, R., & Schweiggert, R. M. (2015). In vitro bioaccessibility of carotenoids, flavonoids, and vitamin C from differently processed oranges and orange juices [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(2), 578-587.
25. Ávila, J. M., Beltrán, B., Cuadrado, C., Del Pozo, S., Rodríguez, M. V., & Ruiz, E. (2009). La alimentación española: Características nutricionales de los principales alimentos de nuestra dieta. Madrid, España: Fundación Española de la Nutrición (FEN).
26. Badarinath, A. V., Rao, K. M., Chetty, C. M. S., Ramkanth, S. T. V. S. R., Rajan, T. V. S., & Gnanaprakash, K. (2010). A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *International Journal of PharmTech Research*, *2*(2), 1276-1285.
27. Baron, F., & Brulé, G. (2016). Food safety control. En R. Jeantet, T. Congruennec, P. Schuck, & G. Brulé (Eds.), *Handbook of Food Science and Technology 1: Food Alteration and Food Quality* (pp. 195-204). Nueva Jersey, Estados Unidos: John Wiley & Sons.
28. Barrera, I. C. S., & Hernández, W. A. (2010). Análisis sensorial en carne. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, *23*(2), 227-239.
29. Baysal, A. H., Molva, C., & Unluturk, S. (2013). UV-C light inactivation and modeling kinetics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in white grape and apple juices. *International journal of food microbiology*, *166*(3), 494-498.
30. Beck, S. E., Ryu, H., Boczek, L. A., Cashdollar, J. L., Jeanis, K. M., Rosenblum, J. S., & Linden, K. G. (2017). Evaluating UV-C LED disinfection performance and investigating potential dual-wavelength synergy. *Water Research*, *109*, 207-216.

31. Berdejo, D., Pagán, E., García-Gonzalo, D., & Pagán, R. (2019). Exploiting the synergism among physical and chemical processes for improving food safety. *Current Opinion in Food Science*, *30*, 14-20.
32. Bermúdez-Aguirre, D., Guerrero-Beltrán, J. Á., Barbosa-Cánovas, G. V., & Welti-Chanes, J. (2011). Study of the inactivation of *Escherichia coli* and pectin methylesterase in mango nectar under selected high hydrostatic pressure treatments. *Food Science and Technology International*, *17*(6), 541-547.
33. Beuchat, L. R. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*, *4*(4), 413-423.
34. Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2010). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of eugenol, limonene, and citrus extract against bacteria and yeasts, representative of the spoiling microflora of fruit juices. *Journal of Food Protection*, *73*(5), 888-894.
35. Bhat, R., & Stamminger, R. (2015). Impact of ultraviolet radiation treatments on the physicochemical properties, antioxidants, enzyme activity and microbial load in freshly prepared hand pressed strawberry juice. *Food Science and Technology International*, *21*(5), 354-363.
36. Bhattacharjee, C., Saxena, V. K., & Dutta, S. (2019). Novel thermal and non thermal processing of watermelon juice. *Trends in Food Science & Technology*, *93*, 234-234.
37. Bhullar, M. S., Patras, A., Kilanzo-Nthenge, A., Pokharel, B., Yannam, S. K., Rakariyatham, K., Pan, C., Xiao, H., & Sasges, M. (2018). Microbial inactivation and cytotoxicity evaluation of UV irradiated coconut water in a novel continuous flow spiral reactor. *Food Research International*, *103*, 59-67.
38. Bolondi, A., Gaggino, O., & Monesiglio, J. (1995). Microscopía electrónica. Técnicas generales, C.I.C.V., INTA, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, República Argentina. INTA Editorial.
39. Bolton, J. R., Bircher, K. G., Tumas, W., & Tolman, C. A. (2001). Figures-of-merit for the technical development and application of advanced oxidation technologies for both electric-and solar-driven systems (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, *73*(4), 627-637.
40. Bolton, J. R., & Linden, K. G. (2003). Standardization of methods for fluence (UV dose) determination in bench-scale UV experiments. *Journal of Environmental Engineering*, *129*(3), 209-215.

41. Bolton, J. R. (2010). *Ultraviolet applications handbook*. Ontario, Canadá: Bolton Photosciences Incorporated.
42. Bolton, J. R., & Cotton, C. A. (2011). *The ultraviolet disinfection handbook*. American Water Works Association.
43. Breeuwer, P., Drocourt, J., Rombouts, F. M., & Abee, T. (1996). A novel method for continuous determination of the intracellular pH in bacteria with the internally conjugated fluorescent probe 5 (and 6)-carboxyfluorescein succinimidyl ester. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(1), 178-183.
44. Bruzzone, F., Vidal, L., Antúnez, L., Giménez, A., Deliza, R., & Ares, G. (2015). Comparison of intensity scales and CATA questions in new product development: Sensory characterisation and directions for product reformulation of milk desserts. *Food Quality and Preference*, *44*, 183-193.
45. Buniowska, M., Carbonell-Capella, J. M., Frigola, A., & Esteve, M. J. (2017). Bioaccessibility of bioactive compounds after non-thermal processing of an exotic fruit juice blend sweetened with *Stevia rebaudiana*. *Food Chemistry*, *221*, 1834-1842.
46. Bunthof, C. J., Bloemen, K., Breeuwer, P., Rombouts, F. M., & Abee, T. (2001). Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, *67*(5), 2326-2335.
47. Caminiti, I. M., Noci, F., Morgan, D. J., Cronin, D. A., & Lyng, J. G. (2012). The effect of pulsed electric fields, ultraviolet light or high intensity light pulses in combination with manothermosonication on selected physico-chemical and sensory attributes of an orange and carrot juice blend. *Food and Bioprocess Processing*, *90*(3), 442-448.
48. Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Grimi, N., Vorobiev, E., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2016). Changes of antioxidant compounds in a fruit juice-*Stevia rebaudiana* blend processed by pulsed electric technologies and ultrasound. *Food and Bioprocess Technology*, *9*(7), 1159-1168.
49. Carunchia, M., Wang, L., & Han, J. H. (2015). The use of antioxidants in the preservation of snack foods. En F. Shahidi (Ed.), *Handbook of Antioxidants for Food Preservation* (pp. 447-474). Cambridge, Reino Unido: Woodhead Publishing.
50. Castro-Ibáñez, I., Gil, M. I., Tudela, J. A., & Allende, A. (2015). Microbial safety considerations of flooding in primary production of leafy greens: a case study. *Food Research International*, *68*, 62-69.
51. Cayuela, L. (2014). Modelos lineales: Regresión, ANOVA y ANCOVA. *Eco Lab, Centro Andaluz de Medio Ambiente, Universidad de Granada. Notas de clase*, 1-57.

52. Cebrián, G., Mañas, P., & Condón, S. (2016). Comparative resistance of bacterial foodborne pathogens to non-thermal technologies for food preservation. *Frontiers in Microbiology*, 7, 734.
53. Char, C., Guerrero, S. & Alzamora, S. M. (2009). Survival of *Listeria innocua* in thermally processed orange juice as affected by vanillin addition. *Food Control*, 20, 67-74.
54. Char, C.; Guerrero, S.; & Alzamora, S.M. (2010.a). Mild thermal process combined with vanillin plus citral to help shorten the inactivation time for *Listeria innocua* in orange juice. *Food and Bioprocess Technology*, 3(6), 752–761.
55. Char, C., Mitilinaki, E., Guerrero, S. N., & Alzamora, S. M. (2010.b). Use of high-intensity ultrasound and UV-C light to inactivate some microorganisms in fruit juices. *Food and Bioprocess Technology*, 3(6), 797-803.
56. Char, C., Yoplac, I., & Escalona, V. H. (2017). Microbiological and Functional Quality of Ready-to-Eat Arugula as Treated by Combinations of UV-C and Nonconventional Modified Atmospheres. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(3), e12978.
57. Chatterjee, T., Chatterjee, B. K., Majumdar, D., & Chakrabarti, P. (2015). Antibacterial effect of silver nanoparticles and the modeling of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850(2), 299-306.
58. Cheigh, C. I., Hwang, H. J., & Chung, M. S. (2013). Intense pulsed light (IPL) and UV-C treatments for inactivating *Listeria monocytogenes* on solid medium and seafoods. *Food Research International*, 54(1), 745-752.
59. Chen, Y., Yu, L. J., & Rupasinghe, H. V. (2013). Effect of thermal and non-thermal pasteurisation on the microbial inactivation and phenolic degradation in fruit juice: a mini-review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(5), 981-986.
60. Chia, S. L., Rosnah, S., Noranizan, M. A., & WD, W. R. (2012). The effect of storage on the quality attributes of ultraviolet-irradiated and thermally pasteurised pineapple juices. *International Food Research Journal*, 19(3), 1001-1010.
61. Choudhary, R., & Bandla, S. (2012). Ultraviolet pasteurization for food industry. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, 2(1), 12-15.
62. Coroller, L., Leguérinel, I., Mettler, E., Savy, N., & Mafart, P. (2006). General model, based on two mixed Weibull distributions of bacterial resistance, for describing

