



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)  
asistida por otros factores en la preservación de jugos claros y turbios a  
escala piloto**

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

**DANIELA FENOGLIO**

Directora de Tesis: *Dra. Sandra N. Guerrero*

Directora Adjunta de Tesis: *Dra. Mariana I. Ferrario*

Consejera de estudios: *Dra. Ana M. Rojas*

Lugar de trabajo: ITAPROQ (CONICET-UBA), Departamento de Industrias,  
FCEN-UBA

Buenos Aires, 2023

## **Evaluación de la efectividad del uso de luz ultravioleta de onda corta (UV-C) asistida por calor moderado en la preservación de jugos claros y turbios a escala piloto**

El objetivo general de esta tesis es desarrollar un procesamiento a escala piloto de jugos frutales claros y de alta turbidez mediante la aplicación de luz ultravioleta de onda corta (UV-C) asistida por temperatura moderada, con el objeto de, obtener productos novedosos, seguros microbiológicamente y de elevada calidad organoléptica y funcional. La innovación reside en tres aspectos fundamentales: i) la utilización de luz UV-C asistida por calor moderado como método de preservación ii) el desafío de la aplicación de luz UV-C a un amplio espectro de jugos simples (claros) y complejos (blends turbios) y iii) la optimización de un equipo de procesamiento por luz UV-C a escala piloto, especialmente diseñado y construido para tal fin. Se determinaron los distintos tipos de dosis UV-C en el reactor a escalas laboratorio y piloto. Por un lado, se midió la dosis emitida por las lámparas mediante el uso de un radiómetro, por otro la dosis entregada a la muestra mediante la técnica de actinometría y finalmente la fluencia germicida determinada mediante una biodosimetría utilizando *Escherichia coli* ATCC 35218 y esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* ATCC 49025 como microorganismo trazador. Se estudió la inactivación de inóculos simples y compuestos en diversos jugos (claros y turbios) utilizando ambas escalas y equipos de diferente diseño y se analizó la influencia de la asistencia de la luz UV-C por calor moderado (50 °C) y de las características físicas y ópticas de las matrices en la eficiencia del procesamiento propuesto. Se estudió la cinética de inactivación microbiana en los distintos sistemas mediante la aplicación de modelos matemáticos predictivos conceptualmente diferentes (modelo de Weibull, Coroller y Bifásico con hombro). Se estudió la influencia del procesamiento UV-C sobre diversos parámetros de calidad (contenido de polifenoles, flavonoides, actividad antioxidante, vitamina C y HMF) y sobre la actividad de tres enzimas (polifenol oxidasa, PPO; peroxidasa, POD; y pectin-metil-esterasa, PME). Por último, se realizaron estudios sensoriales, tanto estáticos como dinámicos. La efectividad del tratamiento UV-C a escala

laboratorio ( $H_{dact}= 1271 \text{ mJ/cm}^2$ ) en la inactivación microbiana final alcanzada mostró no ser altamente dependiente de la microbiota acompañante, pero el modelado matemático permitió determinar la existencia de diferencias en las curvas de inactivación a tiempos intermedios de tratamiento, siendo menos eficiente el tratamiento al inocular cócteles de varias cepas de un mismo microorganismo. A escala piloto, se evidenció que la efectividad del tratamiento por luz UV-C asistida por calor moderado ( $H_{d act}=892 \text{ mJ/cm}^2- 50^\circ\text{C}$ ) dependió de las características ópticas de las matrices, siendo más efectivo en las bebidas menos complejas (jugos claros), tal como se esperaba. Los estudios de calidad sobre un jugo natural de naranja-mandarina tratado por luz UV-C asistida, a escala piloto, mostró que existió una disminución en el contenido de compuestos bioactivos de interés en el jugo, respecto de un jugo sin tratamiento. Asimismo, también se observó que la formación de HMF fue menor en el caso del tratamiento propuesto que en un jugo procesado térmicamente empleando alta temperatura. El tratamiento por luz UV-C asistida por calor moderado logró inactivar en gran medida a las enzimas PPO y POD, y en menor porcentaje la actividad de la PME. Los estudios sensoriales realizados para el jugo de naranja-mandarina tratado por el tratamiento optimizado (menor número de pasadas y de dosis recibida,  $H_{d act} \text{ optimizado}= 650 \text{ mJ/cm}^2-50^\circ\text{C}$ ) de acuerdo a los resultados microbiológicos y de calidad observados, demostraron una alta aceptación del producto por parte de un panel de consumidores. Un estudio de dominancia temporal de sensaciones reveló una predominancia del sabor cítrico en el producto por sobre otras sensaciones.

**Palabras clave:** Luz UV-C, tecnologías asistidas, jugos frutales, microbiología predictiva, estudios sensoriales, calidad fisicoquímica.

## **Effectiveness of Short-wave Ultraviolet Light (UV-C) assisted by mild heat processing at pilot scale to preserve clear and turbid fruit juices**

The general objective of this thesis was to develop an innovative pilot-scale processing for clear and high-turbidity fruit juices by using short-wave ultraviolet light (UV-C) assisted by moderate temperature to obtain novel, microbiologically safe and environmentally friendly products with high organoleptic and functional quality. The innovation lies in three fundamental aspects: i) the use of UV-C light assisting preservation processes (moderate temperature) ii) the challenge of applying UV-C light in a wide spectrum of simple (clear) and complex juices (cloudy blends) and iii) the optimization of a pilot-scale assisted UV-C light processing equipment specially designed and built for this purpose. The different UV-C fluences in the pilot and lab-scale reactors were determined. First, the light emitted by the UV-C lamps was determined using a radiometer. Then, the delivered dose was measured by actinometry; finally, the germicidal dose was determined by a biodosimetry essay using *Escherichia coli* ATCC 35218 and *Alicyclobacillus acidoterrestris* ATCC 49025 spores as the tracer microorganism. The microbial inactivation achieved by the single and assisted by mild heat (50°C) UV-C treatment, in a variety of clear and turbid matrixes, of single and composite inoculums was studied. The influence of some optical and physico-chemical characteristics on the treatment effectiveness was analysed. The microbial inactivation kinetics was deeply studied in each system by mathematical modelling (Weibull model, Coroller model y Biphasic plus shoulder model). Some quality parameters (total polyphenol content, flavonoid content, antioxidant activity, vitamin C content and HMF formation) and the activity of three enzymes (polyphenol oxidase, PPO; peroxidase, POD; and pectin-methyl-esterase, PME) were measured in order to determine if the proposed treatment had an effect on them. Finally, static and dynamic sensory studies were performed on the orange-tangerine juice. The final microbial inactivation achieved by the lab-scale UV-C treatment ( $H_{d\ act} = 1271\text{ mJ/cm}^2$ ) was not highly influenced by the presence of accompanying microbiota, but mathematical modelling evidenced the existence of differences among the inactivation curves at intermediate treatment times, being UV-

C treatment less effective at inactivating microbial cocktails. On the other hand, the microbial inactivation achieved by UV-C light assisted by mild heat ( $H_{d \text{ act}} = 892 \text{ mJ/cm}^2\text{-}50 \text{ }^\circ\text{C}$ ), was highly dependent on the optical characteristics of the juices, being less effective at decontaminating more complex matrixes. The quality studies carried on the orange-tangerine juice treated by pilot-scale assisted UV-C light, showed a decrease in the content of some bioactive compounds compared to an untreated sample. However, the appearance of HMF in the assisted UV-C treated juice was lower than in the same juice treated by thermal pasteurization (80 °C- 6 min). The assisted UV-C treatment succeeded at highly inactivating the activity of PPO and POD enzymes, and to a lesser extent the PME activity. The sensory studies performed on the orange-tangerine juice treated by the optimized assisted UV-C treatment, according to the microbiological and quality studies, which resulted in less passes through the reactor, therefore in a lower UV-C dose in order not to over treat the product ( $H_{d \text{ act optimized}} = 650 \text{ mJ/cm}^2\text{-}50^\circ$ ), demonstrated a high acceptance of the proposed product by the consumers. A "Temporal Dominance of Sensations" study revealed the predominance of the citric flavour throughout consumption.

**Keywords:** UV-C light, assisted technologies, fruit juices, predictive microbiology, sensory studies, physicochemical quality

## AGRADECIMIENTOS

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

A cada integrante del Departamento de Industrias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, por brindarme su ayuda siempre que lo requerí. Especialmente a Daniel Araujo y Julio Sosa quienes asistieron en el desarrollo, armado y mantenimiento del equipo de procesamiento UV-C a escala piloto, y siempre me brindaron su ayuda amablemente. A todo el personal no docente del departamento, en particular a Martín y a Matías por su constante ayuda y buena predisposición.

A la Dra. Sandra Guerrero por confiar en mí y brindarme esta oportunidad. Por su constante dedicación y permanente atención durante la dirección de esta tesis. Por empujarme a hacer mi trabajo lo mejor posible y por siempre creer que podía hacerlo.

A la Dra. Mariana Ferrario sin quien no podría haberlo logrado. Por su permanente apoyo, ayuda y contención durante la codirección de esta tesis. Por su generosidad y paciencia para compartir conmigo su experiencia y conocimientos.

A Tradecos SRL y ECA Agroindustrias por gentilmente donarme los jugos usados en esta tesis.

A Marcela por su compañía y ayuda. Por siempre escucharme y aconsejarme, por los almuerzos, charlas y días de trabajo compartidos.

A mis compañeras Antonella, Luz, Ángeles y Magdalena por el trabajo en equipo, por la constante ayuda desinteresada. Por las risas y charlas.

A Fer por acompañarme todos estos años, por alegrarse por mis logros, por siempre hacerme reír y por ayudarme en todo lo que pudo.

A Helena por entender que había que ir al jardín para que mamá pudiera ir a trabajar. Por hacer más completa y desafiante esta etapa, por sacarme una sonrisa siempre.

*A Helena...*

Artículos científicos de mi autoría, en donde se puede encontrar los distintos resultados presentados en esta tesis:

- ❖ *Inactivation of Alicyclobacillus acidoterrestris spores, single or composite Escherichia coli and native microbiota in isotonic fruit-flavoured sports drinks processed by UV-C light (2023).* Kozono, L, Fenoglio, D., Ferrario, M., y Guerrero, S. *International Journal of Food Microbiology*, 386, 110024.
- ❖ *Development of an orange-tangerine juice treated by assisted pilot-scale UV-C light and loaded with yerba mate. Microbiological, physicochemical and dynamic sensory studies (2022).* Fenoglio, D., Andreone A., Ferrario, M., y Guerrero, S. *Food and Bioprocess Technology*, 15(4), 915-932.
- ❖ *Active food additive based on encapsulated yerba mate (Ilex paraguariensis) extract: Effect of drying methods on the oxidative stability of a real food matrix (mayonnaise) (2021).* Fenoglio, D. Soto Madrid, D., Ferrario M., Alarcón, J., Guerrero, S., Matiacevich S. *Journal of Food Science and Technology*, 58, 1574-1584.
- ❖ *Hurdle processing of turbid fruit juices involving encapsulated citral and vanillin addition and UV-C treatment (2020).* Ferrario, M., Fenoglio, D., Chantada, A., Guerrero, S. *International Journal of Food Microbiology*, 332, 108811.
- ❖ *Characterization of microbial inactivation in clear and turbid juices processed by short-wave ultraviolet light (2020).* Fenoglio, D., Ferrario, M., García Carrillo, M., Schenk, M. y Guerrero, S. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44, 1-18.
- ❖ *Effect of pilot-scale UV-C light treatment assisted by mild heat on E.coli, L. plantarum and S. cerevisiae inactivation in clear and turbid fruit juices. Storage study of surviving populations (2020).* Fenoglio, D., Ferrario, M., Schenk, M. y Guerrero, S. *International Journal of Food Microbiology*, 332, 108767.
- ❖ *UV-C light inactivation of single and composite microbial populations in tangerine-orange juice blend. Evaluation of some physicochemical characteristics (2019).* Fenoglio, D., Ferrario, M., Schenk, M. y Guerrero, S. *Food and Bioproducts Processing*, 117, 149-159.



# Índice

## Contenido

1	Introducción	14
1.1	Tendencias actuales en el consumo de alimentos	15
1.1.1	Bebidas	15
1.2	Origen del cultivo de frutos cítricos	16
1.3	Producción de naranja y mandarina en Argentina y en el mundo	17
1.4	Cítricos	18
1.4.1	Naranja	19
1.4.2	Composición nutricional de la naranja	20
1.4.3	Mandarina	22
1.4.4	Composición nutricional de la mandarina	23
1.5	Jugos cítricos	24
1.5.1	Mercado de jugos cítricos	26
1.5.2	Métodos de obtención de jugos frutales	29
1.5.3	Ecología microbiana de los cítricos	30
1.5.4	Enzimas presentes en los cítricos	32
1.6	Métodos de preservación de jugos frutales	33
1.6.1	Tratamiento térmico	33
1.6.2	Tecnologías no térmicas	35
1.6.2.1	Altas Presiones Hidrostáticas	35
1.6.2.2	Pulsos de luz de alta intensidad	35
1.6.2.3	Campos eléctricos pulsados	36
1.1.1.1	Ultrasonido	36
1.1.1.2	Luz Ultravioleta de Onda Corta	37
1.1.1.3	Mecanismo de inactivación microbiana por luz UV-C	38
1.1.1.4	Susceptibilidad de los microorganismos a la luz UV-C	39
1.1.1.5	Dosis/Fluencias	40
1.1.1.6	Equipos UV-C disponibles	42
1.1.2	Tecnologías asistidas para la preservación de alimentos	47
1.2	Ingeniería de la seguridad alimentaria	50
1.2.1	Microbiología predictiva	50

1.2.1.1	Clasificación de los modelos matemáticos	52
1.2.1.2	Validación de los modelos matemáticos	54
1.2.1.3	Limitaciones del modelado matemático	55
1.3	Evaluación de la calidad de los jugos frutales	55
1.3.1	Contenido de compuestos bioactivos	55
1.3.2	Formación de hidroximetilfurfural (HMF)	56
1.3.3	Estudios de color de los alimentos	57
1.3.4	Análisis sensorial de alimentos	61
1.3.4.1	Jueces	62
1.3.4.2	Selección del sitio de prueba	63
1.3.4.3	Clasificación de las pruebas de evaluación sensorial	63
1.3.4.4	Pruebas discriminativas	64
1.3.4.5	Pruebas descriptivas	64
1.3.4.6	Pruebas afectivas	65
2	Objetivos	67
2.1.	Hipótesis y objetivo general	68
2.2.	Objetivos específicos	69
3	Materiales y Métodos	72
	PARTE 1: ESCALA LABORATORIO	73
3.1	Materia prima	73
3.1.1	Matrices	73
3.1.2	Reactivos	74
3.1.3	Medios de cultivo	75
3.1.4	Microorganismos	77
3.1.5	Preparación de inóculos	79
3.2	Caracterización de las matrices	80
3.2.1	Densidad, sólidos solubles, pH, turbidez y color	80
3.2.2	Color	80
3.2.3	Coeficiente de absortividad a 254 nm y porcentaje de transmitancia	81
3.2.4	Tamaño de partícula	81
3.2.5	Viscosidad	82
3.3	Equipos de procesamiento por luz UV-C a escala laboratorio	82
3.3.1	Descripción del equipo	82
3.3.2	Caracterización del flujo en el reactor UV-C.	85
		10

3.3.3	Distribución de los tiempos de residencia en el reactor	86
3.3.4	Determinación de las diferentes dosis UV-C	86
3.4	Estudios de reto microbiano	91
3.5	Estudios de microbiota nativa	91
3.6	Enumeración de los microorganismos sobrevivientes	92
3.7	Modelado matemático	93
3.7.1	Modelo de Weibull	93
3.7.2	Modelo de Coroller	94
3.7.3	Modelo bifásico con hombro	95
3.8	Estudios de calidad físico-química	96
3.8.1	Color, pH, turbidez y sólidos solubles.	96
3.8.2	Contenido de polifenoles totales	96
3.8.3	Capacidad antioxidante	96
3.8.4	DPPH	96
3.8.5	ABTS	97
PARTE 2:	ESCALA PILOTO	98
3.9	Materia prima	98
3.9.1	Matrices	98
3.9.2	Reactivos	98
3.9.3	Medios de cultivo	99
3.9.4	Microorganismos	99
3.9.5	Preparación de inóculos	100
3.10	Caracterización de las matrices	100
3.11	Equipo de procesamiento por UV-C a escala piloto	100
3.11.1	Descripción del equipo	100
3.11.2	Optimización de las condiciones de operación del reactor UV-C	104
3.11.3	Caracterización del flujo en el reactor	106
3.11.4	Distribución de los tiempos de residencia en el reactor	106
3.11.5	Determinación de la dosis de radiación UV-C	107
3.12	Estudios de reto microbiano	109
3.13	Estudios de la microbiota nativa	110
3.14	Enumeración de los microorganismos sobrevivientes	111
3.15	Modelado matemático	111