- various shapes of inactivation curves. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), 6493-6502.
63. Corredig, M., Kerr, W., & Wicker, L. (2001). Particle size distribution of orange juice cloud after addition of sensitized pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2523-2526.
64. Cruz-Cansino, N. D. S., Reyes-Hernández, I., Delgado-Olivares, L., Jaramillo-Bustos, D. P., Ariza-Ortega, J. A., & Ramírez-Moreno, E. (2016). Effect of ultrasound on survival and growth of *Escherichia coli* in cactus pear juice during storage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 431-437.
65. Danyluk, M. D., & Schaffner, D. W. (2011). Quantitative assessment of the microbial risk of leafy greens from farm to consumption: preliminary framework, data, and risk estimates. *Journal of Food Protection*, 74(5), 700-708.
66. Danyluk, M. D., Goodrich-Schneider, R. M., Schneider, K. R., Harris, L. J., & Worobo, R. W. (2012). Outbreaks of foodborne disease associated with fruit and vegetable juices, 1922–2010. EDIS Publication FSHN12-04.
67. De La Fuente, S. (2011). *Análisis conglomerados*. Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales, Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Madrid, España.
68. De Matos, A. D., Magli, M., Marangon, M., Curioni, A., Pasini, G., & Vincenzi, S. (2018). Use of verjuice as an acidic salad seasoning ingredient: evaluation by consumers' liking and Check-All-That-Apply. *European Food Research and Technology*, 244(12), 2117-2125.
69. Dede, S., Alpas, H., & Bayındırlı, A. (2007). High hydrostatic pressure treatment and storage of carrot and tomato juices: Antioxidant activity and microbial safety. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(5), 773-782.
70. Demir, H., Yıldız, M. K., Becerikli, İ., Unluturk, S., & Kaya, Z. (2019). Assessing the impact of non-thermal and thermal treatment on the shelf-life of onion juice. *Czech Journal of Food Sciences*, 36(6), 480-486.
71. Díaz, M., Herrero, M., García, L. A., & Quirós, C. (2010). Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, 48(3), 385-407.
72. Diffey, B. L. (2002). Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*, 28(1), 4-13.
73. Dooley, L., Lee, Y. S., & Meullenet, J. F. (2010). The application of check-all-that-apply (CATA) consumer profiling to preference mapping of vanilla ice cream and its

- comparison to classical external preference mapping. *Food Quality and Preference*, 21(4), 394-401.
74. Drake, M. A. (2007). Invited review: Sensory analysis of dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 90(11), 4925-4937.
75. Dufort, E. L., Sogin, J., Etzel, M. R., & Ingham, B. H. (2017). Inactivation Kinetics of Pathogens during Thermal Processing in Acidified Broth and Tomato Purée (pH 4.5). *Journal of Food Protection*, 80(12), 2014-2021.
76. Echeverría, G., & López, M. L. (2014). Assessing juice quality: analysis of organoleptic properties of fruit juices. En V. Falguera (Ed.), *Juice Processing* (pp. 156-169). Florida, Estados Unidos: CRC Press.
77. Egerton, R. F. (2016). *Physical principles of electron microscopy*, Nueva York, Estados Unidos: Springer.
78. Endrizzi, I., Torri, L., Corollaro, M. L., Demattè, M. L., Aprea, E., Charles, M., ... & Gasperi, F. (2015). A conjoint study on apple acceptability: Sensory characteristics and nutritional information. *Food Quality and Preference*, 40, 39-48.
79. Falguera, V., Pagán, J., & Ibarz, A. (2011). Effect of UV irradiation on enzymatic activities and physicochemical properties of apple juices from different varieties. *LWT-Food Science and Technology*, 44(1), 115-119.
80. Farnworth, E. R., Lagace, M., Couture, R., Yaylayan, V., & Stewart, B. (2001). Thermal processing, storage conditions, and the composition and physical properties of orange juice. *Food Research International*, 34(1), 25-30.
81. Federación Argentina del Citrus (FEDERCITRUS). (2018). La actividad cítrica argentina. Recuperado de: <https://www.federcitrus.org/wp-content/uploads/2018/05/Actividad-Citricola-2018.pdf>.
82. Feng, M., Ghafoor, K., Seo, B., Yang, K., & Park, J. (2013). Effects of ultraviolet-C treatment in Teflon®-coil on microbial populations and physico-chemical characteristics of watermelon juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 133-139.
83. Feroz, F., Senjuti, J. D., & Noor, R. (2013). Determination of microbial growth and survival in salad vegetables through in vitro challenge test. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 2(6), 312-319.

84. Ferrante, S., Guerrero, S., & Alzamora, S. M. (2007). Combined use of ultrasound and natural antimicrobials to inactivate *Listeria monocytogenes* in orange juice. *Journal of Food Protection*, 70(8), 1850-1856.
85. Ferrario, M., Alzamora, S. M., & Guerrero, S. (2013). Inactivation kinetics of some microorganisms in apple, melon, orange and strawberry juices by high intensity light pulses. *Journal of Food Engineering*, 118(3), 302-311.
86. Ferrario, M., Alzamora, S. M., & Guerrero, S. (2015). Study of pulsed light inactivation and growth dynamics during storage of *Escherichia coli* ATCC 35218, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Salmonella* Enteritidis MA 44 and *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 and native flora in apple, orange and strawberry juices. *International journal of food science & technology*, 50(11), 2498-2507.
87. Ferrario, M., Alzamora, S. M., & Guerrero, S. (2015). Study of the inactivation of spoilage microorganisms in apple juice by pulsed light and ultrasound. *Food Microbiology*, 46, 635-642.
88. Ferrario, M., & Guerrero, S. (2016). Effect of a continuous flow-through pulsed light system combined with ultrasound on microbial survivability, color and sensory shelf life of apple juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 34, 214-224.
89. Ferrario, M., Guerrero, S., & Char, C. (2017). Optimisation of minimal processing variables to preserve the functional quality and colour of carrot juice by means of the response surface methodology. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(4), 864-871.
90. Ferrario, M. I., & Guerrero, S. N. (2018). Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* ATCC 49025 spores in apple juice by pulsed light. Influence of initial contamination and required reduction levels. *Revista Argentina de microbiologia*, 50(1), 3-11.
91. Ferrario, M., Schenk, M., García-Carrillo, M., & Guerrero, S. (2018). Development and quality assessment of a turbid carrot-orange juice blend processed by UV-C light assisted by mild heat and addition of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) extract. *Food Chemistry*, 269, 567-576.
92. Flores-Cervantes, D. X., Palou, E., & López-Malo, A. (2013). Efficacy of individual and combined UVC light and food antimicrobial treatments to inactivate *Aspergillus flavus* or *A. niger* spores in peach nectar. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 244-252.

93. Forney, L. J., Pierson, J. A., & Ye, Z. (2004). Juice irradiation with Taylor-Couette flow: UV inactivation of *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 67(11), 2410-2415.
94. Franz, C. M., Specht, I., Cho, G. S., Graef, V., & Stahl, M. R. (2009). UV-C-inactivation of microorganisms in naturally cloudy apple juice using novel inactivation equipment based on Dean vortex technology. *Food Control*, 20(12), 1103-1107.
95. Frei, B., Birlouez-Aragon, I., & Lykkesfeldt, J. (2012). Authors' perspective: What is the optimum intake of vitamin C in humans? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(9), 815-829.
96. Fundación Española de la Nutrición (FEN). (2010). Valor Nutricional de las Naranjas y Clementinas. Recuperado de: <https://www.fen.org.es/storage/app/media/imgPublicaciones/432011819.pdf>.
97. Fundo, J. F., Miller, F. A., Mandro, G. F., Tremarin, A., Brandao, T. R., & Silva, C. L. (2019). UV-C light processing of Cantaloupe melon juice: Evaluation of the impact on microbiological, and some quality characteristics, during refrigerated storage. *LWT- Food Science and Technology*, 103, 247-252.
98. Gabriel, A. A. (2012). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and spoilage yeasts in germicidal UV-C-irradiated and heat-treated clear apple juice. *Food Control*, 25(2), 425-432.
99. Gabriel, A. A., Vera, D. D., Lazo, O. M. Y., Azarcon, V. B., De Ocampo, C. G., Marasigan, J. C., & Sandel, G. T. (2017). Ultraviolet-C inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Salmonella enterica* in liquid egg white. *Food Control*, 73, 1303-1309.
100. Gama, J. J., & Sylos, C. M. (2005). Major carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice: identification and quantification by HPLC. *Food Research International*, 38(8-9), 899-903.
101. García-Guzmán, J. J., Hernández-Artiga, M. P., de León, L. P. P., & Bellido-Milla, D. (2015). Selective methods for polyphenols and sulphur dioxide determination in wines. *Food Chemistry*, 182, 47-54.
102. García-Loredo, A. B., Guerrero, S. N., & Alzamora, S. M. (2015). Inactivation kinetics and growth dynamics during cold storage of *Escherichia coli* ATCC 11229, *Listeria innocua* ATCC 33090 and *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 in peach juice using aqueous ozone. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 29, 271-279.

103. Gayán, E., Monfort, S., Álvarez, I., & Condón, S. (2011). UV-C inactivation of *Escherichia coli* at different temperatures. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12 (4), 531-541.
104. Gayán, E., Serrano, M. J., Monfort, S., Álvarez, I., & Condón, S. (2012.a). Combining ultraviolet light and mild temperatures for the inactivation of *Escherichia coli* in orange juice. *Journal of Food Engineering*, 113(4), 598-605.
105. Gayán, E., Serrano, M. J., Raso, J., Álvarez, I., & Condón, S. (2012.b). Inactivation of *Salmonella enterica* by UV-C light alone and in combination with mild temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23), 8353-8361.
106. Gayán, E., Serrano, M. J., Monfort, S., Álvarez, I., & Condón, S. (2013.a). Pasteurization of apple juice contaminated with *Escherichia coli* by a combined UV-mild temperature treatment. *Food and Bioprocess Technology*, 6(11), 3006-3016.
107. Gayán, E., Mañas, P., Álvarez, I., & Condón, S. (2013.b). Mechanism of the synergistic inactivation of *Escherichia coli* by UV-C light at mild temperatures. *Applied and environmental microbiology*, 79(14), 4465-4473.
108. Gayán, E., Condón, S., & Álvarez, I. (2014.a). Biological aspects in food preservation by ultraviolet light: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 7(1), 1-20.
109. Gayán, E., García-Gonzalo, D., Álvarez, I., & Condón, S. (2014.b). Resistance of *Staphylococcus aureus* to UV-C light and combined UV-heat treatments at mild temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 30-39.
110. Gayán, E., Serrano, M. J., Álvarez, I., & Condón, S. (2016). Modeling optimal process conditions for UV-heat inactivation of foodborne pathogens in liquid foods. *Food Microbiology*, 60, 13-20.
111. Geeraerd, A. H., Herremans, C. H., & Van Impe, J. F. (2000). Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 59(3), 185-209.
112. George, D., & Mallery, P. (2016). General Linear Models: MANOVA and MANCOVA. En D. George y P. Mallery (Eds.), *IBM SPSS Statistics 23 Step by Step* (pp. 310-324). Abingdon, Reino Unido: Routledge.
113. Godfrey, S. A. C., & Marshall, J. W. (2002). Identification of cold-tolerant *Pseudomonas viridiflava* and *P. marginalis* causing severe carrot postharvest bacterial soft rot during refrigerated export from New Zealand. *Plant Pathology*, 51(2), 155-162.

114. Gogo, E. O., Opiyo, A. M., Hassenberg, K., Ulrichs, C., & Huyskens-Keil, S. (2017). Postharvest UV-C treatment for extending shelf life and improving nutritional quality of African indigenous leafy vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 129, 107-117.
115. Gonzales-Barron, U. A. G. (2012). Modeling thermal microbial inactivation kinetics. En Da Wen-Sun (Ed.), *Thermal Food Processing: New Technologies and Quality Issues* (pp. 151-190). Florida, Estados Unidos: CRC Press.
116. Gopal, K. R., Kalla, A. M., & Srikanth, K. (2017). High pressure processing of fruits and vegetable products: A review. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, 5(5), 680-692.
117. Gopisetty, V. V. S., Patras, A., Kilonzo-Nthenge, A., Yannam, S., Bansode, R. R., Sasges, M., Mallory-Burns, S., Vergne, M.J., Pan, C., & Xiao, H. (2018). Impact of UV-C irradiation on the quality, safety, and cytotoxicity of cranberry-flavored water using a novel continuous flow UV system. *LWT- Food Science & Technology*, 95, 230-239.
118. Gopisetty, V. V. S., Patras, A., Pendyala, B., Kilonzo-Nthenge, A., Ravi, R., Pokharel, B. & Sasges, M. (2019). UV-C irradiation as an alternative treatment technique: Study of its effect on microbial inactivation, cytotoxicity, and sensory properties in cranberry-flavored water. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 52, 66-74.
119. Gorris, L. G. (2005). Food safety objective: an integral part of food chain management. *Food Control*, 16(9), 801-809.
120. Gouma, M., Gayán, E., Raso, J., Condón, S., & Álvarez, I. (2015). Inactivation of spoilage yeasts in apple juice by UV-C light and in combination with mild heat. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 32, 146-155.
121. Granato, D., & Masson, M. L. (2010). Instrumental color and sensory acceptance of soy-based emulsions: a response surface approach. *Food Science and Technology*, 30(4), 1090-1096.
122. Granato, D., Santos, J. S., Maciel, L. G., & Nunes, D. S. (2016). Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80, 266-279.
123. Greenacre, M. (2008). *La práctica del análisis de correspondencias*. Fundación BBVA.

124. Guerrero, S., López-Malo, A., & Alzamora, S. M. (2001). Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2(1), 31-39.
125. Guerrero, S., Alzamora, S. M., & Ferrario, M. (2016). The use of pulsed light technology in a hurdle preservation strategy. En G. Pataro & J. Lyng (Eds.), *High intensity pulsed light in processing and preservation of foods* (pp. 205-24). Nueva York, Estados Unidos: Nova Publishers Inc.
126. Guerrero, S. N., Ferrario, M., Schenk, M., & García-Carrillo, M. (2017). Hurdle technology using ultrasound for food preservation. En D. Bermúdez-Aguirre (Ed.), *Ultrasound: advances for food processing and preservation* (pp. 39-99). Cambridge, Estados Unidos: Academic Press.
127. Guerrero-Beltrán, J. A., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2004). Advantages and limitations on processing foods by UV light. *Food Science and Technology International*, 10(3), 137-147.
128. Guerrero-Beltrán, J. A., Barbosa-Canovas, G. V., & Welte-Chanes, J. (2011). High hydrostatic pressure effect on natural microflora, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, and *Listeria Innocua* in navel orange juice. *International Journal of Food Engineering*, 7(1).
129. Gunter-Ward, D. M., Patras, A., S. Bhullar, M., Kilonzo-Nthenge, A., Pokharel, B., & Sasges, M. (2018). Efficacy of ultraviolet (UV-C) light in reducing foodborne pathogens and model viruses in skim milk. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(2), e13485.
130. Guo, M., Huang, J., Hu, H., Liu, W., & Yang, J. (2012). UV inactivation and characteristics after photoreactivation of *Escherichia coli* with plasmid: health safety concern about UV disinfection. *Water Research*, 46(13), 4031-4036.
131. Gupta, S. D., & Agarwal, A. (2017). Artificial Lighting System for Plant Growth and Development: Chronological Advancement, Working Principles, and Comparative Assessment. En S.D. Gupta (Ed.), *Light Emitting Diodes for Agriculture* (pp. 1-25). Singapur: Springer.
132. Gurtler, J. B., Rivera, R. B., Zhang, H. Q., & Geveke, D. J. (2010). Selection of surrogate bacteria in place of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium for pulsed electric field treatment of orange juice. *International Journal of Food Microbiology*, 139(1-2), 1-8.