3.16	Estudios de calidad físico-química	112
3.16.1	Flavonoides	112
3.16.2	HMF	112
3.16.3	Vitamina C	112
3.16.4	Actividad enzimática	113
3.17	Análisis sensorial	115
3.17.1	Área de prueba	115
3.17.2	Evaluadores	115
3.17.3	Evaluación sensorial del jugo comercial de naranja-mandarina	118
3.17.3.1	Test de campo	118
3.17.3.2	Test T-CATA	120
3.17.4	Evaluación sensorial de jugo natural de naranja-mandarina	125
3.17.4.1	Test de campo	125
3.17.4.2	Test CATA	126
3.17.4.3	Jugo Ideal	127
3.17.4.4	Test de Dominancia Temporal de Sensaciones (“TDS”)	130
4	Resultados y discusión	134
	PARTE 1: ESCALA LABORATORIO	135
4.1	Caracterización de las matrices	135
4.2	Caracterización del flujo dentro del reactor	139
4.3	Determinación de las dosis UV-C del reactor a escala laboratorio	141
4.4	Efectividad del tratamiento UV-C para inactivar la microbiota nativa	143
4.5	Influencia de la matriz	144
4.6	Efecto de la microbiota de fondo en la inactivación microbiana	148
4.7	Modelado matemático	152
4.8	Estudios de calidad fisicoquímica	164
4.9	CONCLUSIONES PARCIALES: Primera parte - escala laboratorio	167
	PARTE 2: PLANTA PILOTO	170
4.10	Caracterización de las matrices	170
4.11	Determinación y selección de las condiciones de operación	177
4.12	Determinación del tipo de flujo dentro del reactor mediante el número de Reynolds ( <i>Re</i> ) y del número Dean ( <i>De</i> )	178
4.13	Caracterización del procesamiento UV-C en el reactor	180

4.14	Efectividad del tratamiento UV-C/T para inactivar la microbiota nativa	181
4.15	Estudios de reto microbiano	183
4.15.1	Efectividad del tratamiento UV-C individual	183
4.15.2	Efectividad del tratamiento por luz UV-C asistida	186
4.15.3	Influencia de las características físico químicas de la matriz en la inactivación microbiana	189
4.16	Modelado matemático	190
4.17	Estudios de calidad fisicoquímica	203
4.17.1	Jugo comercial diluido de naranja-mandarina	203
4.17.2	Jugo natural exprimido	208
4.18	Estudios de calidad sensorial	215
4.18.1	Jugo Comercial de Naranja-Mandarina	215
4.18.2	Jugo natural exprimido de naranja-mandarina	218
4.18.2.1	Test de campo	218
4.18.2.2	Test de penalidad ("Penalty test")	223
4.18.2.3	CATA	225
4.18.2.4	Test de Dominancia Temporal de Sensaciones (TDS)	226
4.19	CONCLUSIONES PARCIALES: Segunda parte - escala piloto	230
5.	Conclusiones finales	233
6.	Investigaciones futuras	234
7	Bibliografía	235

# 1 Introducción



## 1.1 Tendencias actuales en el consumo de alimentos

Los consumidores actuales están más informados que en el pasado y son más conscientes respecto de su salud, por lo tanto, son más selectivos respecto de los alimentos que eligen y prefieren. La tendencia mundial actual se inclina hacia una mayor demanda de productos más naturales, mínimamente procesados y/o tratados por tecnologías consideradas “verdes”, es decir, amigables con el medio ambiente (Bang y col. 2017). En este sentido, una prestigiosa consultora de mercado, Innova Market Insight (Insight I.M, 2021), marca como una de las tendencias mundiales más importantes en la actualidad en lanzamientos de nuevos productos, al interés del consumidor por productos sustentables, cuyo procesamiento genere un bajo impacto en el medio ambiente. Por otro lado, la crisis económica mundial ocasionada por la pandemia desatada en el año 2019 por la aparición del virus SARS-CoV-2 (COVID-19) y profundizada por la guerra en Ucrania desde febrero del 2022, ha generado una evidente suba en el precio de los alimentos. Los países desarrollados, no acostumbrados a este fenómeno, se encuentran ahora en busca de precios más competitivos, sin resignar la calidad nutricional de los alimentos y la seguridad ambiental. Es por este motivo, que las tecnologías verdes y de bajo costo, entre las cuales se encuentra la luz ultravioleta de onda corta, ganan creciente interés por parte de la industria de alimentos.

Por otro lado, desde hace ya algunos años, los consumidores se inclinan por productos desafiantes, con notas de sabor novedosas y originales. A la vez, se tiende a evitar el consumo de aditivos químicos, y a preferir productos con aditivos naturales. Incluso, hoy en día, la ausencia total de aditivos puede definir la elección de un producto por parte de un consumidor (Insight I.M, 2021).

### 1.1.1 Bebidas

Las bebidas no quedan exentas del panorama mundial de tendencias de consumo antes mencionado ya que en esta categoría, el consumidor también busca dos requisitos básicos: que las mismas sean más naturales, en cuanto a su procesamiento, y/o más saludables, en referencia al consumo de bebidas elaboradas a base de frutas y verduras. A la vez, se suma el concepto de *cercanía al productor*. Hoy en día, los consumidores entienden que

cuanto más cerca se encuentra el origen de los alimentos que eligen, más frescos, nutritivos y económicos son (Insight I.M, 2021). Acelerando aún más estas tendencias, la reciente pandemia mundial despertó un masivo movimiento en busca del cuidado de la salud y bienestar propios (“mindfulness”), lo cual llevó a los consumidores a dejar de elegir las bebidas alcohólicas y a buscar nuevas alternativas (por ejemplo, bebidas sin azúcar y/o bajas en calorías). Sin embargo, el nuevo desafío que tiene la industria de las bebidas de desarrollar productos acordes a la demanda moderna, no se cumple por igual en las distintas partes del mundo. Entre los años 2017 y 2021, el mayor crecimiento anual en lanzamientos de nuevas bebidas lo tuvieron Asia y la región del medio este de África con un 9%, seguido por Estados Unidos donde fue de un 8% y en Europa de un 6%, mientras que en Latinoamérica este crecimiento fue de 0% (Food Ingredients, 2022).

## 1.2 Origen del cultivo de frutos cítricos

Las numerosas especies del género *Citrus* provienen de las zonas tropicales y subtropicales de Asia y del archipiélago Malayo; desde donde se distribuyeron a otras regiones del mundo donde actualmente se cultivan cítricos. Su origen se asocia al área del sudeste de Asia, incluyendo el este de Arabia, este de Filipinas y desde el sur de Himalaya hasta Indonesia. Los cítricos se cultivan desde hace más de 4000 años, llegando a Europa hacia el 310 (A.C.)

La naranja dulce (*C. sinensis* (L.) Osbeck) es originaria del sudeste de China en donde fue cultivada durante cientos de años antes de ser conocida en Europa. La naranja agria (*C. aurantium* L.) tiene su origen en el sudeste asiático. Desde allí, los cítricos fueron llevados al norte de África y al sudeste de Europa, siendo los europeos quienes luego los trajeron a América alrededor del año 1500. La naranja de ombligo Washington se originó en Bahía, Brasil, desde donde se llevó a Australia, y Estados Unidos (Florida y California).

El área de origen de las mandarinas (*C. reticulata* Blanco) probablemente esté ubicada en la región de Indochina y sur de China; desde donde habrían sido llevadas por los primeros viajeros hacia el este de la India. Tradicionalmente esta especie se produjo en Asia y desde allí habría sido llevada a Europa a partir del año 1805, es decir más tarde que otras especies de cítricos (a partir del año 1805).

Una vez que los cítricos llegaron a América, se extendieron desde el Caribe y Brasil hacia todo el continente llevados por los misioneros de la iglesia católica, siendo Estados



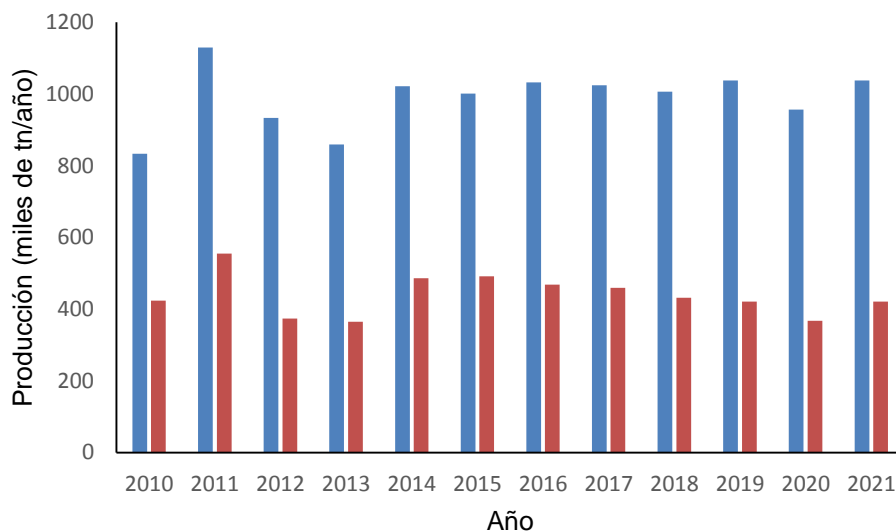
Unidos el país pionero en el desarrollo de tecnologías de producción cítrica, habiendo desarrollado nuevas variedades de cítricos.

### 1.3 Producción de naranja y mandarina en Argentina y en el mundo

A nivel mundial, Argentina se encuentra en el séptimo lugar en la lista de países productores de cítricos (USDA, 2022), produciendo el 3,76% y el 3,23% de las naranjas y mandarinas del mundo, respectivamente. En el año 2021 Argentina exportó 87.954 toneladas de naranja y 52.407 toneladas de mandarinas, lo cual implica el 1,63% y el 1,22%, respectivamente de la exportación mundial. Argentina se encuentra entre los principales países que industrializan cítricos, luego de Brasil y Estados Unidos, quedando en el tercer puesto junto con la Unión Europea y México, seguidos por China y Sudáfrica.

En Argentina, el 46% de los cítricos se producen en la zona del Noroeste, mientras que el restante 54% se produce en el Noreste, siendo en esta última área donde se cultivan el 95% de las mandarinas y el 83% de las naranjas del país. Actualmente, se producen 957.160 toneladas de naranja por año, siendo Entre Ríos y Corrientes las principales provincias de cultivo, al igual que para las mandarinas de las cuales se producen un total de 367.136 toneladas al año. De la producción total de mandarina en el país, el 19% se destina a la industria, el 64% al consumo doméstico y el 17% a la exportación, mientras que para la naranja los valores son 27%, 62%, y 11%, respectivamente. Toda la producción de jugos cítricos concentrados en Argentina, es destinada a exportación, siendo prácticamente nulo el destino para consumo interno (Federcitrus, 2022). Los principales destinos de las exportaciones de mandarina argentina son Rusia, Filipinas y Paraguay, mientras que para naranja Países Bajos, seguido por Paraguay y Rusia son los principales destinatarios (Ministerio de Agricultura, 2021).

**Figura 1.1.** Tendencia de la producción anual (en miles de toneladas) de naranja (■) y mandarina (■) en Argentina (gráfico construido a partir de los datos obtenidos del Informe Regional 2021 del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria).



## 1.4 Cítricos

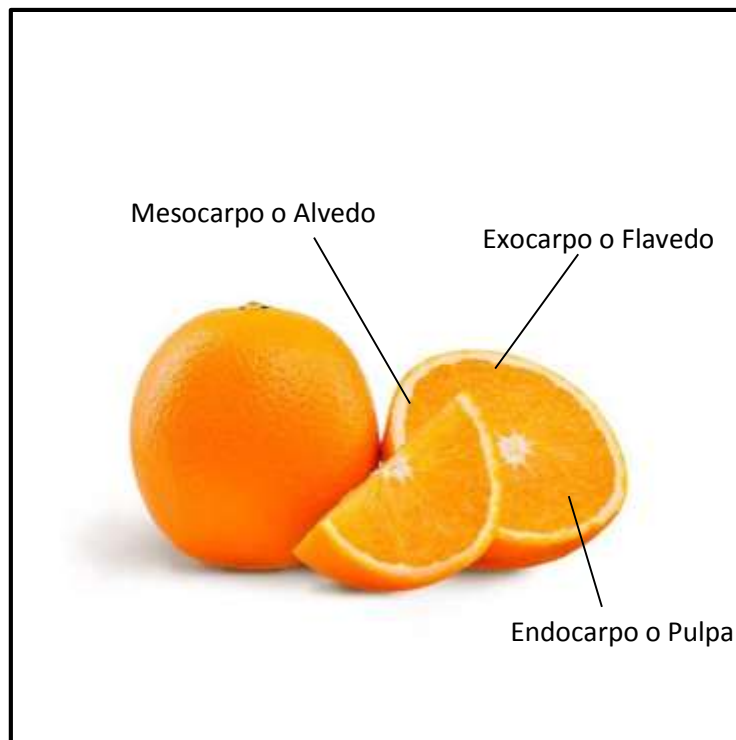
Los cítricos son los frutos de las plantas del género *Citrus*, el cual forma parte de la familia de las rutáceas, arbustos grandes y perennes. En el grupo de las frutas cítricas se encuentran la naranja, la mandarina, el limón, la lima y el pomelo. En particular, la naranja y la mandarina se obtienen de las especies *Citrus sinensis* y *Citrus reticulata*, respectivamente. Una característica fundamental de la familia de cítricos es la alta liberación de aceites esenciales de la cáscara. Desde el punto de vista nutricional, los cítricos se caracterizan por ser fuente de vitaminas (vitamina C, ácido fólico, vitamina A, entre otros), minerales (potasio, magnesio, hierro, entre otros) y antioxidantes. Los cítricos aportan pocas calorías y muchos nutrientes esenciales, por lo cual son frutos de alto interés nutricional y es por ellos que organismos como la Organización Mundial de la Salud recomienda su consumo diario. Todos los frutos cítricos se componen de tres partes principales (**Figura 1.2**):

- **Exocarpo o Flavedo:** es la parte de color de la cáscara o corteza. El exocarpo o flavedo está formado por una epidermis e hipodermis que es de color verde cuando aún no está madura, y que se torna naranja, amarillo o rosado según el caso, cuando ya está en su punto de maduración. Esta parte está compuesta de pequeñas vesículas que contienen aceites esenciales que se utilizan principalmente para realizar perfumes y aromatizantes.

- **Mesocarpo o Albedo:** esta parte también integra la cáscara de los cítricos, pero corresponde a la parte interna de la misma cuyo aspecto es esponjoso y de color blanco. Es la que contiene más pectinas y se utiliza principalmente para la realización de mermeladas aunque también es rica en glucósidos.
- **Endocarpo o pulpa:** Es la parte que consumimos de los cítricos y supone el mayor porcentaje de su peso. Está formado por gajos o sacos de jugo y por las semillas. Aquí es donde se encuentran los diferentes ácidos orgánicos (como la vitamina C), azúcares y agua que aportan esta fruta.

Dentro del endocarpo o pulpa podemos encontrar las siguientes partes: las septas o membranas que son las paredes que separan los gajos, las semillas y el eje central que corresponde a la parte central de la naranja y posee un aspecto esponjoso y blanco, al igual que el mesocarpo o albedo.