133. Gutiérrez, D. R., Char, C., Escalona, V. H., Chaves, A. R., & Rodríguez, S. D. C. (2015). Application of UV-C Radiation in the Conservation of Minimally Processed Rocket (*Eruca sativa* Mill.). *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 3117-3127.
134. Hajmeer, M., Ceylan, E., Marsden, J. L., & Fung, D. Y. (2006). Impact of sodium chloride on *Escherichia coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus* analysed using transmission electron microscopy. *Food Microbiology*, 23(5), 446-452.
135. Halim, H., Noranizan, M., Sobhi, B., Sew, C. C., Karim, R., & Osman, A. (2012). Nonthermal pasteurization of Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) juice using the hurdle concept. *International Food Research Journal*, 19(4).
136. Heiman, K. E., Mody, R. K., Johnson, S. D., Griffin, P. M., & Gould, L. H. (2015). *Escherichia coli* O157 outbreaks in the United States, 2003-2012. *Emerging Infectious Diseases*, 21(8), 1293.
137. Henning, S. M., Yang, J., Shao, P., Lee, R. P., Huang, J., Ly, A., & Li, Z. (2017). Health benefit of vegetable/fruit juice-based diet: Role of microbiome. *Scientific Reports*, 7(1), 2167.
138. Hilton, S. T., De Moraes, J. O., & Moraru, C. I. (2017). Effect of sublethal temperatures on pulsed light inactivation of bacteria. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 39, 49-54.
139. Hoagland, L., Ximenes, E., Ku, S., & Ladisch, M. (2018). Foodborne pathogens in horticultural production systems: Ecology and mitigation. *Scientia Horticulturae*, 236, 192-206.
140. Hossain, M. S., Norulaini, N. N., Banana, A. A., Zulhairi, A. M., Naim, A. A., & Omar, A. M. (2016). Modeling the supercritical carbon dioxide inactivation of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* in human body fluids clinical waste. *Chemical Engineering Journal*, 296, 173-181.
141. HPA (Health Protection Agency) (2009). Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods. London. Recuperado de: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/363146/Guidelines_for_assessing_the_microbiological_safety_of_ready-to-eat_foods_on_the_market.pdf
142. Hu, M., & Gurtler, J. B. (2017). Selection of surrogate bacteria for use in food safety challenge studies: a review. *Journal of Food Protection*, 80(9), 1506-1536.

143. Hu, X., Geng, S., Wang, X., & Hu, C. (2012). Inactivation and photorepair of enteric pathogenic microorganisms with ultraviolet irradiation. *Environmental Engineering Science*, 29(6), 549-553.
144. Huang, X. X., Urosevic, N., & Inglis, T. J. (2018). Accelerated detection of Gram-negative bacteria in blood culture by enhanced acoustic flow cytometry (AFC) following peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA-FISH). *BioRxiv*, 370171.
145. INDEC: Encuesta Nacional de Factores de Riesgo. (2018). Recuperado de: https://www.indec.gov.ar/ftp/cuadros/publicaciones/enfr_2018_resultados_preliminares.pdf.
146. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). (2012). Manual de producción de zanahoria. Recuperado de: <https://inta.gov.ar/documentos/manual-de-produccion-de-zanahoria>.
147. ISO 8589:1988. *Sensory analysis: General guidance for the design of test rooms*.
148. Jaffe, R., & Mani, J. (2018). Polyphenolics Evoke Healing Responses: Clinical Evidence and Role of Predictive Biomarkers. En R. R. Watson, V. R. Preedy & S. Zibardi (Eds.), *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease* (pp. 403-413). Cambridge, Estados Unidos: Academic Press.
149. Jenny, R. M., Simmons III, O. D., Shatalov, M., & Ducoste, J. J. (2014). Modeling a continuous flow ultraviolet Light Emitting Diode reactor using computational fluid dynamics. *Chemical Engineering Science*, 116, 524-535.
150. Jermann, C., Koutchma, T., Margas, E., Leadley, C., & Ros-Polski, V. (2015). Mapping trends in novel and emerging food processing technologies around the world. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 31, 14-27.
151. Jiang, J., & Xiong, Y. L. (2016). Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review. *Meat Science*, 120, 107-117.
152. Jiménez-Sánchez, C., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2017). Alternatives to conventional thermal treatments in fruit-juice processing. Part 2: Effect on composition, phytochemical content, and physicochemical, rheological, and organoleptic properties of fruit juices. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(3), 637-652.

153. Jin, C. Y., Xu, D., Zeng, F. K., Zhao, Y. C., Yang, Y. C., Gao, G. Q., & Liu, G. (2017). A Simple Method to Prepare Raw Dehydrated Potato Flour by Low-Temperature Vacuum Drying. *International Journal of Food Engineering*, 13(11).
154. Juneja, V. K., & Marks, H. M. (2003). Mathematical description of non-linear survival curves of *Listeria monocytogenes* as determined in a beef gravy model system at 57.5 to 65 C. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4(3), 307-317.
155. Kalva, J. J., Sims, C. A., Puentes, L. A., Snyder, D. J., & Bartoshuk, L. M. (2014). Comparison of the hedonic general labeled magnitude scale with the hedonic 9-point scale. *Journal of Food Science*, 79(2), S238-S245.
156. Kaya, Z. (2011). Disinfection of white grape juice by using continuous flow UV reactor (Tesis de maestría). Izmir Institute of Technology, Turquía.
157. Kaya, Z., Yıldız, S., & Ünlütürk, S. (2015). Effect of UV-C irradiation and heat treatment on the shelf life stability of a lemon-melon juice blend: multivariate statistical approach. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 29, 230-239.
158. Kaya, Z., & Unluturk, S. (2016). Processing of clear and turbid grape juice by a continuous flow UV system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, 282-288.
159. Kaya, Z., & Unluturk, S. (2019). Pasteurization of verjuice by UV-C irradiation and mild heat treatment. *Journal of Food Process Engineering*, 42(5), e13131.
160. Kerr, B. (2018). Producing baby carrots. *Farmer's Weekly*, 2018(18016), 50.
161. Khan, I., Tango, C. N., Miskeen, S., Lee, B. H., & Oh, D. H. (2017). Hurdle technology: A novel approach for enhanced food quality and safety—A review. *Food Control*, 73, 1426-1444.
162. Kim, S. S., Park, S. H., Kim, S. H., & Kang, D. H. (2019). Synergistic effect of ohmic heating and UV-C irradiation for inactivation of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in buffered peptone water and tomato juice. *Food Control*, 102, 69-75.
163. Konings, W. N., Lolkema, J. S., Bolhuis, H., Van Veen, H. W., Poolman, B., & Driessen, A. J. M. (1997). The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria, energy transduction and multidrug resistance. *Antonie van leeuwenhoek*, 71(1-2), 117-128.