**Figura 1.2.** Partes principales de la naranja



#### 1.4.1 Naranja

La naranja *Citrus x sinensis* es la más producida a nivel mundial y en Argentina, siendo el principal cítrico producido en el país, luego del limón. Dentro de esta especie, las principales variedades de naranja que se producen en Argentina para el consumo son:

- ❖ **Navel** (de ombligo): posee intenso color naranja y sabor agridulce, con una adecuada acidez y escasas semillas, por lo cual es ideal para el consumo. Su producción comienza a mediados de abril y culmina en agosto. En este grupo se destacan las New Hall, Washington Navel, Navel Late y Lane Late.
- ❖ **Salustiana**: es una naranja de jugo. Posee una piel fina y no posee semillas. Contiene un alto porcentaje de jugo y un muy buen sabor. Su producción comienza en junio.
- ❖ **Valencia**: es la naranja ideal para jugo. Posee una piel fina, un sabor ligeramente ácido, con alto contenido de jugo. Su producción es tardía ya que comienza a fines de julio. Sus variedades son la Midknight, Valencia y Valencia late.

#### 1.4.2 Composición nutricional de la naranja

La **Tabla 1.1** presenta la composición química y nutricional de la naranja *Citrus x sinensis*. La naranja es una fruta de bajo contenido graso y calórico que posee más de un 80% de contenido de agua en su composición. Entre los sólidos solubles que la componen se encuentran mayoritariamente los carbohidratos como sacarosa, glucosa y fructosa, los cuales se encuentran en una relación de 2:1:1. Las naranjas poseen 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 para quienes las consumen (Henning y col., 2017). Además, es conocido que el consumo de fibra previene ciertos tipos de cáncer (He y col., 2022). La pectina junto a otras sustancias peptídicas son clave en la definición 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 %) (Serment-Moreno y col., 2012).

En cuanto a micronutrientes, la naranja presenta altos contenidos de ácido ascórbico (hasta 500 mg/L), ácido fólico y en menor cantidad, provitamina A (Aschoff y col., 2015). Los jugos de naranja presentan 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, entre ellos la mejora de la absorción de hierro (Frei y col., 2012). Mientras que el ácido fólico ayuda a prevenir defectos en la

formación del tubo neural durante el embarazo (Turner y Burri, 2013). Por otro lado, la naranja posee carotenoides con actividad pro vitamínica A:  $\alpha$  caroteno,  $\beta$  caroteno, y criptoxantina (Abdelaali y col., 2018), y otros sin actividad pro vitamínica A, como luteína y zeaxantina, los cuales contribuyen a mejorar la visión y disminuir el riesgo de padecer cataratas (Rodríguez-Concepción y col., 2018). Los ácidos orgánicos presentes en las naranjas como el málico y principalmente el cítrico, incrementan la absorción de calcio y ayudan a remover compuestos tóxicos del organismo. Estos ácidos, además de ser beneficios para la salud, poseerían actividad antimicrobiana (McKay y col., 2021).

Es importante destacar que las naranjas son muy ricas 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).

**Tabla 1.1.** Composición nutricional de las naranjas cada 100 gramos de porción comestible (Kafkas y col., 2009)

<b>Composición cada 100 g de porción comestible</b>	
Energía (kcal)	42
Proteína (g)	0,80
Hidratos de Carbono totales (g)	8,60
Sacarosa (g)	4,30
Fructosa (g)	2,15
Glucosa (g)	2,15
Fibra (g)	2,00
Calcio (mg)	36,00
Hierro (mg)	0,30
Yodo ( $\mu$ g)	2,00
Magnesio (mg)	12,00
Zinc (mg)	0,18
Sodio (mg)	3,00
Potasio (mg)	200,00
Fósforo (mg)	28,00
Selenio ( $\mu$ g)	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

### 1.4.3 Mandarina

La mandarina es el tercer fruto cítrico más consumido en el país, luego del limón y la naranja. Una particularidad de esta fruta en comparación a los demás cítricos, es la facilidad con la que se desprende su cáscara, lo cual la hace idónea para el consumo directo. Las variedades más producidas en Argentina según el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, son:

- ❖ **Nova:** es una mandarina de cosecha semi-temprana y puede o no poseer semillas según el aislamiento del lote de producción. Es de tamaño mediano y de color anaranjado-rojizo muy brillante. Su cáscara es fina y lisa, puede estar algo adherida a los gajos cuando comienza el período de maduración. La pulpa es firme, de color anaranjado intenso y de un sabor dulce. La relación sólidos solubles/acidez es equilibrada.
- ❖ **Ellendale:** es una fruta mediana a grande (70-80 mm), de color anaranjado-rojizo intenso y de fácil pelado. La pulpa y el jugo son de excelente color y sabor, con una relación sólidos solubles/acidez alta y equilibrada. Su producción es errática ya que algunos años produce fruta y otros no, y la presencia de semillas puede variar según la pureza de la plantación y el aislamiento del lote.
- ❖ **Murcott:** es una especie tardía que se cosecha entre julio y agosto. La fruta es tamaño mediano, firme, achatada y de color amarillo-anaranjado. Posee una cáscara muy fina, bastante pegada a los gajos, pero que se extrae fácilmente. Tiene un alto contenido de jugo (42%) muy dulce y de baja acidez.
- ❖ **Montenegrina:** es una variedad de cosecha semi-tardía que se destina sólo a consumo interno y no a exportación a diferencia de las demás variedades

mencionadas. La fruta es de tamaño generalmente pequeño (diámetro 55-60 mm), de color anaranjado intenso, redondeada y muy firme. Posee semillas y la cáscara es muy fina, fácil de pelar. Tiene tendencia a perder porcentaje de jugo a medida que avanza el período de madurez.

- ❖ **Satsuma Okitsu:** es una variedad de cosecha temprana. La fruta es redondeada, achatada en los polos, de tamaño mediano y de tonalidad verde-amarillenta. Casi no tiene semillas y su cáscara es algo rugosa. La pulpa es muy tierna, de color anaranjado-rojizo.
- ❖ **Nule:** esta mandarina es de cosecha semi-temprana sin semillas en lotes puros. Su tamaño es medio a pequeño y su forma ligeramente achatada. La fruta es de color anaranjado fuerte cuando madura y el grosos de la cáscara es de medio a fino que permite ser pelada con facilidad.

#### 1.4.4 Composición nutricional de la mandarina

La mandarina, al igual que muchas frutas, está compuesta mayoritariamente por agua (85%). Sus principales nutrientes son los hidratos de carbono (13%). La sacarosa es el hidrato de carbono mayoritario, seguido por fructosa y glucosa, representando un 72%, 15% y 13% del total, respectivamente (Navarro y col., 2010). Además posee 0,81% de proteínas y 0,38% de fibra dietaria y 0,31% de grasa. Es una fuente importante de vitamina C, ácido fólico y vitamina A, pero también contiene pequeñas cantidades de las vitaminas B1, B2, B3, B5, B6, B9 and E. En particular, el complejo de vitamina B ayuda a prevenir infecciones, promueve la salud celular y el correcto funcionamiento de las funciones nerviosas, hormonales y regula la producción de colesterol. La mandarina es rica en  $\beta$ -criptoxantina y xantofila los cuales tienen actividad pro vitamina A. Los azúcares, ácidos, carotenoides y la vitamina C en la mandarina son los principales determinantes del color y sabor de esta fruta (Musara y col., 2020).

**Tabla 1.2.** Composición nutricional de las mandarinas cada 100 gramos. (Musara y col., 2020)

<i>Composición cada 100 g de porción comestible</i>	
Energía (kcal)	53

Proteína (g)	0,81
Hidratos de Carbono totales (g)	13,34
Sacarosa (g)	7,62
Fructosa (g)	1,59
Glucosa (g)	2,15
Fibra (g)	1,80
Calcio (mg)	37,00
Hierro (mg)	0,15
Magnesio (mg)	12,00
Zinc (mg)	0,07
Sodio (mg)	2,00
Potasio (mg)	166,00
Fósforo (mg)	20,00
Selenio (µg)	0,10
Tiamina (mg)	0,06
Riboflavina (mg)	0,04
Xantofila (µg)	138,00
Vitamina B6 (mg)	0,08
Vitamina A (µg)	34,00
Ácido fólico (µg)	16,00
Vitamina C (mg)	26,70

## 1.5 Jugos cítricos

Los jugos cítricos están compuestos por una fase líquida y por una fase dispersa que consta de la pulpa. Esta última está constituida por restos de tejidos de las frutas y representa entre un 17 y un 25% del jugo extraído, pero puede reducirse mediante métodos físicos, como la filtración, el tamizado y el centrifugado, hasta alcanzar valores de entre 4 y 6%. En cuanto a la fase líquida, la misma consta de una solución de azúcares, ácidos orgánicos, vitaminas, pectinas, compuestos nitrogenados, flavonoides, pigmentos, minerales y compuestos aromáticos, los cuales provienen de la fruta misma, tal como se describió detalladamente en las *Secciones 1.4.2 y 1.4.4* (Perestrello y col., 2019). El



contenido de sólidos solubles de esta fase dependerá de la variedad del cítrico, el estado de maduración y las condiciones nutricionales de la planta, encontrándose en general entre 7 y 12 °Brix.

Los sólidos solubles presentes en los jugos están compuestos en su mayoría por azúcares ya sea no reductores (sacarosa) como reductores (glucosa y fructosa), los cuales pueden alcanzar hasta un 80% en la fruta madura. Por otro lado, en menor proporción (10%) los compuestos nitrogenados también contribuyen a los sólidos solubles y corresponden principalmente a aminoácidos, proteínas y vitaminas. La vitamina C (ácido ascórbico) se halla en gran proporción otorgando a los jugos cítricos un importante valor nutricional (Borba y col., 2021). A la vez, las frutas cítricas representan una importante fuente de flavonoides, entre ellos la hesperidina y la naringina. La acidez característica a los jugos derivados de los cítricos se debe a los ácidos presentes en estas frutas, entre los cuales, el ácido cítrico es el principal (80%), mientras que en menor proporción se encuentran los ácidos málico, isocítrico, succínico, tartárico y oxálico. Por otro lado, la presencia de las pectinas provenientes del fruto, las cuales son polímeros heterogéneos ricos en ácido D-galacturónico con diferentes niveles de metilación, permite mantener fragmentos de la pulpa en suspensión, otorgando turbidez y cuerpo, por lo tanto viscosidad, al jugo. De todos modos, la presencia en los cítricos de enzimas pectinolíticas conlleva al deterioro de las pectinas y por lo tanto desestabiliza la suspensión generando una pérdida de turbidez y de “cloud”, otorgándole al jugo un aspecto traslúcido y poco atractivo. Entre las enzimas de mayor interés, se encuentran la pectin metilesterasa (PME), la polifenol oxidasa (PPO) y la peroxidasa (POD), las cuales serán descritas en detalle en la *Sección 1.5.3*.

En cuanto al CODEX Alimentarius, éste define al jugo de fruta como el líquido sin fermentar que se obtiene de la parte comestible de las frutas maduras y frescas. Deben prepararse mediante procedimientos adecuados que permitan conservar las características físicas, nutricionales y organolépticas de las frutas de las cuales provienen. Los jugos cítricos pueden ser elaborados a partir de un solo tipo de fruta o bien, más de una fruta, siendo en este último caso un jugo mixto o también llamado “blend”. La combinación de distintos jugos para obtener uno mixto es una alternativa al momento de desarrollar nuevos productos y sabores, y también para lograr un balance entre el dulzor y la acidez de determinados jugos individuales (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2020, <https://www.fao.org/>, visitado: 27/06/2021). Los jugos de fruta exprimidos pueden obtenerse por procedimientos de extracción mecánica directamente de

la fruta fresca o mediante la reconstitución de jugo concentrado de fruta con agua potable (Codex Alimentarius, 2005).

Los grados Brix y el contenido de sólidos solubles exigidos para los jugos será el correspondiente al extraído de cada tipo de fruta. Para el caso de los jugos de naranja y mandarina reconstituidos, los grados Brix no podrán ser menores a 11,2-11,8 y 11,8, respectivamente.

El Código Alimentario Argentino (CAA) incluye a los jugos frutales en el artículo 996 del Capítulo XII donde se describen las bebidas elaboradas a base de jugo, jugo y pulpa y jugos concentrados de frutas u hortalizas dentro de las bebidas analcohólicas. Cuando se trate de jugos para consumo directo, los mismos deben poseer no menos de un 10% de jugo de fruta en su composición y el capítulo establece el marco regulatorio respecto a los aditivos permitidos o no para este tipo de producto, como por ejemplo los reguladores de acidez, edulcorantes y antioxidantes, entre otros. El CAA admite la elaboración de jugos combinados o *blends*, y en este caso exige que el rótulo declare todos los tipos de jugo en orden de concentración decreciente. Excepcionalmente, para el caso de jugos a base de cítricos, permite el mezclado con otro tipo de jugo de cítrico en una concentración de hasta 10% v/v, sin obligatoriedad de declararlo en el rótulo. Para los jugos no gasificados de consumo directo, el CAA establece un máximo de 12° Brix. En cuanto a los jugos concentrados elaborados para su posterior dilución previo al consumo, el CAA exige un mínimo de 20% v/v de concentración de jugo natural. Los aditivos admitidos son los mismos que para las bebidas a base de jugo listas para consumir y el rótulo deberá declarar claramente el porcentaje de jugo de fruta presente en el producto concentrado y el porcentaje del mismo en la bebida final, el cual no podrá ser menor al 10% v/v. Los grados Brix totales del producto concentrado no podrá superar el porcentaje de jugo.

### 1.5.1 Mercado de jugos cítricos

Las tendencias del consumo de bebidas al igual que en el caso de otros alimentos, han cambiado a partir de los últimos años, como se ha mencionado previamente. En el caso de los jugos frutales, éstos están asociados a beneficios para la salud, lo cual ha generado que muchos consumidores modifiquen sus preferencias hacia a una mayor ingesta de los mismos. De acuerdo a un reciente informe de *Mordor Intelligence*, se proyecta que el mercado mundial de jugos de frutas y verduras experimente una tasa de crecimiento anual de 4,85% durante el período 2022 – 2027 (Mordor Intelligence, 2022). Por otro lado, el cierre de muchos comercios minoristas que no lograron superar la crisis generada por la

pandemia tuvo como consecuencia el gran crecimiento del comercio digital. Importantes exponentes del mercado de bebidas, como *The Coca-Cola Company*®, anunciaron que durante los últimos dos años aumentaron las ventas de las bebidas a base de jugos naturales en detrimento del consumo de bebidas carbonatadas, lo cual se asocia al cambio de preferencias de los consumidores por opciones más saludables. De todos modos, el consumo de jugos frutales no es igual en todo el mundo. Los países desarrollados como Estados Unidos, Canadá y países de Europa presentan un consumo *per cápita* alto de este tipo de productos, mientras que en los países menos desarrollados como aquellos de la región de Medio Oriente, África y Sudamérica, es bajo.

En Argentina, los jugos naturales envasados, listos para beber, están teniendo un crecimiento exponencial y sostenido. En la última década, el mercado local ha pasado de comercializar 25 millones de litros por año a 50 millones. El consumo *per cápita* en el país es de 1,1 L/año, el cual representa un valor relativamente bajo respecto de otros países de la región como México y Brasil, en donde es de 1,4 y 1,9 L/año, respectivamente. En cuanto a las marcas líderes comercializadas en el país, Citric® es quien lidera ya que tiene cerca de un 88% de participación. También compete Coca-Cola® con su producto *Cepita del valle*® 100% fruta”, mientras que el resto del mercado, que representa un 3% del mismo, se reparte entre empresas como *PuroSol*®, *Tropicana*® y *Baggio*®. En todos los casos mencionados, se trata de productos procesados por tratamientos térmicos tradicionales.

Por otro lado, existe actualmente un interés de los consumidores por productos novedosos, quienes pretenden encontrar productos desafiantes y/o sabores nuevos. Esta tendencia ha llevado a la industria juguera a desarrollar mezclas o *blends* frutales que permiten ampliar el abanico de sabores ofrecidos sin quedar limitados a las frutas existentes. Un ejemplo de esta tendencia es el crecimiento de la línea *Maaza*® perteneciente a *The Coca-Cola Company*®, la cual ofrece bebidas a base de jugo concentrado de frutas tropicales, y en particular ofrece una línea compuesta por jugos *blend* compuestos por varias de estas frutas que apuntan a los consumidores aventureros, los cuales se comercializan en diversas presentaciones para adaptarse al tipo de consumo (**Figura 1.3**). De todos modos, este producto si bien se comercializa en muchas partes del mundo, aún no ha llegado a comercializarse en el país.