164. Koutchma, T., & Parisi, B. (2004). Biodosimetry of *Escherichia coli* UV inactivation in model juices with regard to dose distribution in annular UV reactors. *Journal of Food Science*, 69(1), FEP14-FEP22.
165. Koutchma, T., Keller, S., Chirtel, S., & Parisi, B. (2004). Ultraviolet disinfection of juice products in laminar and turbulent flow reactors. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(2), 179-189.
166. Koutchma, T., Parisi, B., & Patazca, E. (2007). Validation of UV coiled tube reactor for fresh juices. *Journal of Environmental Engineering and Science*, 6(3), 319-328.
167. Koutchma, T. (2009). Advances in ultraviolet light technology for non-thermal processing of liquid foods. *Food and Bioprocess Technology*, 2(2), 138-155.
168. Koutchma, T., Forney, L. J., & Moraru, C. I. (2009). *Ultraviolet light in food technology: principles and applications*. Florida, Estados Unidos: CRC Press.
169. Kowalski, W. (2010). *Ultraviolet germicidal irradiation handbook: UVGI for air and surface disinfection*. Berlín, Alemania: Springer.
170. Krisch, J., Chandrasekaran, M., Kadaikunnan, S., Alharbi, N. S., & Vágvölgyi, C. (2016). Latest about spoilage by yeasts: focus on the deterioration of beverages and other plant-derived products. *Journal of Food Protection*, 79(5), 825-829.
171. Kuhn, H. J., Braslavsky, S. E., & Schmidt, R. (2004). Chemical actinometry (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 76(12), 2105-2146.
172. La Cava, E., & Sgroppo, S. (2018). Inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Saccharomyces cerevisiae* IMR-RL 962 in grapefruit [*Citrus paradisi* (Macf.)] juice by UV-C light: changes in bioactive compounds and quality characteristics. *International Food Research Journal*, 25(2).
173. La Rosa-Toro, G., Vigo López, F., & Muedas Taípe, G. (2011). Evaluación de la actividad antioxidante del pisco peruano mediante voltametría cíclica. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77(2), 127-134.
174. Laguna, L., Varela, P., Salvador, A., & Fiszman, S. (2013). A new sensory tool to analyse the oral trajectory of biscuits with different fat and fibre contents. *Food Research International*, 51(2), 544-553.
175. Lalor, F., Madden, C., McKenzie, K., & Wall, P. G. (2011). Health claims on foodstuffs: A focus group study of consumer attitudes. *Journal of Functional Foods*, 3(1), 56-59.

176. Lavilla, M., & Gayan, E. (2018). Consumer Acceptance and Marketing of Foods Processed Through Emerging Technologies. En F.J. Barba, A.S. Sant' Ana, V. Orlie, & M. Koubaa (Eds.), *Innovative Technologies for Food Preservation* (pp. 233-253). Academic Press.
177. Lavinas, F. C., Miguel, M. A. L., Lopes, M. L. M., & Valente Mesquita, V. L. (2008). Effect of high hydrostatic pressure on cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice preservation. *Journal of Food Science*, 73(6), M273-M277.
178. Lawless, H. T., & Heymann, H. (2010). *Sensory evaluation of food: principles and practices*. Berlín, Alemania: Springer Science & Business Media.
179. Lawless, H.T. (2013). Product Optimization, Just-About-Right (JAR) Scales, and Ideal Profiling. En H.T. Lawless (Ed.), *Quantitative Sensory Analysis* (pp. 282). Nueva Jersey, Estados Unidos: Wiley Blackwell.
180. Lee, J., & Kaletunç, G. (2002). Evaluation of the heat inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* by differential scanning calorimetry. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5379-5386.
181. Lester, G. E., Lewers, K. S., Medina, M. B., & Saftner, R. A. (2012). Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin-Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27(1), 102-107.
182. Li, J., Ahn, J., Liu, D., Chen, S., Ye, X., & Ding, T. (2016). Evaluation of ultrasound-induced damage to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by flow cytometry and transmission electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(6), 1828-1837.
183. Li, L., Cepeda, J., Subbiah, J., Froning, G., Juneja, V. K., & Thippareddi, H. (2017). Dynamic predictive model for growth of *Salmonella* spp. in scrambled egg mix. *Food Microbiology*, 64, 39-46.
184. Lianou, A., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. (2016). Microbiological spoilage of foods and beverages. En P. Subramaniam (Ed.), *The Stability and Shelf Life of Food* (pp. 3-42). Cambridge, Reino Unido: Woodhead Publishing.
185. Lim, J., & Fujimaru, T. (2010). Evaluation of the labeled hedonic scale under different experimental conditions. *Food Quality and Preference*, 21(5), 521-530.
186. Linton, R. H., Carter, W. H., Pierson, M. D., & Hackney, C. R. (1995). Use of a modified Gompertz equation to model nonlinear survival curves for *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection*, 58(9), 946-954.

187. Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 134(12), 3479S-3485S.
188. Liu, R. H. (2013). Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Advances in Nutrition*, 4(3), 384S-392S.
189. Longobardi-Givan, A. (2013). *Flow cytometry: first principles*, Nueva Jersey, Estados Unidos: John Wiley & Sons.
190. Lynch, M. F., Tauxe, R. V., & Hedberg, C. W. (2009). The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiology & Infection*, 137(3), 307-315.
191. MacDougall, D. B. (2002). *Colour in food: Improving quality*. Florida, Estados Unidos: CRC Press.
192. Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., & Leguérinel, I. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72(1-2), 107-113.
193. Malvern Instruments. (2004). Size theory. En: Zetasizer Nano Series User Manual. Pp. 199-203. Malvern, Worcestershire, Reino Unido. Recuperado de: http://www.biozentrum.unibas.ch/fileadmin/redaktion/Forschung/Research_Groups/BF/instruments/zetasizer_manual.pdf.
194. Mansoori, G. A., Mohazzabi, P., McCormack, P., & Jabbari, S. (2007). Nanotechnology in cancer prevention, detection and treatment: bright future lies ahead. *World Review of Science, Technology and Sustainable Development*, 4(2), 226.
195. Mansor, A., Shamsudin, R., Adzahan, N. M., & Hamidon, M. N. (2014). Efficacy of ultraviolet radiation as non-thermal treatment for the inactivation of *Salmonella typhimurium* TISTR 292 in pineapple fruit juice. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 173-180.
196. Margraf, T., Karnopp, A. R., Rosso, N. D., & Granato, D. (2015). Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to estimate the total phenolic content of juices and teas using 96-Well microplates. *Journal of Food Science*, 80(11), C2397-C2403.
197. Martínez-Sánchez, A., Lozano-Pastor, P., Artés-Hernández, F., Artés, F., & Aguayo, E. (2019). Preharvest UV-C treatment improves the quality of spinach primary production and postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, 155, 130-139.

198. Masschelein, W. J., & Rice, R. G. (2016). *Ultraviolet light in water and wastewater sanitation*. Florida, Estados Unidos: CRC Press.
199. McHugh, M. L. (2011). Multiple comparison analysis testing in ANOVA. *Biochemia Medica*, 21(3), 203-209.
200. McMeekin, T. A. (2007). Predictive microbiology: Quantitative science delivering quantifiable benefits to the meat industry and other food industries. *Meat Science*, 77(1), 17-27.
201. Meilgaard, M. (2007). Affective tests: consumer tests and in-house panel acceptance tests. En G. V. Civille (Ed.), *Sensory evaluation techniques*, 201-235. Boca Ratón, Estados Unidos: CRC Press.
202. Miller, F. A., & Silva, C. L. (2012). Thermal Treatment Effects in Fruit Juices. En S. Rodrigues y F.A.N. Fernandes (Eds.), *Advances in fruit processing technologies* (pp. 363). Florida, Estados Unidos: CRC Press.
203. Ministerio de Agroindustria. (2017). Campaña de promoción del consumo de frutas y verduras. Recuperado de: https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/cfa/regionales/archivos//000000_2017/000000_NEA/000000_2da%20Reuni%C3%B3n/000000_Material/000000_Campa%C3%B1a%20de%20Promocion%20del%20consumo%20de%20Frutas%20y%20Verduras.pdf.
204. Mitchell, D. L., & Nairn, R. S. (1989). The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochemistry and Photobiology*, 49(6), 805-819.
205. Moliné, M., Libkind, D., del Carmen Diéguez, M., & van Broock, M. (2009). Photoprotective role of carotenoids in yeasts: response to UV-B of pigmented and naturally-occurring albino strains. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 95(3), 156-161.
206. Montgomery, D. C. (2013). *Design and Analysis of Experiments*. Nueva Jersey, Estados Unidos: John Wiley & Sons.
207. Moreiras, O., Carvajal, A., Cabrera, L., & Cuadrado, C. (2011). Tablas de composición de alimentos, 2011. Madrid, España: Pirámide.
208. Müller, A., Stahl, M. R., Greiner, R., & Posten, C. (2014). Performance and dose validation of a coiled tube UV-C reactor for inactivation of microorganisms in absorbing liquids. *Journal of Food Engineering*, 138, 45-52.