En Argentina crece desde hace unos años, también muy impulsada por las redes sociales, la tendencia a los jugos *blend* bajo el concepto de “detox”, es decir de combinaciones de frutas y verduras, las cuales tendrían importantes beneficios para la salud. En este marco, las opciones y variedades de jugos *detox* han aumentado

significativamente, al igual que su consumo. Existen actualmente algunas marcas comerciales en el país, pero la mayoría se trata de emprendimientos a pequeña escala que se comercializan a través de redes sociales o en pequeños comercios locales dedicados a la alimentación sana. La marca *Pura Frutta*® es la única actualmente presente en los hipermercados. La misma es una empresa argentina fundada en 2017, que bajo el lema de “100% jugo - 0% *chamuyo*”, produce y comercializa jugos frutales naturales sin conservantes, tratados térmicamente para su preservación. Entre sus productos, esta empresa presentó el “más desafiante”, como lo denomina la marca, el cual se trata de un jugo blend detox compuesto por naranja (40%), manzana verde (30%), zanahoria (20%) y remolacha (10%) (**Figura 1.4**). Sin embargo, los jugos *detox* en Argentina son principalmente elaborados por el mismo consumidor, de forma casera, mediante jugueras domésticas, ya que los jugos blend detox comerciales pueden costar hasta un 100% - 150% más que otros jugos frutales comerciales.

**Figura 1.3.** Jugo blend tropical de la marca “Maaza”®, (The Coca-Cola Company®), en presentación 1 Litro.



**Figura 1.4.** Jugo blend detox marca Pura Frutta®, en presentación de tetrapack de 1 Litro.



### 1.5.2 Métodos de obtención de jugos frutales

Los métodos de obtención de los jugos frutales varían de acuerdo al tipo de fruta . Los mismos afectan la calidad y el rendimiento del jugo obtenido (FAO, 2001). Existen máquinas de prensado para cítricos en las cuales se carga las frutas enteras. En un paso previo, las mismas se lavan mediante duchas de agua a presión, que en primera instancia puede contener algún desinfectante como hipoclorito y se realiza sobre rodillos giratorios. En segunda instancia se hace un lavado con agua potable a presión sobre rodillos giratorios con “pelo de caballo” para asegurar una limpieza profunda y eliminar posibles residuos del primer lavado, sin dañar la superficie de la fruta y sin eliminar los aceites esenciales presentes en la cáscara. Luego del segundo lavado, se descarta manualmente la fruta rota o en mal estado. Luego la fruta es transportada por cintas hasta las máquinas exprimidoras donde se obtendrá el jugo.

En este paso se obtiene el jugo y se separa la cáscara. Este prensado puede realizarse con calor, esta metodología es ampliamente aplicada ya que presenta un mayor rendimiento de extracción, pero posee la desventaja de afectar adversamente la calidad nutricional y sensorial del jugo obtenido (Cosme y col., 2018). Entre los métodos más tradicionales se encuentra el prensado en frío mediante una prensa hidráulica a bajas temperaturas. Mediante esta tecnología se obtiene un néctar con altos niveles de nutrientes

y libre de pulpa (Helms, 2014). Existen otros tipos de prensa como la prensa tornillo la cual otorga jugos con mayores contenidos de sólidos y por lo tanto mayor cantidad de compuestos bioactivos, este tipo de prensa es comúnmente utilizada en la extracción de aceites de semillas y otras fuentes (Wilczyński y col., 2019).

Posteriormente a la extracción, los jugos pueden atravesar una serie de operaciones como la filtración, centrifugación, clarificación enzimática, concentración, homogeneización y pasteurización, entre otras ([https://tecnologiaalimentaria.com/proceso\\_citricos.php](https://tecnologiaalimentaria.com/proceso_citricos.php)).

### 1.5.3 Ecología microbiana de los cítricos

Las frutas poseen una microbiota nativa propia, la cual varía de acuerdo a la especie de fruta, la variedad y el clima de la zona de producción, entre otros factores. Esta microbiota puede ser responsable del deterioro de las mismas. Asimismo, las frutas presentan microbiota en su superficie proveniente de fuentes externas como el suelo, el agua, los animales e insectos, entre otros, la cual puede ser contaminantes. Es por esta razón que las frutas frescas son consideradas causales importantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) si es que llegan al consumidor en malas condiciones de higiene y/o son consumidas sin una previa sanitización (Ukuku y col., 2016).

Entre las bacterias patógenas de interés en los jugos frutales, causantes de ETAs, se encuentran comúnmente la *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Lee y col. 2022; Petrus y col., 2020). La contaminación de los alimentos por alguno de estos microorganismos pueden ocasionar grandes brotes entre la población, que muchas veces derivan en muertes. En Estados Unidos, por ejemplo, entre 2009 y 2015 se registraron 5760 brotes por ETAs, los cuales derivaron en 100.939 enfermos y 145 muertes. Entre ellos, los brotes causados por *Listeria*, *Salmonella*, y *Escherichia coli* productora de la toxina Shiga, fueron responsables por el 82% de las internalizaciones y el 82% de las muertes reportadas (Dewey-Mattia y col., 2018). Existen antecedentes que indican que los jugos frutales sin pasteurizar pueden ser vehículos de contaminantes responsables de brotes por ETAs. En 2005, ocurrió un brote de salmonelosis ocasionado por *Salmonella* Typhimurium que se expandió por 23 estados de Estados Unidos. Se logró determinar que los contagios masivos ocurrieron por el consumo de jugo de naranja sin pasteurizar, elaborado por una compañía que no cumplía con las normas de elaboración exigidas por la FDA (Jain y col., 2009).

Por otro lado, la microbiota presente en los cítricos, se compone de hongos, levaduras, y bacterias responsables de deteriorar los productos derivados de esos frutos, si no se aplica tratamientos de sanitización y preservación adecuados. En el primer grupo se encuentran las levaduras, las cuales son los principales responsables del deterioro de los jugos, debido a su fisiología en general ya a que soportan bajos valores de pH y suelen tener la capacidad de crecer en condiciones anaerobias (Salomão, 2018; Shankar y col., 2021). Además, los jugos representan una importante fuente de nitrógeno y azúcares lo cual beneficia el desarrollo de las levaduras, que generan durante su metabolismo, sabor y aroma a “fermentado” debido a la formación de glicerol, ácido pirúvico, acetaldehído y ácido alfa-ketoglutarico. Por último, las levaduras pueden generar pectinasas que causan la desintegración natural de las pectinas propias de la fruta (Salomão, 2018). Entre las levaduras típicas contaminantes de los jugos cítricos, se encuentran los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces* y *Candida*.

En cuanto a las bacterias deteriorativas presentes en los jugos cítricos, se pueden destacar las ácido-lácticas (BAL), tales como *Lactobacillus* y *Leuconostoc* spp. y ácido-acéticas (*Acetobacter* y *Gluconobacter* spp.) ya que se ven favorecidas por el bajo pH de los productos derivados de los cítricos. Este grupo de bacterias puede generar un sabor “a suero de leche” indeseable en el producto debido a la producción de diacetil y acetilmetilcarbinol. La mayoría de las BAL generan otros subproductos metabólicos como el etanol, los ácidos acético y fórmico y dióxido de carbono, causantes del deterioro del alimento (Salmão, 2018).

El microorganismo deteriorativo de mayor interés en la industria de jugos y de bebidas a base de frutas es el *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Se trata de una bacteria acidófila, esporuladora y termo-resistente, la cual produce en los jugos de frutales ácidos una sustancia de aroma y sabor desagradables (“off-flavours”): guaiacol (2-metoxifenol), (Zhai y col., 2020; Wahia y col., 2021). Las esporas de este microorganismo representan el principal inconveniente en la industria juguera ya que las mismas, resisten altas temperaturas de procesamiento, tales como las que aplican para preservar las bebidas frutales. Las esporas de *A. acidoterrestris*, refractarias al tratamiento térmico aplicado, luego germinan en las bebidas envasadas, generando el deterioro de la misma, por ende acortando su vida útil. Las esporas de *A. acidoterrestris* pueden germinar y desarrollarse a temperaturas entre 20-55 °C y a pH de 2,5-6,0. Este microorganismo posee una composición única en su membrana, la cual consiste de ácidos grasos omega ciclohexano, que le permiten sobrevivir a temperaturas altas y pH bajos. La presencia de *Alicyclobacillus*

*acidoterrestis* ha sido reportada en Estados Unidos y Europa causando pérdidas económicas debido al retiro del producto. Esto representa un gran inconveniente en los productos, como muchos jugos de frutas, que eligen aplicar 100% pasteurización térmica sin adición de conservantes. La detección visual de la contaminación por *Alicyclobacillus acidoterrestis* es difícil, ya que no produce gas durante el desarrollo y por lo tanto, no se hinchan los contenedores. La contaminación por *Alicyclobacillus* spp. proviene de los suelos, por lo que el control para evitarla debería iniciarse en los campos de cultivo hasta la sanitización de la fruta cosechada, previo a los procesos industriales (Salmão, 2018).

#### 1.5.4 Enzimas presentes en los cítricos

La presencia de actividad enzimática en los jugos cítricos no procesados representa un inconveniente ya que deteriora a los mismos durante el almacenamiento. Esto se debe a que las enzimas, en los sistemas biológicos como las frutas, participan en reacciones químicas involucradas en la maduración, las cuales devienen en la pérdida de calidad de los productos (Stathers y col., 2020; Roobab y col., 2022).

En particular el pardeamiento enzimático de los jugos cítricos es la principal causa de deterioro, tanto físicoquímico como sensorial, debido a la generación de óxido-reductasas las cuales ocasionan la modificación en el color (Zhou y col., 2018).

Entre las enzimas endógenas más importantes se encuentran la polifenol oxidasa (PPO), la peroxidasa (POD) y la pectin metilesterasa (PME). La PPO es una enzima óxido reductasa, responsable de procesos que involucran reacciones de oxidación en cadena, como la hidroxilación de monofenoles a difenoles, que continúan reaccionando hasta formarse *o*-quinonas, las cuales son de color amarillo. Las *o*-quinonas reaccionan posteriormente con los aminoácidos y proteínas del medio, formando melaninas de color negro, marrón y rojo, lo cual altera el color de los jugos y ocasiona una pérdida de calidad nutricional de los mismos. Por otro lado la POD es una enzima que contiene un grupo hemo, e interviene en reacciones que resultan en el desarrollo de mal sabor y/o olor (“*off-flavour*”) e incluso, pigmentos que degradan los alimentos. Como la POD es una de las enzimas más estables al calor, se la suele implementar como un indicador para la inactivación de enzimas endógenas y de microorganismos durante los procesos térmicos (Morales-de la Peña y col., 2018). Por último, la PME es la responsable de hidrolizar la pectina, lo cual ocasiona el fenómeno conocido como “*cloud instability*” ya que se pierde la homogeneidad de la matriz, la cual se separa en una fase traslúcida abajo y una “nube” en la parte superior.



Este fenómeno también conlleva a una pérdida en la viscosidad del jugo. La PME se encuentra presente en la pared celular de todos los cítricos y es liberada durante el proceso de extracción del jugo. Una vez libre, la PME va reduciendo la pectina a pectinas de bajo metoxilo y ácido péctico, los cuales forman complejos insolubles con el calcio que al precipitar conducen a la pérdida de estabilidad de la nube en los jugos (Roobab y col, 2022).

## 1.6 Métodos de preservación de jugos frutales

Existen numerosos métodos tradicionales de preservación aplicables a los jugos de frutas, como la pasteurización térmica, la concentración, la refrigeración, la filtración por membranas y el uso de conservantes químicos. Por otro lado, en las últimas décadas han surgido como respuesta a las nuevas tendencias de los consumidores, quienes demandan productos similares a los naturales, mínimamente procesados y de alta calidad nutricional, ciertos métodos no-térmicos novedosos. Están aquellos que se pueden considerar “emergidos” como es el caso del tratamiento por altas presiones hidrostáticas (Putnik y col. 2020), los cuales ya se ofrecen en el mercado, y otros que son considerados “emergentes” como los pulsos eléctricos (PEF), el ultrasonido (US) y las tecnologías basadas en el uso de luz dentro de las cuales se encuentra la irradiación de luz. Debido a la gran variedad de métodos de preservación existentes, a continuación se describirán sólo algunos de los tradicionales y emergentes de interés.

### 1.6.1 Tratamiento térmico

El tratamiento térmico como método de preservación implica la exposición de un producto a altas temperaturas, generalmente entre 73 °C y 138 °C por unos segundos o minutos con el fin de eliminar los microorganismos termo-sensibles, que pueden ser patógenos y/o deteriorativos, y así obtener un producto seguro y de larga vida útil (Choo y col., 2023). En el caso del procesamiento de jugos frutales, el tratamiento térmico, también cumple la función de inactivar las enzimas presentes en los jugos, como la polifenol oxidasa (PPO), la lipoxigenasa (LOX), la peroxidasa (POD) y la pectin metilesterasa (PME), las cuales son responsables del deteriorar la calidad de los jugos (Ağçam y col., 2018).

Existen diferentes tipos de tratamientos térmicos que combinan distintas temperaturas y tiempos de exposición, desarrollados a fin de satisfacer por un lado, al consumidor moderno que demanda productos no sólo seguros sino que también nutritivos

y atractivos sensorialmente, y por otro lado a los productores que exigen tecnologías rápidas, de bajo costo y alta eficacia energética. De acuerdo a Ağçam y col. (2018), los cuatro tipos de pasteurización térmica que existen son: Alta temperatura-Largo tiempo (HTLT), Alta Temperatura-Corto tiempo (HTST), Temperatura suave-Largo tiempo (MTLT) y Temperatura suave-Corto tiempo (MTST). Renard y Maingonnat (2012) también incluyen el tratamiento de Ultra Alta Temperatura (UHT) en el procesamiento de jugos, el cual implica muy altas temperaturas por muy cortos tiempos y es normalmente aplicado en plantas industriales de gran envergadura. Las condiciones de los distintos tipos de pasteurización térmica se describen a continuación en la **Tabla 1.3**.

**Tabla 1.3.** Condiciones de tiempo y temperatura de los diferentes tipos de tratamientos térmicos (Renard y Maingonnat, 2012; Ağçam y col., 2018)

<i>Tratamiento</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo (seg)</i>
UHT	138	2
HTLT	80-100	> 30
HTST	> 80	< 30
MTLT	< 80	> 30
MTST	< 80	< 30

Los tratamientos que implican altas temperaturas y largos tiempos de aplicación, como el HTLT, pueden tener efectos adversos sobre los compuestos bioactivos pero logran inactivar efectivamente las enzimas indeseadas además de reducir en gran parte la carga microbiana. Al acortar el tiempo de aplicación del tratamiento, como en las tecnologías UHT y HTST, se logra una mejor preservación de la calidad de los jugos sin dejar de inactivar las enzimas más importantes y lograr una descontaminación microbiana alta ya que la dependencia de la temperatura es mayor en la inactivación microbiana que para la destrucción de los nutrientes (Petruzzi y col., 2017).

Por otro lado, la disminución de la temperatura en los tratamientos MTLT y MTST, se aplica en productos mínimamente procesados a los que se les desea alargar la vida útil. Si bien este tipo de pasteurización genera un menor deterioro de la calidad nutricional y sensorial de los jugos (Petruzzi y col., 2017) y logra inactivar la mayor parte de las enzimas, en muchos casos puede alcanzar sólo inactivaciones microbianas moderadas, lo cual puede representar un problema serio desde el punto de vista de la inocuidad del jugo frutal.