209. Muñoz, A., Caminiti, I. M., Palgan, I., Pataro, G., Noci, F., Morgan, D. J., & Lyng, J. G. (2013). Effects on *Escherichia coli* inactivation and quality attributes in apple juice treated by combinations of pulsed light and thermosonication. *Food Research International*, 45(1), 299-305.
210. Muñoz-Bernal, O. A., Torres-Aguirre, G. A., Núñez-Gastélum, J. A., Rosa, L. A., Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, J. F., & Álvarez-Parrilla, E. (2017). Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *TIP Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 20(2), 23-28.
211. Myszka, K., Schmidt, M. T., Majcher, M., Juzwa, W., Olkowicz, M., & Czaczyk, K. (2016). Inhibition of quorum sensing-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens* KM 121 by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 114, 252-259.
212. Mytilinaki, E. (2008). Utilización de luz UV-C para preservar jugos frutales (Tesis de Maestría). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
213. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF). 2006. Requisite Scientific Parameters for Establishing the Equivalence of Alternative Methods of Pasteurization. *Journal of Food Protection*, 69(5): 1190-1216.
214. Nebe-von-Caron, G., Stephens, P. J., Hewitt, C. J., Powell, J. R., & Badley, R. A. (2000). Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods*, 42(1), 97-114.
215. Newman, K. L., Leon, J. S., Rebolledo, P. A., & Scallan, E. (2015). The impact of socioeconomic status on foodborne illness in high-income countries: a systematic review. *Epidemiology & Infection*, 143(12), 2473-2485.
216. Niu, C., Yuan, Y., Guo, H., Wang, X., Wang, X., & Yue, T. (2018). Recognition of osmotolerant yeast spoilage in kiwi juices by near-infrared spectroscopy coupled with chemometrics and wavelength selection. *RSC Advances*, 8(1), 222-229.
217. Noci, F., Riener, J., Walkling-Ribeiro, M., Cronin, D. A., Morgan, D. J., & Lyng, J. G. (2008). Ultraviolet irradiation and pulsed electric fields (PEF) in a hurdle strategy for the preservation of fresh apple juice. *Journal of food engineering*, 85(1), 141-146.
218. Ochoa-Velasco, C. E., Cruz-González, M., & Guerrero-Beltrán, J. Á. (2014). Ultraviolet-C light inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium in

- coconut (*Cocos nucifera* L.) milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 26, 199-204.
219. Ochoa-Velasco, C. E., Díaz-Lima, M. C., Ávila-Sosa, R., Ruiz-López, I. I., Corona-Jiménez, E., Hernández-Carranza, P., & Guerrero-Beltrán, J. A. (2018.a). Effect of UV-C light on *Lactobacillus rhamnosus*, *Salmonella Typhimurium*, and *Saccharomyces cerevisiae* kinetics in inoculated coconut water: Survival and residual effect. *Journal of Food Engineering*, 223, 255-261.
220. Ochoa-Velasco, C. E., Salcedo-Pedraza, C., Hernández-Carranza, P., & Guerrero-Beltrán, J. A. (2018.b). Use of microbial models to evaluate the effect of UV-C light and trans-cinnamaldehyde on the native microbial load of grapefruit (*Citrus × paradisi*) juice. *International Journal of Food Microbiology*, 282, 35-41.
221. Olaimat, A. N., & Holley, R. A. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbiology*, 32(1), 1-19.
222. Organización Mundial de la Salud. (2007). The world health report 2007- A safer future: global public health security in the 21st century. Recuperado de: <https://www.who.int/whr/2007/en/>.
223. Organización Mundial de la Salud. (2008). *Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: meeting report* (Vol. 14). Recuperado de: https://www.who.int/foodsafety/publications/mra_14/en/.
224. Orłowska, M., Koutchma, T., Grapperhaus, M., Gallagher, J., Schaefer, R., & Defelice, C. (2013). Continuous and pulsed ultraviolet light for nonthermal treatment of liquid foods. Part 1: effects on quality of fructose solution, apple juice, and milk. *Food and Bioprocess Technology*, 6(6), 1580-1592.
225. Oteiza, J. M., Giannuzzi, L., & Zaritzky, N. (2010). Ultraviolet treatment of orange juice to inactivate *E. coli* O157:H7 as affected by native microflora. *Food and Bioprocess Technology*, 3(4), 603-614.
226. Pala, Ç. U., & Toklucu, A. K. (2011). Effect of UV-C light on anthocyanin content and other quality parameters of pomegranate juice. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(6), 790-795.
227. Pala, Ç. U., & Toklucu, A. K. (2013). Microbial, physicochemical and sensory properties of UV-C processed orange juice and its microbial stability during refrigerated storage. *LWT-Food Science and Technology*, 50(2), 426-431.

228. Pao, S. & Fellers, P.J. (2003). Citrus fruits: Oranges. En B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of food sciences and nutrition* (pp. 1341-1346). Oxford, Reino Unido: Academic Press.
229. Paramithiotis, S., Drosinos, E. H., & Skandamis, P. N. (2017). Food recalls and warnings due to the presence of foodborne pathogens- a focus on fresh fruits, vegetables, dairy and eggs. *Current Opinion in Food Science*, 18, 71-75.
230. Park, S. Y., Kim, A. N., Lee, K. H., & Ha, S. D. (2015). Ultraviolet-C efficacy against a norovirus surrogate and hepatitis A virus on a stainless-steel surface. *International Journal of Food Microbiology*, 211, 73-78.
231. Pathare, P. B., Opara, U. L., & Al-Said, F. A. J. (2013). Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 36-60.
232. Pedrós-Garrido, S., Condón-Abanto, S., Clemente, I., Beltrán, J. A., Lyng, J. G., Bolton, D., & Whyte, P. (2018). Efficacy of ultraviolet light (UV-C) and pulsed light (PL) for the microbiological decontamination of raw salmon (*Salmo salar*) and food contact surface materials. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 50, 124-131.
233. Peirano, G., Mulvey, G. L., Armstrong, G. D., & Pitout, J. D. (2013). Virulence potential and adherence properties of *Escherichia coli* that produce CTX-M and NDM β -lactamases. *Journal of Medical Microbiology*, 62(4), 525-530.
234. Peleg, M., & Cole, M. B. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science*, 38(5), 353-380.
235. Peleg, M. (2006). Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems: models for predicting growth and inactivation. Florida, Estados Unidos: CRC Press.
236. Pereira, G. D. S., Machado, F. L. D. C., & Costa, J. M. C. D. (2013). Quality of 'Delta Valencia' orange grown in semiarid climate and stored under refrigeration after coating with wax. *Food Science and Technology*, 33(2), 276-281.
237. Petruzzi, L., Campaniello, D., Speranza, B., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2017.a). Thermal Treatments for Fruit and Vegetable Juices and Beverages: A Literature Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(4), 668-691.
238. Petruzzi, L., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2017.b). Microbial spoilage of foods: Fundamentals. En A. Bevilacqua, M. R. Corbo, & M. Sinaglia (Eds.),

- The Microbiological Quality of Food* (pp. 1-21). Cambridge, Reino Unido: Woodhead Publishing.
239. Picouet, P. A., Sárraga, C., Cofán, S., Belletti, N., & Guardia, M. D. (2015). Effects of thermal and high-pressure treatments on the carotene content, microbiological safety and sensory properties of acidified and of non-acidified carrot juice. *LWT-Food Science and Technology*, *62*(1), 920-926.
240. Pinela, J., & Ferreira, I. C. (2017). Nonthermal physical technologies to decontaminate and extend the shelf-life of fruits and vegetables: Trends aiming at quality and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(10), 2095-2111.
241. Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P. (2011). Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, *1*(1), 106.
242. Pristijono, P., Golding, J., & Bowyer, M. (2019). Postharvest UV-C Treatment, Followed by Storage in a Continuous Low-Level Ethylene Atmosphere, Maintains the Quality of Kensington Pride Mango Fruit Stored at 20 C. *Horticulturae*, *5*(1), 1.
243. Quinn, G. P., & Keough, M. J. (2002). *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.
244. Rahn, R. O. (1997). Potassium iodide as a chemical actinometer for 254 nm radiation: use of Iodate as an electron scavenger. *Photochemistry and Photobiology*, *66*(4), 450-455.
245. Rahn, R. O., Bolton, J., & Stefan, M. I. (2007). The Iodide/Iodate actinometer in UV disinfection: Determination of the fluence rate distribution in UV reactors. *Photochemistry and Photobiology*, *82*(2), 611-615.
246. Rajkovic, A., Smigic, N., & Devlieghere, F. (2010). Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. *International Journal of Food Microbiology*, *141*, S29-S42.
247. Ramírez-Navas, J. S. (2012). *Análisis sensorial: pruebas orientadas al consumidor*. Revista ReCiTeIA.
248. Raso, J., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2003). Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *43*(3), 265-285.

249. Rastogi, R. P., Kumar, A., Tyagi, M. B., & Sinha, R. P. (2010). Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of Nucleic Acids*, 2010.
250. Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(3), 157-180.
251. Resta, V. (2007). Propiedades morfológicas y ópticas de nanopartículas de oro producidas o procesadas mediante técnicas láser (tesis doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, España.
252. Reyes, G., Corzo, O., & Bracho, N. (2005). Optimización de la deshidratación osmótica de sardina mediante la metodología de superficies de respuesta. *Revista Científica*, 15(4), 377-384.
253. Riganakos, K. A., Karabagias, I. K., Gertzou, I., & Stahl, M. (2017). Comparison of UV-C and thermal treatments for the preservation of carrot juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 42, 165-172.
254. Rodríguez, J. M. M. (2015). Diseño de alimentos sacieantes: estudio de las propiedades físicas, sensoriales y de la capacidad saciante esperada en un postre lácteo sólido tipo tarta de queso (Tesis Doctoral). Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
255. Rodríguez-Concepción, M., Avalos, J., Bonet, M. L., Boronat, A., Gómez-Gómez, L., Hornero-Méndez, D., Carmen-Limón, M., Meléndez-Martínez, A. J., Olmedilla-Alonso, B., Palou, A., Rodrigo, M. J., Zacarias, L., Zhu, C., & Ribot, J. (2018). A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Progress in Lipid Research*, 70, 62-93.
256. Rodríguez-González, O., Buckow, R., Koutchma, T., & Balasubramaniam, V. M. (2015). Energy requirements for alternative food processing technologies-principles, assumptions, and evaluation of efficiency. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), 536-554.
257. Rowan, N. J., Valdramidis, V. P., & Gómez-López, V. M. (2015). A review of quantitative methods to describe efficacy of pulsed light generated inactivation data that embraces the occurrence of viable but non culturable state microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*, 44(1), 79-92.

258. Rupasinghe, H. V., & Yu, L. J. (2012). Emerging preservation methods for fruit juices and beverages. En R.M. Pandey & S.K. Upadhyay, *Food Additive*. Recuperado de: <https://www.intechopen.com/books/food-additive/food-additive>.
259. Ruysen, T., Vlaemynck, G., Uyttendaele, M., Van Assche, P., & Le Trung, T. (2007). Flow cytometry as a rapid tool for microbiological analysis in the food industry: potentials and restrictions. En A. van Amerongen, D. Barug & M. Lauwaars (Eds.), *Rapid Methods for Food and Feed Quality Determination* (pp. 85-101). Wageningen, Países Bajos: Wageningen Academic Publishers.
260. Sahin, S., & Sumnu, S. G. (2006). *Physical properties of foods*. Nueva York, Estados Unidos: Springer.
261. Sampedro, F., Geveke, D. J., Fan, X., & Zhang, H. Q. (2009). Effect of PEF, HHP and thermal treatment on PME inactivation and volatile compounds concentration of an orange juice–milkbased beverage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4), 463-469.
262. Sampedro, F., McAloon, A., Yee, W., Fan, X., Zhang, H. Q., & Geveke, D. J. (2013). Cost analysis of commercial pasteurization of orange juice by pulsed electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17, 72-78.
263. Santos, A. L., Oliveira, V., Baptista, I., Henriques, I., Gomes, N. C., Almeida, A., & Cunha, Â. (2013). Wavelength dependence of biological damage induced by UV radiation on bacteria. *Archives of Microbiology*, 195(1), 63-74.
264. Sanz, E. N., Davila, I. S., Balao, J. A., & Alonso, J. Q. (2007). Modelling of reactivation after UV disinfection: effect of UV-C dose on subsequent photoreactivation and dark repair. *Water Research*, 41(14), 3141-3151.
265. Sapers, G. M., & Doyle, M. P. (2014). Scope of the produce contamination problem. En K.R. Matthews (Ed.), *The produce contamination problem* (pp. 3-20). Cambridge, Estados Unidos: Academic Press.
266. Saucedo-Gálvez, J. N., Roca-Couso, R., Martínez-García, M., Hernández-Herrero, M. M., Gervilla, R., & Roig-Sagués, A. X. (2019). Inactivation of ascospores of *Talaromyces macrosporus* and *Neosartorya spinosa* by UV-C, UHPH and their combination in clarified apple juice. *Food Control*, 98, 120-125.
267. Sawyer, S. F. (2009). Analysis of variance: the fundamental concepts. *Journal of Manual & Manipulative Therapy*, 17(2), 27E-38E.

268. Scallan, E., Griffin, P. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., & Hoekstra, R. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—unspecified agents. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 16.
269. Scharff, R. L. (2010). Health-related costs from foodborne illness in the United States. Recuperado de: <http://www.producesafetyproject.org/admin/assets/files/Health-Related-Foodborne-IllnessCosts-Report.pdf-1.pdf>.
270. Schenk, M., Guerrero, S., & Alzamora, S. M. (2008). Response of some microorganisms to ultraviolet treatment on fresh-cut pear. *Food and Bioprocess Technology*, 1(4), 384-392.
271. Schenk, M. (2010). Preservación de productos frutales mínimamente procesados mediante la aplicación de luz UV y su combinación con otras tecnologías emergentes (Tesis de Doctorado). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
272. Schenk, M., Raffellini, S., Guerrero, S., Blanco, G. A., & Alzamora, S. M. (2011). Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* by UV-C light: study of cell injury by flow cytometry. *LWT-Food Science & Technology*, 44(1), 191-198.
273. Schenk, M., García Loredó, A., Raffellini, S., Alzamora, S. M., & Guerrero, S. (2012). The effect of UV-C in combination with H₂O₂ treatments on microbial response and quality parameters of fresh cut pear discs. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(9), 1842-1851.
274. Shah, N. N. A. K., Shamsudin, R., Rahman, R. A., & Adzahan, N. M. (2016). Fruit juice production using ultraviolet pasteurization: A review. *Beverages*, 2(3).
275. Shahidi, F., & Zhong, Y. (2010). Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews*, 39(11), 4067-4079.
276. Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781.
277. Sharma, H. K., & Kumar, N. (2017). Utilization of Carrot Pomace. En Anal A.K. (Ed.), *Food Processing By-Products and their Utilization* (pp. 207-229). Nueva Jersey, Estados Unidos: John Wiley & Sons.
278. Sharma, K. D., Karki, S., Thakur, N. S., & Attri, S. (2012). Chemical composition, functional properties and processing of carrot- A review. *Journal of Food Science and Technology*, 49(1), 22-32.