## 1.6.2 Tecnologías no térmicas

### 1.6.2.1 Altas Presiones Hidrostáticas

El tratamiento por Altas Presiones Hidrostáticas (HHP) para la obtención de jugos frutales, es denominado “*cold-pressed*” e involucra la aplicación de una elevada presión hidrostática uniforme e instantánea sobre el alimento, sin generación de calor. Esta tecnología emergió y se adoptó en la industria ya que logra productos seguros y de alta calidad nutricional y sensorial, a diferencia de los tratamientos térmicos tradicionales (Rojo y col. 2019). Durante la pasteurización por HHP se aplican presiones entre 100 y 1000 MPa. La intensidad de presión requerida para lograr la inactivación microbiana dependerá, entre otras cosas, del tipo de microorganismo blanco. Por ejemplo, las células bacterianas vegetativas y los hongos y levaduras son sensibles a presiones entre 200 y 700 MPa (Varela-Santos, 2012). La inactivación microbiana ocurre debido a las modificaciones de la membrana celular que involucran cambios en la permeabilidad, en el intercambio de iones a través de la misma y en la forma celular, y también la desnaturalización de las proteínas y enzimas.

En cuanto a los costos de la tecnología HHP, si bien han disminuido desde el auge de su desarrollo y aplicación, alrededor de los años ´90, en la actualidad continúa siendo un proceso muy costoso. Posee una alta inversión inicial de equipamiento e instalación, por esa razón es aplicable a productos “premium” cuyos consumidores estén dispuestos a pagar un precio elevado en relación a otros productos (Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, 2011).

### 1.6.2.2 Pulsos de luz de alta intensidad

En el procesamiento con luz pulsada, se emite radiación en forma de pulsos de corta duración en un rango de longitudes de onda que va de la región ultravioleta (UV) a la región del infrarrojo cercano (NIR) del espectro electromagnético. Las longitudes de onda UV comprenden de los 180 a los 400 nm, las visibles se sitúan entre los 400-700 nm y las NIR comprenden entre los 700 y 1100 nm (Dhar y col, 2022). El factor determinante en la eficiencia del tratamiento por luz pulsada, es la dosis o fluencia aplicada. De todos modos, al ser una tecnología lumínica también influyen la distancia de la muestra de la fuente de luz, el grosor de la misma, el color, la opacidad, la viscosidad y la presencia de partículas, entre otros factores (Pataro y col., 2011).

La inactivación microbiana por luz pulsada puede atribuirse a distintos efectos como el fotoquímico, fototérmico y/o foto físico. El efecto germicida de la región UV de los pulsos (efecto fotoquímico) se debe a la formación de dímeros de pirimidina, principalmente de timina. Este efecto inhibe la replicación del ADN, lo que conduce a la inactivación celular. Por otro lado, el efecto fototérmico está vinculado al daño generado por un aumento en la temperatura local de los microorganismos durante tratamientos prolongados de luz pulsada (Preetha y col., 2021).

El procesamiento con luz pulsada ha dado resultados prometedores para la inactivación de microorganismos en jugos de manzana y de naranja (Sauer y Moraru, 2009; Pataro y col., 2011; Ferrario y col., 2013). Adicionalmente, se ha observado que el tratamiento con luz pulsada genera mínimo impacto sobre parámetros de calidad vinculados a los jugos frutales y vegetales como el color, °Brix, pH, el contenido fenólico total y la capacidad antioxidante (Palgan y col., 2011). A nivel industrial, la luz pulsada se utiliza hoy en día, como segundo tratamiento (de refuerzo) al momento del envasado y cierre, pero aplicado a la sanitización del envase lleno y tapa, intercalado en la línea de producción. Un ejemplo de ello es la solución integrada que se viene aplicando desde 2012, para un consorcio de tres empresas Claranor-Loeherke-Vilsa en el envasado de bebidas livianas frutales, aguas y jugos (Claranor, 2020).

### **1.6.2.3 Campos eléctricos pulsados**

El tratamiento por campos eléctricos pulsados o PEF (del inglés *Pulsed Electric Fields*) implica la exposición del producto a campos eléctricos pulsados ( $10\text{-}50\text{ kV cm}^{-1}$ ) de corta duración ( $1\text{-}100\text{ }\mu\text{s}$ ) a temperatura ambiente o mínimamente por encima de la temperatura del producto. La inactivación microbiana mediante esta tecnología se basa en la formación de poros en la membrana celular (electroporación) debida a la corriente eléctrica aplicada al alimento (Puligundla y col., 2018). De acuerdo a estudios publicados y al igual que otras tecnologías emergentes, permite prolongar la vida útil de productos como leche, vino y jugos frutales, sin detrimento de su calidad físico-química y sensorial, (Niu y col., 2020).

### **1.1.1.1 Ultrasonido**

El Ultrasonido (US) abarca las ondas sonoras con frecuencias iguales o mayores a 20 kHz y puede clasificarse como “de baja intensidad” cuando la misma es menor a  $1\text{ W/cm}^2$  y “de alta intensidad” cuando es de 10 a  $1000\text{ W/cm}^2$ . En los líquidos, el US de alta

intensidad causa oscilaciones de las moléculas, creando ciclos de compresión y expansión. Estos cambios de presión provocan el fenómeno conocido como cavitación, el cual implica la formación y colapso de microburbujas dentro del líquido (Rios-Romero y col., 2018). Este proceso tiene efectos sobre las propiedades físico-químicas de la matriz, en el caso de los jugos ocurre la ruptura de determinadas estructuras celulares, mediante la cual se destruyen los microorganismos presentes, se inactivan las enzimas y se liberan compuestos bioactivos (Rios-Romero y col., 2018; Paniwnyk, 2017). Al aplicar US, otros mecanismos ocurren simultáneamente, entre ellos efectos térmicos, estrés mecánico y la formación de radicales libres (Zafra-Rojas y col., 2013). Todos ellos están involucrados en la inactivación microbiana ya que generan el adelgazamiento de la pared celular, calentamiento localizado y el efecto nocivo de los radicales libres sobre las células (Ferrario y col., 2015). Si bien es una tecnología promisoría, no ha encontrado aún, el nicho de aplicación industrial para el procesamiento de bebidas de base frutal (Guerrero y col., 2016).

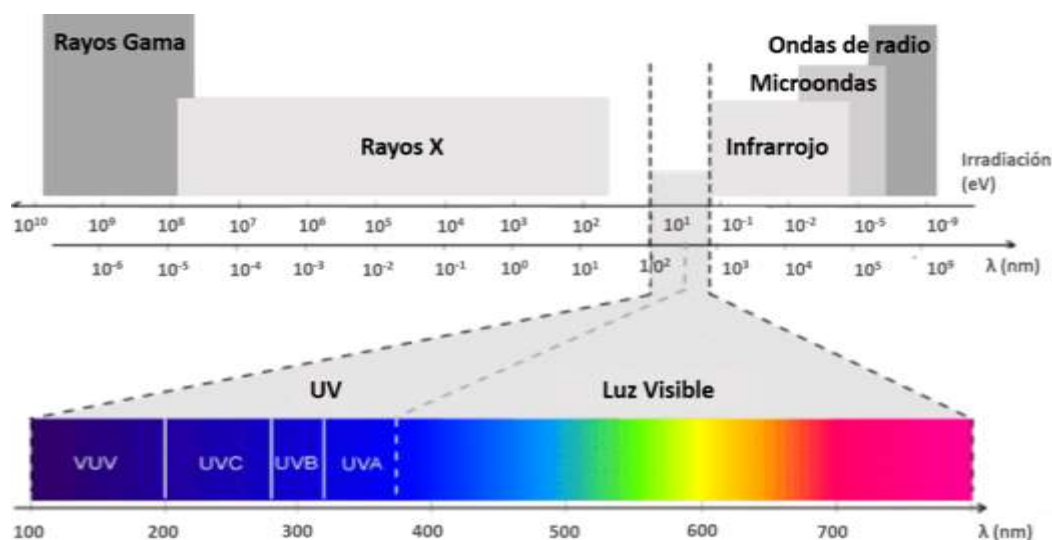
#### **1.1.1.2 Luz Ultravioleta de Onda Corta**

La luz ultravioleta de onda corta (UV-C) es una de las tecnologías de inactivación microbiana basadas en el uso de luz que más interés ha cosechado en las últimas décadas para su aplicación en alimentos. Esto se debe a que es una tecnología de bajo costo de implementación y mantenimiento, que no deja residuos, segura y amigable con el medio ambiente (Kaya y Unluturk, 2016). Es ampliamente utilizada en la desinfección de superficie y utensilios, y desde el año 2001 ha sido aprobada por la *Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos* (US FDA) para el procesamiento de agua y como alternativa a la pasteurización térmica de jugos frutales (US FDA, 2019). Además, la FDA estableció en el Código de Regulación Federal (Sección 179, Título 21, Capítulo 1, Subcapítulo B), que la irradiación con luz UV-C para el tratamiento y procesamiento de jugos frutales, es segura bajo las siguientes condiciones: (a) que la fuente de irradiación sean lámparas de mercurio de baja presión con el 90% de su emisión en la longitud de onda de 253.7 nm, y (b) que sea en condiciones de flujo turbulento con un número de Reynolds mayor o igual a 2200 (FDA, 2006). 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., 2020) y vegetales (Demir y col., 2020). En el caso de otros alimentos líquidos como vinos, cervezas y leche, la reglamentación no está definida pero la tendencia es la misma (Antonio-Gutiérrez y col. 2019a). Por otro lado, en el año 2003, Canadá aprobó el uso de la unidad denominada *CiderSure 3500 UV* (FPE Inc., N.Y., U.S.A.) para el

tratamiento de jugos de manzana. En 2006, el Comité Nacional Asesor en Criterios Microbiológicos para Alimentos de los Estados Unidos (NACMCF) admitió al UV simple o combinado con otras tecnologías, como alternativa posible a la pasteurización tradicional (NACMCF 2006). En la Unión Europea, el UV-C es considerado un proceso de irradiación, por lo cual no posee una legislación armonizada y debe ser aprobada para cada producto (Guerrero y col. 2022).

La luz ultravioleta de onda corta (UV-C) es aquella que comprende el espectro electromagnético que va entre 100 y 400 nm. Dentro de este rango se encuentra incluida la luz UV-C que abarca desde los 200 hasta los 280 nm, siendo 253,7 nm la longitud de onda con mayor poder germicida (**Figura 1.5**).

**Figura 1.5.** Espectro de radiación electromagnética.



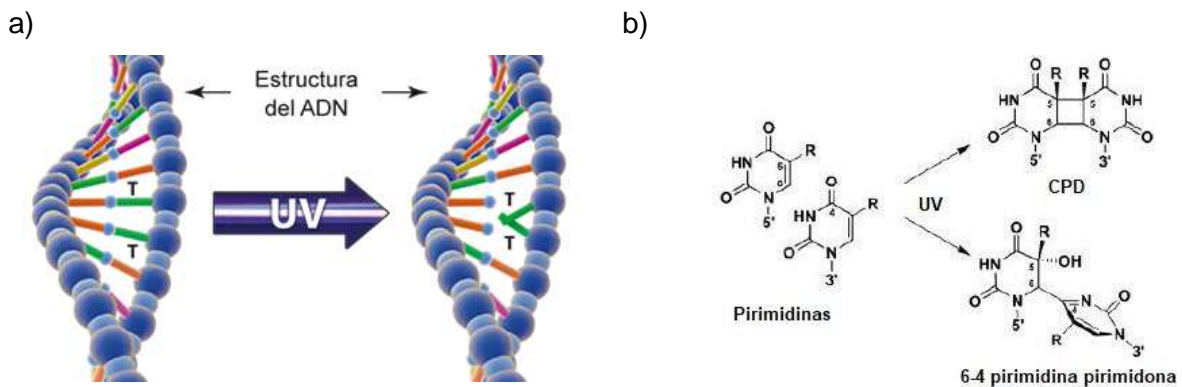
### 1.1.1.3 Mecanismo de inactivación microbiana por luz UV-C

Los fotones de luz UV-C al alcanzar a los microorganismos dentro de un alimento, generan diversas reacciones fotoquímicas que ocasionan la inactivación microbiana. En particular son las bases de pirimidina y purina del ADN las que absorben estos fotones y reaccionan formando los llamados dímeros ciclobutano pirimidina (CPDs) y los fotoproductos de 6-4 pirimidin-pirimidona (6-4 PP) (**Figura 1.6 a, b**). Para que esto ocurra dos bases de pirimidina deben ser adyacentes y el fotón debe ser absorbido por una de ellas. Los CPDs son anillos de cuatro miembros que se forman entre los átomos de carbono 5 y carbono 6 de cada pirimidina vecina mientras que los 6-4 PP implican la interacción de

un átomo de carbono de cada miembro (Poepping y col., 2014). Estas mutaciones del ADN son las que logran el impedimento de la replicación celular.

Se han reportado dos mecanismos de reparación al daño por luz UV-C por parte de las células microbianas denominados: “foto-reactivación”, el cual es dependiente de la luz y, “reparación oscura”, mecanismo independiente de la luz. Durante la foto-reactivación, los CPDs son desintegrados por la enzima fotoliasa en presencia de luz ultravioleta cercana (UVA, 315-400 nm). En cambio, durante la reparación oscura, la célula reemplaza el ADN dañado por nucleótidos nuevos y sanos (Wen y col., 2019). Ambos fenómenos implican un inconveniente al momento de proponer la tecnología UV-C para la preservación de alimentos ya que disminuyen su eficacia y ponen en riesgo la seguridad de los productos.

**Figura 1.6.** Esquema del efecto de la luz UV sobre el ADN (a) y formación los dímeros ciclobutano pirimidina (CPDs) y de 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4 PP) por acción de la luz UV (b) (adaptado de Mitchell y Nairn, 1989).



#### 1.1.1.4 Susceptibilidad de los microorganismos a la luz UV-C

No todos los microorganismos son igualmente susceptibles al tratamiento por UV-C. En general los hongos y levaduras presentan mayor resistencia que las bacterias debido a la diferencia en la composición de la pared celular como puede ser la presencia de pigmentos protectores de la luz (Gouma y col., 2015). Por otro lado, el menor tamaño de las células bacterianas respecto de las levaduras podría beneficiar el paso del haz de luz alcanzando de este modo a más células que absorberían una mayor cantidad de fotones de luz. Por otra parte, las bacterias poseen una mayor proporción de pirimidinas en su ADN

que las levaduras, lo que facilita la generación de dímeros y la mutagénesis (Pala y Toklucu, 2013).

Como generalidad se puede establecer que las bacterias Gram-negativas son más susceptibles a la radiación UV-C que las Gram-positivas y las levaduras. Luego, estas últimas son menos resistentes que las bacterias formadoras de esporas y que las esporas de hongos; y, por último, los virus presentan la mayor resistencia (Torkamani y Niakousari, 2011).

#### 1.1.1.5 Dosis/Fluencias

Es importante conocer la dosis que se está aplicando al tratar alimentos por luz UV-C ya que es un factor crítico en la eficacia del proceso. A pesar de ello, no existe hasta el momento en la literatura, uniformidad y acuerdo en cuanto al tipo de dosis y las unidades reportadas, y es por eso que la información provista en las distintas publicaciones científicas puede ser confusa y muchas veces poco comparable. Por otro lado, es necesario distinguir entre los conceptos de energía, dosis y fluencia. En este aspecto, la *IUVA -International UV Association* define del siguiente modo:

- **Dosis UV:** Cantidad de irradiación UV absorbida por una población de microorganismos expuesta ( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ).
- **Fluencia UV:** La energía radiante total incidente en una esfera infinitesimal (célula o compuesto). Técnicamente, este término es más preciso que el término más comúnmente utilizado "dosis UV".
- **Intensidad UV:** Campo de irradiancia de un sistema germicida (UVGI) ( $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  a 1m). Sinónimo de la irradiancia UV. La intensidad UV depende de la distancia a la lámpara y de la transmitancia UV (UVT%).
- **Irradiancia UV:** La energía radiante total incidente en alguna superficie desde todas las direcciones ( $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  a 1m). La intensidad UV depende de la distancia a la lámpara y de la UVT (%).

Para un dado procesamiento por luz UV-C, se pueden definir cuatro tipos de fluencias.