279. Sheth, A. N., Wiersma, P., Atrubin, D., Dubey, V., Zink, D., Skinner, G., ... & Drenzek, C. (2008). International outbreak of severe botulism with prolonged toxemia caused by commercial carrot juice. *Clinical Infectious Diseases*, 47(10), 1245-1251.
280. Silalahi, J. (2002). Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 11(1), 79-84.
281. Sillankorva, S., Neubauer, P., & Azeredo, J. (2008). *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiIBB-PF7A. *Bmc Biotechnology*, 8(1), 79.
282. Silva-Dias, J. C. (2012). Nutritional quality and health benefits of vegetables: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 3(10), 1354.
283. Silva-Dias, J. C. (2014). Nutritional and health benefits of carrots and their seed extracts. *Food and Nutrition Sciences*, 5(22), 2147.
284. Singh, S., & Shalini, R. (2016). Effect of hurdle technology in food preservation: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(4), 641-649.
285. Slavin, J. L. & Lloyd, B. (2012). Health benefits of fruits and vegetables. *Advances in Nutrition*, 3(4), 506-516.
286. Spikes, J. D. (1981). Photodegradation of foods and beverages. En K.C. Smith (Ed.), *Photochemical and photobiological reviews* (pp. 39-85). Boston, Estados Unidos: Springer.
287. Spilimbergo, S., Foladori, P., Mantoan, D., Ziglio, G., & Della Mea, G. (2010). High-pressure CO₂ inactivation and induced damage on *Saccharomyces cerevisiae* evaluated by flow cytometry. *Process Biochemistry*, 45(5), 647-654.
288. Syamaladevi, R. M., Lu, X., Sablani, S. S., Insan, S. K., Adhikari, A., Killinger, K., & Annapure, U. (2013). Inactivation of *Escherichia coli* population on fruit surfaces using ultraviolet-C light: influence of fruit surface characteristics. *Food and Bioprocess Technology*, 6(11), 2959-2973.
289. Taze, B. H., Unluturk, S., Buzrul, S., & Alpas, H. (2015). The impact of UV-C irradiation on spoilage microorganisms and colour of orange juice. *Journal of food science and technology*, 52(2), 1000-1007.
290. Tchuenchieu, A., Essia Ngang, J. J., Servais, M., Dermience, M., Sado Kamdem, S., Etoa, F. X., & Sindic, M. (2018). Effect of low thermal pasteurization in

- combination with carvacrol on color, antioxidant capacity, phenolic and vitamin C contents of fruit juices. *Food Science & Nutrition*, 6(4), 736-746.
291. Tenenhaus-Aziza, F., & Ellouze, M. (2015). Software for predictive microbiology and risk assessment: a description and comparison of tools presented at the ICPMF8 Software Fair. *Food Microbiology*, 45, 290-299.
 292. Torlak, E. (2014). Efficacy of ozone against *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 1-4.
 293. Tournas, V. H., Heeres, J., & Burgess, L. (2006). Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiology*, 23(7), 684-688.
 294. Tremarin, A., Brandao, T. R., & Silva, C. L. M. (2016). Inactivation kinetics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice submitted to ultraviolet radiation. *Food Control*, 30, 1-6.
 295. Tsao, R. (2015). Synergistic interactions between antioxidants used in food preservation. En F. Shahidi (Ed.), *Handbook of antioxidants for food preservation* (pp. 335-347). Cambridge, Reino Unido: Woodhead Publishing.
 296. Turner, T., & Burri, B. (2013). Potential nutritional benefits of current citrus consumption. *Agriculture*, 3(1), 170-187.
 297. U.S. Food and Drug Administration (USFDA). (2000). Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. Recuperado de: <https://www.fda.gov/files/food/published/Kinetics-of-Microbial-Inactivation-for-Alternative-Food-Processing-Technologies.pdf>.
 298. U.S. Food and Drug Administration (USFDA). (2001). FDA survey of imported fresh produce, FY 1999. Field assignment.
 299. Ueckert, J., Breeuwer, P., Abee, T., Stephens, P., Von Caron, G. N., & Ter Steeg, P. F. (1995). Flow cytometry applications in physiological study and detection of foodborne microorganisms. *International Journal of Food microbiology*, 28(2), 317-326.
 300. United States Department of Agriculture and U.S. Department of Health and Human Services. (2010). Dietary Guidelines for Americans, 2010. Recuperado de: <https://health.gov/dietaryguidelines/dga2010/dietaryguidelines2010.pdf>.
 301. Urban, L., Charles, F., de Miranda, M. R. A., & Aarrouf, J. (2016). Understanding the physiological effects of UV-C light and exploiting its agronomic potential before and after harvest. *Plant Physiology and Biochemistry*, 105, 1-11.

302. Uyttendaele, M., Jaykus, L. A., Amoah, P., Chiodini, A., Cunliffe, D., Jacxsens, L., & Medema, G. (2015). Microbial hazards in irrigation water: Standards, norms, and testing to manage use of water in fresh produce primary production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 336-356.
303. Valentin, D., Chollet, S., Lelièvre, M., & Abdi, H. (2012). Quick and dirty but still pretty good: A review of new descriptive methods in food science. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(8), 1563-1578.
304. Van Boekel, M. A. (2002). On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2), 139-159.
305. Vásquez-Mazo, P., Loredó, A. G., Ferrario, M., & Guerrero, S. (2019). Development of a Novel Milk Processing to Produce Yogurt with Improved Quality. *Food and Bioprocess Technology*, 12(6), 964-975.
306. Villanueva, N. D., Petenate, A. J., & Da Silva, M. A. (2005). Performance of the hybrid hedonic scale as compared to the traditional hedonic, self-adjusting and ranking scales. *Food Quality and Preference*, 16(8), 691-703.
307. Vojdani, J. D., Beuchat, L. R., & Tauxe, R. V. (2008). Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. *Journal of Food Protection*, 71(2), 356-364.
308. Vora, H. M., Kyle, W. S. A., & Small, D. M. (1999). Activity, localization and thermal inactivation of deteriorative enzymes in Australian carrot (*Daucus carota* L) varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(8), 1129-1135.
309. Watts, B. M., Ylimaki, G. L., Jeffery, L. E., & Elias, L. G. (1989). *Basic sensory methods for food evaluation*. Ontario, Canadá: IDRC.
310. Wilcock, A., & Ball, B. (2014). Food safety: consumer perceptions and practices. En R. Bhat y V. Gómez-López (Eds.), *Practical Food Safety: Contemporary Issues and Future Directions*. Nueva Jersey, Estados Unidos: John Wiley & Sons.
311. Yang, J., & Lee, J. (2018). Korean consumers' acceptability of commercial food products and usage of the 9-point hedonic scale. *Journal of Sensory Studies*, 33(6), e12467.
312. Žeželj, I., Milošević, J., Stojanović, Ž., & Ognjanov, G. (2012). The motivational and informational basis of attitudes toward foods with health claims. *Appetite*, 59(3), 960-967.

313. Zhang, G., Ma, L., Phelan, V. H., & Doyle, M. P. (2009). Efficacy of antimicrobial agents in lettuce leaf processing water for control of *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Food Protection*, 72(7), 1392-1397.
314. Zhao, L. C., He, Y., Deng, X., Yang, G. L., Li, W., Liang, J., & Tang, Q. L. (2012). Response surface modeling and optimization of accelerated solvent extraction of four lignans from *Fructus schisandrae*. *Molecules*, 17(4), 3618-3629.
315. Zhao, W., Yang, R., Zhang, H. Q., Zhang, W., Hua, X., & Tang, Y. (2011). Quantitative and real time detection of pulsed electric field induced damage on *Escherichia coli* cells and sublethally injured microbial cells using flow cytometry in combination with fluorescent techniques. *Food Control*, 22(3-4), 566-573.
316. Zhou, S., Shao, Y., Gao, N., Zhu, S., Li, L., Deng, J., & Zhu, M. (2014). Removal of *Microcystis aeruginosa* by potassium ferrate (VI): impacts on cells integrity, intracellular organic matter release and disinfection by-products formation. *Chemical Engineering Journal*, 251, 304-309.
317. Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C., & Zhou, Z. (2016). Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food Chemistry*, 196, 885-896.