En primer lugar, se puede determinar *la fluencia UV-C incidente* ( $H_i$ ,  $\text{J}/\text{m}^2$ ), la cual se define como la energía que alcanza la superficie del producto y depende de la irradiancia incidente ( $I_0$ ,  $\text{W}/\text{cm}^2$ ) la cual puede medirse con un radiómetro ubicado a una determinada distancia de la fuente de luz. Esta medida debe constatarse permanentemente a lo largo de



la vida útil de la lámpara. La  $H_i$  es la dosis más comúnmente reportada para operaciones discontinuas y no es dependiente de las características de la matriz alimentaria que está siendo tratada.

A la vez, la *fluencia absorbida* ( $H_r$ ,  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ), es aquella que se ve afectada tanto por la matriz en estudio como por el diseño del reactor y puede ser computada como función del tiempo de exposición. La misma se refiere al total de la energía UV que es absorbida y dispersada por los componentes del fluido en tratamiento. La  $H_r$  se reporta tanto para operaciones batch como continuas. Esta dosis depende de las características de la matriz y puede calcularse en función del tiempo de exposición ( $t$ ).

Por último, la *fluencia entregada o germicida* ( $H_d$ ) se refiere a la energía remanente que no fue absorbida ni dispersada por los componentes de la matriz y se encuentra, por lo tanto, disponible para lograr la inactivación microbiana. Esta dosis se puede estimar mediante una reacción química denominada actinometría o mediante una biosimetría. La primera es puramente la dosis entregada a la muestra e involucra el uso de un dúo de compuestos químicos (p.e. yoduro/yodato) que al ser expuestos a la luz UV, reaccionan formando un compuesto coloreado (Koutchma y col., 2016) y permite cuantificar la energía de la luz UV irradiada a través de la generación de la reacción fotoquímica. La biosimetría, en cambio, involucra la inyección de un pulso de suspensión microbiana que funcionará como trazador y luego se determina la dosis necesaria para lograr la reducción de 1 ciclo logarítmico ( $D_{10}$ ) de la población microbiana. De esta manera, el enfoque biosimétrico tiene en cuenta dos aspectos relevantes que determinan la eficacia del proceso, la fluidodinámica del reactor y también la distribución de dosis UV-C en el mismo. Se basa en la respuesta del microorganismo y en la distribución de la dosis dentro del reactor, lo cual da información sobre cómo la dosis UV es absorbida por el mismo en la matriz alimentaria (Müller y col. 2014). Esta información permite estimar la susceptibilidad de los distintos tipos de microorganismos a la luz UV-C (Koutchma y col. 2009). En lo que respecta a alimentos líquidos (p.e. leche, huevo líquido) y a bebidas (p.e. jugos) existen dos grandes grupos de microorganismos indeseados: los patógenos (p.e. *Escherichia coli*; *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*) y los deteriorativos (como los hongos y levaduras, *Alicyclobacillus acidoterrestris* y *Lactobacilli*). De acuerdo a la bibliografía publicada, los últimos presentan mayores valores de  $D_{10}$  ( $D_{10} = 10 - 40 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ ) que los patógenos y sus subrogantes ( $D_{10UV} = 2 - 10 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ ) (Guerrero y col, 2022). De este modo, para un dado microorganismo en una determinada matriz alimentaria, se podrá calcular la *dosis de reducción equivalente* (RED, del inglés *Reduction equivalent UV dose*) que será el valor de

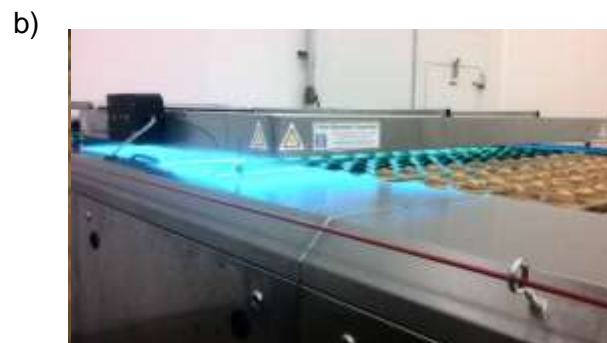
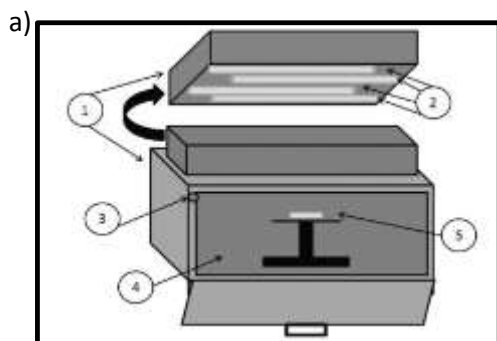
$D_{10}$  multiplicado por los ciclos logarítmicos reducidos exigidos por la FDA. La reducción microbiana requerida varía según la acidez y composición del producto ya que estos factores afectan la resistencia de los microorganismos al UV. Por lo tanto, para los patógenos, se exigirán 5 reducciones logarítmicas en alimentos y bebidas y, 7 ciclos logarítmicos en huevo líquido (Koutchma y col. 2016; Guerrero y col, 2022).

#### 1.1.1.6 Equipos UV-C disponibles

Existen diversos equipos para el tratamiento de alimentos por luz UV-C. El diseño de los mismos dependerá de si se trata de alimentos sólidos o líquidos, de la escala de trabajo y del funcionamiento en modo discontinuo o continuo.

En el caso de alimentos sólidos, los equipos tienen un formato común, el cual generalmente se basa en un compartimento dentro del cual se encuentran las lámparas UV-C en la parte superior, las cuales irradian sobre un estante donde se colocan las muestras sólidas que se desea tratar (**Figura 1.7**) (Butot y col., 2018; Pedrós-Garrido y col., 2018). Este podrá ser cerrado para procesamientos discontinuos (**Figura 1.7.a**) o bien, abierto e intercalado en la línea de producción sobre cinta transportadora por donde circulan las muestras (**Figura 1.7.b**). Para el caso de los alimentos líquidos, como los jugos frutales, de acuerdo a las exigencias de la FDA, el esfuerzo se ha focalizado en desarrollar equipos continuos que trabajen en condiciones de flujo turbulento. De todos modos, a escala laboratorio existen equipos continuos de flujo laminar.

**Figura 1.7.** a) Equipo de procesamiento discontinuo por UV-C de alimentos sólidos. 1- Carcasa, 2-Lámparas UV-C, 3-Traba de seguridad, 4- Cámara de tratamiento, 5- Muestra (tomado de Pedrós-Garrido y col. 2018); b) Equipo de procesamiento UV-C en modo continuo.



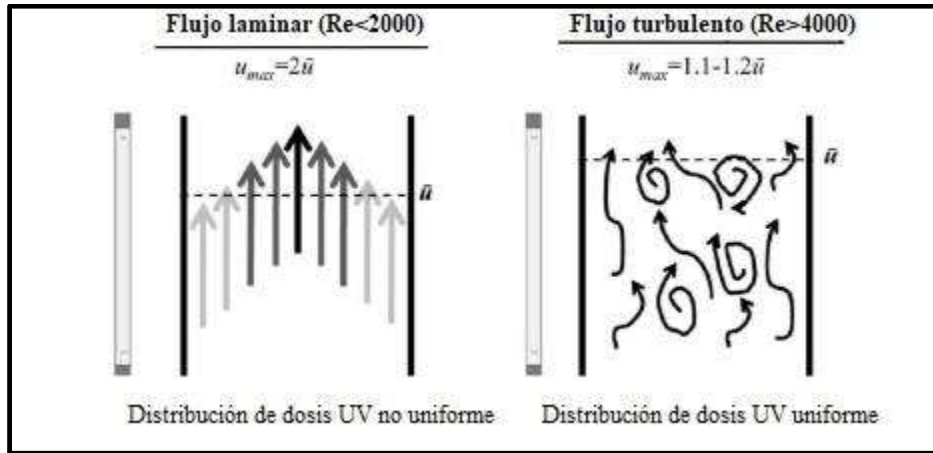
En el caso de los alimentos líquidos, un buen diseño de reactor es aquel que permita que cada elemento de volumen en el líquido resida el mismo tiempo dentro del reactor y se exponga de igual manera a las fuentes luz, de modo tal que todos los microorganismos presentes en la matriz reciban una dosis de UV equivalente.

El costo estimado de un reactor UV-C de escala industrial se halla entre los 10.000 y 15.000 dólares americanos, en comparación con los costos más elevados de los equipos de pasteurización térmica que están en los 20.000-30.000 dólares (Shah y col., 2016). En adición, los costos de energía por procesamiento con UV-C son menores que los del procesamiento térmico.

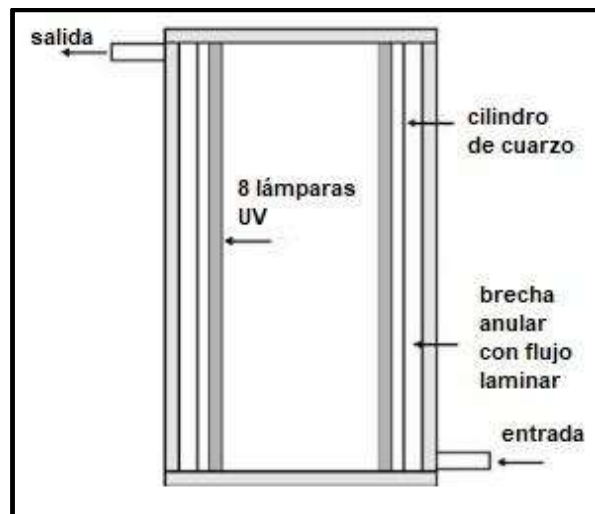
En la actualidad, existe una amplia gama de equipos UV-C estáticos y de flujo continuo que han sido validados para tratar desde jugos tropicales hasta productos más comunes como el jugo y la sidra de manzana. Existen 3 tipos de reactores de tipo continuo en base al flujo generado en su interior: de flujo 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 (**Figura 1.8**). La máxima velocidad del líquido en circulación es detectada en el centro, siendo el 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 (**Figura 1.9**) y el reactor conocido como de flujo Taylor-Couette (**Figura 1.10.a,b**). 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).

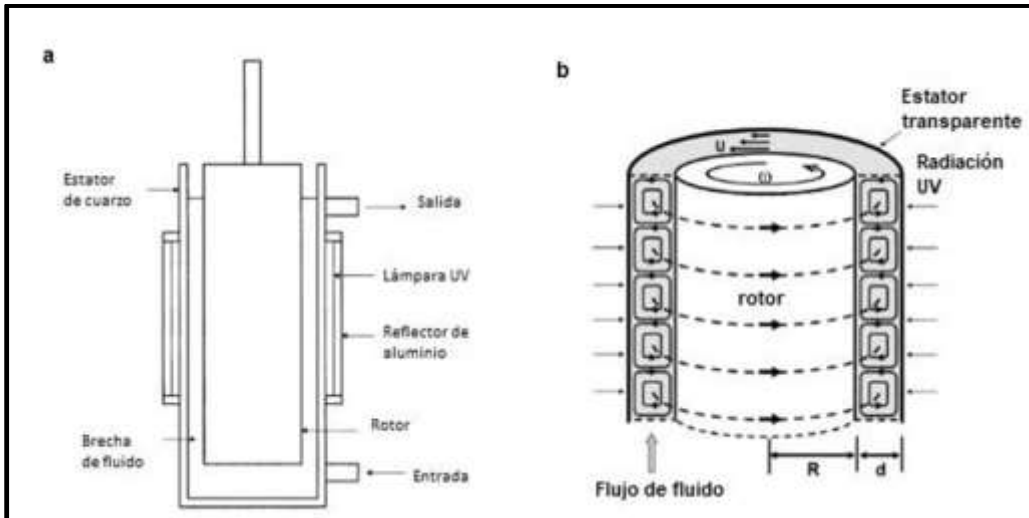
**Figura 1.8.** Patrones de flujo en reactores de luz UV-C (adaptado de Koutchma y col., 2009).



**Figura 1.9.** Esquema del reactor UV-C comercial CiderSure 3500 (adaptado de Koutchma, 2009).

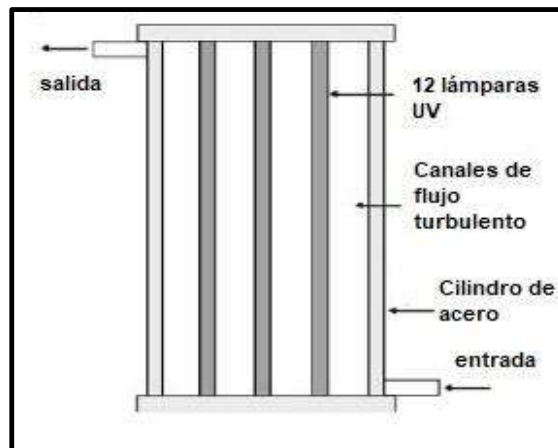


**Figura 1.10.** a) Esquema de un reactor UV-C laminar del tipo Taylor-Couette; b) Generación de vórtices de Taylor entre dos cilindros concéntricos:  $d$  (ancho del espacio anular) y  $R$  (radio del rotor) (adaptado de Forney y col., 2004).



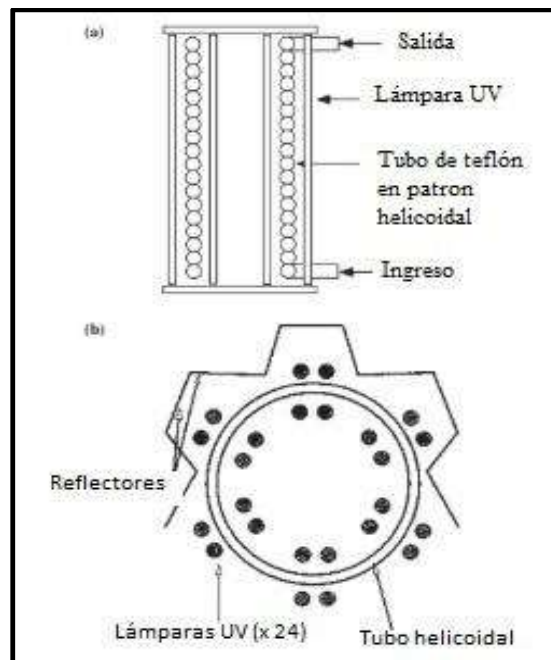
Los reactores de flujo turbulento se basan en aumentar la turbulencia interna para aproximar a todos los elementos del líquido a la luz UV-C durante el procesamiento, presentando valores de  $Re_h$  superiores a 4000. Las tasas de flujo más altas alcanzadas generan mayor homogeneidad del flujo cuando 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 (**Figura 1.11**) y PureUV presentan este tipo de flujo.

**Figura 1.11.** Esquema de un reactor UV comercial Aquionics (adaptado de Koutchma, 2009).

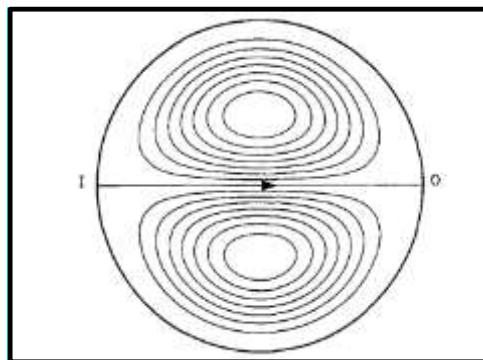


Los reactores del tipo de flujo de Dean presentan un tubo helicoidal en contacto con lámparas por dentro y fuera de la hélice, lo que incrementa la irradiancia UV del líquido a tratar y la uniformidad en el procesamiento. El tubo helicoidal promueve la generación de turbulencia y de un efecto de flujo secundario llamado efecto de Dean, que resulta en una velocidad de circulación y una 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 (**Figura 1.12**).

**Figura 1.12.** a) Esquema de un reactor de flujo de Dean; b) Corte del interior del reactor (adaptado de Koutchma y col., 2007); c) Esquema de vórtices secundarios dentro de una tubería helicoidal (Moulin y col., 1996).



c)



### 1.1.2 Tecnologías asistidas para la preservación de alimentos

En las últimas 3 décadas, la academia y la industria han trabajado mancomunadamente en desarrollar y aplicar tecnologías no térmicas de procesamiento con el objetivo primordial de reemplazar el tratamiento térmico tradicional que se aplica a alimentos y bebidas debido al, como ya se ha mencionado, detrimento severo en la calidad de los mismos por la utilización de altas temperaturas durante el procesamiento y también en busca de tecnologías que impacten positivamente en el medioambiente. Sin embargo, para alcanzar una efectividad en la inactivación microbiana comparable al tratamiento térmico, estas tecnologías no térmicas requieren, en la mayoría de casos de una asistencia de otras tecnologías, ya sea tradicionales (descenso de pH, temperatura moderada, etc.) o emergentes (agregado de aditivos naturales, etc.), o bien el diseño de un proceso asistido, el cual podrá ser aplicado en serie o en simultáneo, teniendo generalmente diferente efectividad (Guerrero y col., 2022). Una adecuada aplicación de tecnologías de preservación combinadas o bien, asistidas, implica la utilización de herramientas que permitan conocer el modo en que los microorganismos son afectados por los diferentes factores de estrés de modo tal de combinar las mismas de un modo inteligente (Wen y col., 2019). El objetivo de este concepto es seleccionar y combinar factores de preservación o barreras o bien, asistir a una tecnología primordial por otro factor, de forma tal que la estabilidad y seguridad microbiológica puedan ser garantizadas, reteniendo o bien mejorando, las características organolépticas, nutricionales y el perfil sensorial (La Cava y Sgroppo, 2019). En la actualidad, existen más de 60 tecnologías con efectos sobre la preservación de los alimentos, pero no todas ellas pueden ser aplicadas sobre los mismos tipos de productos (Putnik y col., 2020). Al usar sólo una tecnología, el daño ocasionado en los microorganismos puede, muchas veces, revertirse durante el almacenamiento y por lo tanto, tener un comportamiento refractario al procesamiento aplicado, pudiendo causar un perjuicio mayúsculo en la inocuidad si se dieran determinadas condiciones ambientales durante el almacenamiento. Una correcta aplicación de tecnologías asistidas, podría prevenir la recuperación de estas células microbianas refractarias y lograr mayores niveles de inactivación, especialmente si sus mecanismos de acción son diferentes. Estas barreras pueden incluir la disminución de la temperatura, pH o actividad de agua (por adición por ejemplo de NaCl o azúcares); el calentamiento mínimo; o la adición de antimicrobianos. Para que este concepto sea aplicado exitosamente, es necesario cuantificar la influencia

de los distintos factores sobre el crecimiento microbiano (Guerrero y col, 2022). La aplicación del mismo ha sido muy exitosa en los últimos años, dentro del conjunto de tecnologías de preservación de mínimo procesamiento, y ello ha sido posible debido a los grandes avances logrados acerca del conocimiento del modo de acción de los distintos factores de preservación y de su interacción en los microorganismos.

La estabilidad u homeostasis del medio interno (composición y volumen de los fluidos) es vital para la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos. En los alimentos preservados por factores asistidos, la homeostasis activa de los microorganismos vegetativos y la homeostasis refractaria pasiva de las esporas se interfieren en “un número de sitios” o de “manera cooperativa”, utilizando factores de conservación asistidos, aplicando cada uno de ellos en forma no letal, disminuyendo la severidad de los tratamientos. Por ejemplo, en el caso de células vegetativas, se reduce la disponibilidad de energía (removiendo O<sub>2</sub>, limitando nutrientes, reduciendo la temperatura) y/o se incrementa la demanda de energía (reduciendo a<sub>w</sub> y pH, añadiendo compuestos activos a nivel de membrana). Para esporas, se trata de dañar estructuras claves ya sea por ataque químico, enzimático o físico sobre el córtex o provocar la germinación de las mismas (con “falsos disparadores”, por aplicación de altas presiones, etc.) (Gould, 1996).

El diseño inteligente de tecnologías combinadas, el cual podrá ser de aplicación simultánea o bien en serie, puede ser utilizado para demostrar las interacciones intrínsecas entre los factores de preservación. Las interacciones *antagónicas* pueden ocurrir cuando dos o más factores de preservación interactúan a modo de disminuir los efectos combinados esperados de las observaciones de la efectividad individual de dichos factores. Las interacciones *sinérgicas* ocurren cuando la combinación de factores de preservación produce una mayor acción inhibitoria que lo esperado por la acción individual de los factores. Los efectos *aditivos*; *más que aditivos* e *indiferentes* están comprendidos entre las tendencias antagónicas y sinérgicas. Los dos primeros conceptos se refieren a la inactivación obtenida cuando la combinación de las barreras resulta en la adición, o bien algo más que la adición, de las barreras aplicadas de modo individual; mientras que el segundo concepto se refiere a que el efecto combinado no excede o es igual al mayor efecto individual. La selección racional de barreras a aplicar en cuanto al tipo e intensidad, debiera resultar en interacciones *sinérgica* ó *más que aditiva* (Guerrero y col., 2022). Esto implica que se obtiene un método de preservación más efectivo a partir de la aplicación de factores de estrés de pequeña intensidad dirigidos a distintos sitios blanco (preservación multiobjetivo), en vez de la aplicación de factores de estrés de baja intensidad dirigidos al



mismo sitio blanco. La selección de los factores de estrés a combinar no es sencilla. En cuanto al crecimiento microbiano diversos autores han concluido que los efectos de las combinaciones inhibitorias son en general aditivos y no sinérgicos, excepto cuando un factor modifica un “blanco” microbiano para hacerlo más accesible al segundo factor, o bien cuando se está en la región de la interface “crecimiento-no crecimiento” (McMeekin y col., 2000). En cuanto a la inactivación microbiana, no están todavía determinadas las bases que soportan la aditividad o la sinergia. Sin embargo, en cualquiera de los dos casos, las características de aditividad o sinergia pueden depender del patógeno que se esté considerando. En el caso de la asistencia, se refuerza el efecto de una tecnología principal aplicando de modo simultaneo una baja dosis de otro factor en cuestión.

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

En general, muchas de las tecnologías emergentes, aplicadas a niveles tales que no impacten significativamente en la calidad del alimento, son procesos que no alcanzan el equivalente de pasteurización y sólo pueden pensarse en el marco de sistemas combinados o multifactoriales de conservación para lograr mayor reducción en la población microbiana y/o la inhibición del crecimiento de la flora resistente a alguno(s) de los factor(es) de inactivación (Guerrero y col., 2016). De todos modos, es necesario profundizar sobre el mecanismo, conocer la cinética de inhibición/inactivación microbiana y el efecto de la intensidad de los factores cuando se están considerando nuevas combinaciones o asistencias de técnicas alternativas. La combinación inteligente de tecnologías emergentes de preservación toma particular relevancia en productos derivados de frutas debido al bajo pH que caracteriza a este tipo de alimentos, lo cual constituye un obstáculo adicional que coopera en la estrategia de preservación global (Putnik y col., 2020).

La adopción de altos estándares en el control de calidad, buenas prácticas de manufactura y el sistema HACCP son esenciales para asegurar la calidad microbiológica

del producto. Más aún, debido a los reducidos márgenes de seguridad, los distintos organismos de contralor internacionales han recomendado el uso de “obstáculos” adicionales en el diseño de los sistemas de preservación tal que procesos, distribución y almacenamiento no adecuados puedan todavía garantizar productos microbiológicamente seguros. Así, el uso de varios factores juega un importante rol en la seguridad microbiológica de aquellos productos donde los puntos críticos de control sean imposibles o difíciles de controlar.

## **1.2 Ingeniería de la seguridad alimentaria**

En las últimas décadas la seguridad alimentaria ha tomado gran relevancia debido a la alta incidencia de brotes ocasionados por ETAs en el mundo. En primer lugar, los daños a la salud y el alto número de muertes que ocasionan estos eventos; y en segundo lugar, la gran pérdida económica que representa para un país cada vez que un brote acontece, exige que se aborde el problema de manera integral y definitiva. Es por ello que la seguridad alimentaria debe ser abordada desde una perspectiva ingenieril multidisciplinaria que contemple la totalidad del proceso de producción, desde el campo hasta la mesa.

Por otra parte, la creciente demanda de alimentos sanos, menos procesados, sin conservante ni aditivos artificiales, por parte de los consumidores, se suma a la necesidad de optimizar el diseño y control de los procesos de elaboración de alimentos. Es por ello que para elaborar alimentos mínimamente procesados que sean seguros, la perspectiva de la ingeniería de seguridad alimentaria comprende un abordaje multidisciplinario del problema en cuestión e involucra el uso de variadas estrategias con el propósito de entender más acabadamente el comportamiento microbiano, entre ellas se mencionan: la microbiología predictiva, tecnologías de procesamiento emergentes, sistemas avanzados de control de re-contaminación y sistemas inteligentes de empaquetamiento (López-Gómez y col., 2009, Demirci y col., 2020).

### **1.2.1 Microbiología predictiva**

Un pie importante de la ingeniería de la seguridad alimentaria es la microbiología predictiva, la cual implica el estudio de la respuesta microbiana a un factor de estrés, de modo tal de poder predecir su respuesta ante diferentes circunstancias (Bazin, 2018). La

necesidad de modelar para poder prever la respuesta microbiana surgió hace varias décadas, al hacerse evidente que el control de calidad de los alimentos basado en el control del producto final implicaba una pérdida de tiempo y dinero (Mahdinia y col., 2020). Por el contrario, la microbiología predictiva caracteriza el comportamiento microbiano (ya sea el crecimiento, inactivación, producción de toxinas, entre otros) como una función de diversos factores de relevancia. De este modo, se presenta como una herramienta poderosa capaz de analizar de manera estructurada el efecto que ejercerán determinadas condiciones sobre la población de interés. De todos modos, la certeza y robustez del modelado depende ampliamente de la calidad, cantidad y representatividad de los datos utilizados (Allende y col., 2022). La habilidad para extraer valor de los datos, y la certeza de su interoperabilidad entre diferentes fuentes, es el desafío principal para establecer políticas y estrategias para la seguridad alimentaria a futuro (Koutsoumanis y col., 2016). Los beneficios de modelar la conducta microbiana en los sistemas de Evaluación de Riesgos, HACCP (*Hazard Analysis for Critical Control Points*) e inocuidad de alimentos incluyen la predicción de la vida útil, la evaluación de los aspectos higiénicos en el procesamiento y la distribución y el establecimiento de los efectos de cualquier desviación en el proceso normal de manufactura. Algunas áreas de aplicación se detallan a continuación (Chen y col., 2022).

- ❖ *Predicción de la inocuidad microbiológica:* permiten estimar el riesgo de crecimiento o supervivencia de un patógeno después de un período de almacenamiento normal o en condiciones de abuso. Ayudan a establecer fechas de vencimiento del producto.
- ❖ *Control de calidad:* colaboran en la implementación del sistema HACCP, mostrando las condiciones ambientales que permiten el crecimiento o supervivencia y el rango aceptable de las mismas, sugiriendo además valores límites críticos (especialmente útil en aquellos alimentos donde la combinación de varios factores es la responsable de la estabilidad). Permiten evaluar las consecuencias cuando un punto crítico sale fuera de control y permiten evaluar nuevos peligros.
- ❖ *Desarrollo de productos:* permiten evaluar las consecuencias microbiológicas de cambios en la composición de los productos y procesos y comparar formulaciones nuevas y preexistentes.

- ❖ *Educación*: ayudan a explicar la conducta microbiana tanto a personal no técnico como a estudiantes universitarios, mostrando el efecto de los distintos factores ambientales de estrés y/o la importancia del control de los puntos críticos del proceso.
- ❖ *Análisis de datos y tareas de laboratorio*: permiten planear tiempos de muestreo de productos y la necesidad o no de la realización de ensayos extensivos de laboratorio en distintas etapas de la cadena, procesos, número de replicados, etc., ahorrando esfuerzos y dinero.
- ❖ *Evaluación de riesgos*: evalúan la probabilidad de que un alimento cause enfermedad. A partir de la distribución de frecuencias de la concentración inicial de un microorganismo patógeno, los cambios que sufre ésta en el proceso y almacenamiento y la cantidad de alimento que es consumido, se obtiene una estimación del número total de patógenos ingerido. Unido esto a consideraciones de dosis infecciosas, puede obtenerse la probabilidad de ocurrencia de infección y enfermedad.

Además de caracterizar las curvas de inactivación, los modelos más modernos permiten la visualización de distribuciones poblacionales de la inactivación microbiana. Los modelos más antiguos consideraban que cada célula de la población tenía el mismo grado de resistencia térmica y la inactivación se debía a la alteración de un sólo sitio crítico. Es decir que, según esos modelos, existe homogeneidad en la respuesta al estrés y el logaritmo de la población celular decrece linealmente con el tiempo de tratamiento cuando la intensidad del tratamiento es constante. Por el contrario, los modelos más modernos consideran que existen variaciones fenotípicas en el grado de resistencia de las células individuales de una población, y esta heterogeneidad es la responsable de curvas de supervivencia no lineales. Para tener en cuenta esta no linealidad se utilizan distribuciones para modelar la supervivencia como la distribución logística, gamma, de Weibull, entre otras (Stavropoulou y col., 2019).

#### **1.2.1.1 Clasificación de los modelos matemáticos**

Se han propuesto varios esquemas para categorizar los modelos, uno de ellos propone dividirlos en modelos de crecimiento y modelos de inactivación /supervivencia.

Dentro de cada categoría se subdividen en modelos primarios, secundarios y terciarios (Ongeng y col., 2014).

Los modelos primarios describen cambios en la respuesta microbiana con el tiempo en un ambiente específico. El modelo puede cuantificar unidades formadoras de colonia por mililitro o por gramo, formación de toxinas, niveles de sustrato o productos metabólicos (que son medidas directas del crecimiento); absorbancia e impedancia (medidas indirectas de la respuesta). Una vez generada la curva de crecimiento o muerte microbiana, se utiliza una función o ecuación matemática para describir el cambio de la respuesta en función del tiempo. Algunos ejemplos de modelos primarios son: el modelo log-lineal, que asume que todas las células de la población presentan igual sensibilidad, con lo cual estas curvas de supervivencia resultan lineales. Otros modelos, tienen en cuenta la suposición de la existencia de subpoblaciones con diferente resistencia dentro de una misma población y permiten ajustar curvas de inactivación no lineales. Ejemplo de ello son los modelos de Cerf y de Coroller, el primero ajusta para curvas bifásicas con comportamiento log-lineal y el segundo es más versátil porque tiene en cuenta diversas formas de curvas de supervivencia (Coroller y col., 2006; Ferrario y col., 2013). También existen modelos que tienen en cuenta distribuciones de frecuencias como el modelo de Weibull, que es la forma acumulativa de la función de probabilidad de las resistencias microbianas individuales a un tratamiento (Geeraerd y col., 2005).

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

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

Las tendencias en microbiología predictiva hasta la fecha han seguido dos caminos: los modelos cinéticos, en donde se modelan y predicen importantes parámetros cinéticos del crecimiento o inactivación microbiano, tales como la fase lag, la velocidad y el alcance (límite) del crecimiento o inactivación; y los modelos probabilísticos, en donde los modelos se construyen para predecir la “probabilidad” de que un evento ocurra, pero no proporciona información sobre la velocidad a la que se produce, como por ejemplo: la germinación de las esporas bacterianas o la producción y concentración de toxina bacteriana después de un período de incubación a tiempo fijo (Stavropoulou y col., 2019).

### ***1.2.1.2 Validación de los modelos matemáticos***

Los modelos generales para crecimiento o inactivación microbiana derivan típicamente de pruebas realizadas en medios de laboratorio con factores controlados. Luego de recolectar un apropiado número de datos experimentales y aplicar los modelos primarios y secundarios, es importante evaluar la exactitud de dichos modelos con nuevos datos y nuevas combinaciones de factores. Existen de manera complementaria una batería de pruebas y métodos gráficos que permiten validar de manera interna el modelo seleccionado que se encuentran detallados en el Apéndice. Esto provee una estimación de la bondad de ajuste e indica si es que se necesitan y dónde datos adicionales (Stavropoulou y col., 2019).

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

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

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

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

### 1.2.1.3 Limitaciones del modelado matemático

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

## 1.3 Evaluación de la calidad de los jugos frutales

### 1.3.1 Contenido de compuestos bioactivos

Los cítricos son una importante fuente de fitoquímicos, los cuales son compuestos bioactivos altamente beneficiosos para la salud humana. Existen diversos estudios epidemiológicos que han comprobado que el consumo de productos de alto contenido fenólico reduce la incidencia de enfermedades cardiovasculares, tumores, infecciones por hongos y reduce la respuesta inflamatoria. En las plantas, estos compuestos cumplen

funciones de protección de las frutas contra el ambiente. En los productos derivados como los jugos cítricos, representan un importante parámetro para determinar la calidad de los mismos. Los fitoquímicos son metabolitos secundarios de la fruta, y su contenido depende de la variedad y madurez de las mismas, así como también de las condiciones climáticas en las que se han cultivado. Los mismos actúan captando radicales libres, y por lo tanto actuando como antioxidantes y como reguladores de la actividad enzimática (Ben Rejeb y col., 2020).

Estos compuestos bioactivos están compuestos por fenoles, carotenoides, fitoestrógenos y sulfuros. Entre los primeros, se encuentran en mayor proporción los flavonoides, los cuales se encuentran en los cítricos en forma de glucósidos y son los principales responsables de la actividad antioxidante de los mismos.

### **1.3.2 Formación de hidroximetilfurfural (HMF)**

El hidroximetilfurfural (HMF) es un subproducto de la degradación de los azúcares presentes en los jugos frutales generado durante el procesamiento y almacenamientos de los mismos. La descomposición térmica de los hidratos de carbono sigue la ruta de la reacción de Maillard en presencia de aminoácidos, o de la caramelización en ausencia de los mismos. Esta última implica la deshidratación de las moléculas durante la exposición a altas temperaturas como ocurre en los procesos tradicionales de pasteurización térmica, mientras que la primera genera la formación de compuestos intermediarios tales como los derivados de furfurales. Estos derivados afectan negativamente la calidad de los jugos es por ellos que pueden ser determinados para estimar la calidad de los mismos (Agcam, 2022). Por otro lado, diversos estudios toxicológicos recientes han demostrado que la ingesta de altas concentraciones de HMF presente en los productos alimenticios, puede afectar adversamente la salud humana. El consumo excesivo de HMF puede generar irritación de la mucosa de las membranas, de la piel, del sistema respiratorio superior y de los ojos; así como promover enfermedades neurodegenerativas, diabetes y enfermedades cardiovasculares. Adicionalmente, el HMF puede derivar en la formación de ciertos compuestos responsables de efectos mutagénicos que eventualmente podrían ocasionar enfermedades como el cáncer (Martins y col., 2022)



### 1.3.3 Estudios de color de los alimentos

Las características organolépticas de los alimentos pueden analizarse a través de las propiedades sensoriales de textura, apariencia y flavor (conjunción de aroma y sabor). El color es, en los alimentos, un factor determinante de la apariencia ya que su percepción suele constituir el primer paso en la evaluación de los alimentos por parte del consumidor y es condicionante de su elección. Esto se debe a que los consumidores no pueden evaluar la calidad microbiológica y nutricional de los alimentos de forma inmediata y para ellos el color representa un indicador de calidad, genuinidad, deterioro y alteraciones.

El ojo humano es sensible a la radiación electromagnética entre los 380 y 770 nm de longitud de onda, la cual es comúnmente llamada “luz”. Los objetos se ven coloreados debido a que interactúan de distinta forma con la luz, usualmente blanca, incidente sobre ellos. Los diferentes objetos se clasifican respecto a su comportamiento frente a la radiación en:

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

Cuando la luz encuentra interfases, ocurre la difusión o *scattering* que implica que las partículas dispersas en el medio continuo, originan múltiples refracciones y reflexiones que esparcen la luz en todas direcciones. Es por ello que, cuando el tamaño de partícula es pequeño, se absorbe menos luz durante el pasaje de la misma a través del medio y, al mismo tiempo, la superficie total de interacción luz-material es mayor, lo cual da una sensación de claridad (Xie y Guo, 2020).

Los principios fundamentales de la colorimetría están basados en las tres leyes de Grassman; de las cuales, la más importante establece que cualquier color puede ser igualado por la suma de tres colores primarios en cantidades convenientes. Los colores primarios deben ser independientes entre sí, es decir que ninguno de ellos puede ser obtenido por combinación de los otros dos. En la práctica, los colores primarios son: verde, rojo y azul, y la suma de todos ellos produce la sensación de luz blanca (Li y col, 2018).

El color puede definirse por:

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

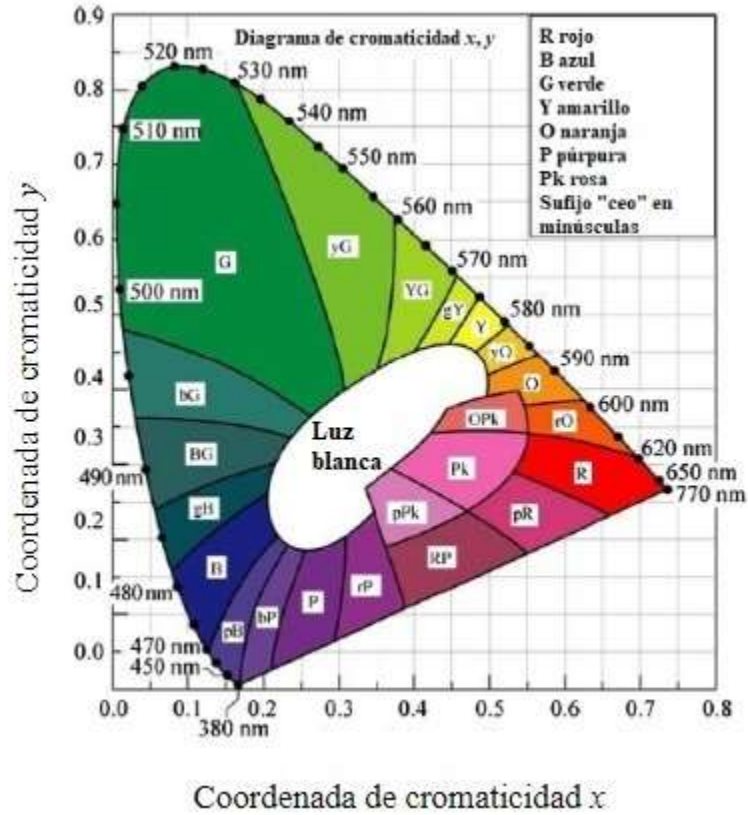
Los tres atributos del color mencionados previamente pueden dar una descripción cuantitativa de un color. El mecanismo psicofísico de visión del color da al observador humano la capacidad de apreciar los tres atributos o características del color. Sin embargo, el observador no puede percibir la composición espectral del estímulo.

La medida objetiva del color de un material puede obtenerse a partir del análisis de su espectro visible, por transmisión o reflexión, obtenido con un espectrofotómetro. De los sistemas propuestos para la especificación del color el más difundido universalmente es el de la CIE (Comisión Internationale de l'Eclairage), en el cual el color es indicado por tres variables X, Y, Z, conocidas como los valores triestímulo y que representan a tres colores primarios imaginarios (relacionados con el rojo, el verde y el azul, respectivamente). Este sistema utiliza el diagrama de cromaticidad para designar los distintos colores (**Figura 1.13**). 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:

$$x = \frac{X}{(X+Y+Z)} \quad (1.5)$$

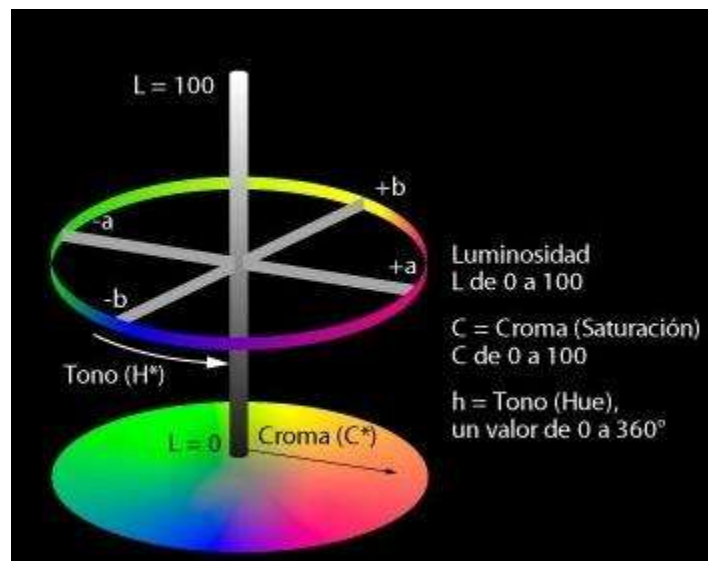
Mientras que los valores de y junto a los de z pueden determinarse al reemplazar X con Y o con Z, respectivamente, en el numerador de la **Ecuación 1.5**. Los espacios de cromaticidad se suelen expresar en términos de las coordenadas x, y.

**Figura 1.13.** 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. 1.14) brindan diferencias de colores más uniformes en relación con la percepción humana de las mismas.

**Figura 1.14.** Espacio de color CIE L\*a\*b\* (reproducido 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 (Comisión Internacional de Iluminación) 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 los 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 Croma, 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 (**Ecuación 1.6**). Mientras más elevados sean los valores de  $C^*$ , mayor es la intensidad de color de las muestras detectadas por las personas.

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (1.6)$$

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 (**Ecuación 1.7**). 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.

$$h^* = \left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (1.7)$$

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 (**Ecuación 1.8-1.10**):

$$L_{ab}^* = 116 \times \left(\frac{Y}{Y_n}\right)^{\frac{1}{3}} - 16 \quad (1.8)$$

$$a^* = 500 \times \left[ \left(\frac{X}{X_n}\right)^{\frac{1}{3}} - \left(\frac{Y}{Y_n}\right)^{\frac{1}{3}} \right] \quad (1.9)$$

$$b^* = 200 \times \left[ \left(\frac{Y}{Y_n}\right)^{\frac{1}{3}} - \left(\frac{Z}{Z_n}\right)^{\frac{1}{3}} \right] \quad (1.10)$$

$L_{ab}^*$  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).

### 1.3.4 Análisis sensorial de alimentos

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

Si bien los instrumentos son efectivos, en muchos casos, no pueden medir ni reemplazar la percepción sensorial. Por ejemplo, hay ingredientes y procesos que tienen un efecto sinérgico que no pueden medirse con un instrumento. En el momento que una porción de alimento se contempla, se huele y se introduce en la boca se desencadenan una serie de efectos que están relacionados entre sí y que dependen de la intensidad y calidad del estímulo que los provoca, de las características de los receptores sensoriales y de la atención y conocimientos básicos del individuo. El éxito depende de la proximidad lograda entre el estímulo y la respuesta dada por el individuo a la sensación percibida. Cuando una producción está bien definida, tanto en términos instrumentales como sensoriales, la calidad de un producto es más completa, tendiendo a los modernos conceptos de la calidad total (Lawless y Heymann, 1999).

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

#### 1.3.4.1 Jueces

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

- ❖ *Panel entrenado*: son sujetos cuidadosamente seleccionados y entrenados en las propiedades sensoriales (virtudes y defectos) que han de evaluar en el alimento. Deben ser capaces de establecer la intensidad de un carácter sensorial, tanto como la apreciación global de un alimento. El entrenamiento asegura la utilización sistemática de la combinación de las percepciones sensoriales de los evaluadores, como guía analítica para determinar la calidad de los productos alimenticios (IRAM 20005-2, 1996). Poseen un lenguaje formal y en muchas ocasiones tienen conocimiento científico de las propiedades que miden. Dado el elevado conocimiento que poseen del producto y su entrenamiento, se utiliza un número escaso de ellos (no más de 10).
- ❖ *Panel semi-entrenado*: constituido por personas familiarizadas con los atributos del producto que van a evaluar. Este panel es capaz de discriminar diferencias, medir intensidad de atributos en escalas y evaluar globalmente al producto. Tienen un lenguaje menos formal que el panel entrenado. La variabilidad individual puede balancearse considerando un mayor número de panelistas (25 a 40 miembros).

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

#### **1.3.4.2 Selección del sitio de prueba**

El análisis sensorial no necesita de instalaciones complejas, pero se debe cumplimentar con ciertas condiciones para realizar las evaluaciones de modo eficiente y confiable.

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 individuales para los panelistas; **(4)** una mesada para el encargado de la prueba; y **(5)** elementos para preparar y servir las muestras (Lawless y Heymann, 2010a).

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 y debe ser silenciosa, bien iluminada y atemperada.

Cada cabina debe poseer una repisa, una silla o banco, una abertura para recibir las muestras del área de preparación y luces individuales. También puede poseer adicionalmente, pileta con grifo y una computadora.

#### **1.3.4.3 Clasificación de las pruebas de evaluación sensorial**

Existe una amplia gama de pruebas sensoriales. La elección de las mismas dependerá del objetivo del proyecto y de la disponibilidad de personas y material. La clasificación más comunmente utilizada en el área del desarrollo de productos y/o procesos incluye tres grandes grupos de pruebas:

- ❖ *Discriminativas*: esta categoría incluye pruebas analíticas que pretenden determinar si los productos evaluados se perciben diferentes de alguna forma.
- ❖ *Descriptivas*: estas pruebas se aplican para determinar cómo los productos difieren en una característica sensorial específica.
- ❖ *Afectivas*: estas pruebas responden a la pregunta de qué tanto gusta un producto o cuál producto se prefiere.

Por otro lado, los métodos de análisis sensorial pueden clasificarse en estáticos o dinámicos. Los primeros exigen que el evaluador integre la evolución de la sensación percibida al ingerir un alimento y la resuma en un valor único, mientras que los segundos, se han venido aplicando de un modo muy novedoso en los últimos años y tienen en cuenta que la percepción sensorial de un alimento es un proceso temporal (Schlich, 2017).

#### **1.3.4.4 Pruebas discriminativas**

Este tipo de pruebas se aplican cuando se desea determinar si dos o más muestras que no presentan diferencias obvias, son perceptiblemente diferentes. Dos muestras pueden tener formulación químicamente diferente y el ser humano puede no ser capaz de percibir esa diferencia, por ejemplo cuando se sustituye un ingrediente. Suelen ser pruebas rápidas para las cuales no se precisa un panel entrenado. Algunas de las pruebas utilizan una referencia para una mejor comparación. Dentro de este grupo las pruebas más populares son: test del triángulo, dúo-trío, test de comparación pareada, diferencia contra control y test “A”-“no A”, entre otras (Lawless y Heymann, 2010a).

#### **1.3.4.5 Pruebas descriptivas**

Mediante estas pruebas se pretende obtener una descripción detallada y objetiva del producto en términos de sus atributos y/o defectos sensoriales. Estos métodos permiten obtener una descripción completa del producto, ayuda a identificar ingredientes y variables de proceso, y/o determinar qué atributos sensoriales son importantes para su aceptación. La intensidad con que se manifiesta cada atributo se expresa por un valor asignado a una escala de medida.



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

#### 1.3.4.6 Pruebas afectivas

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

Por otro lado, los métodos de análisis sensorial pueden clasificarse en estáticos o dinámicos. Los primeros exigen que el evaluador integre la evolución de la sensación percibida al ingerir un alimento y la resuma en un valor único, mientras que los segundos tienen en cuenta que la percepción sensorial de un alimento es un proceso temporal (Schlich, 2017). Esta naturaleza dinámica se debe a los procesos de masticación, salivación, deglución y respiración presentes durante la ingesta de un alimento (Lawless y Heymann, 2010a). Los test dinámicos permiten describir estos cambios en la percepción sensorial a lo largo de la evaluación.

Entre las técnicas dinámicas más utilizadas se encuentran:

- ❖ Intensidad-tiempo (TI): fue la primera prueba dinámica en desarrollarse hace aproximadamente 60 años y es el más popularmente utilizado. Permite monitorear el cambio en la intensidad de la percepción de un solo atributo sensorial a la vez, a lo largo del tiempo (He y col, 2021). Los estudios de TI otorgan información detallada de una muestra mediante los parámetros: Intensidad máxima ( $I_{max}$ ), el tiempo máximo para alcanzar la  $I_{max}$  ( $T_{max}$ ), la duración de la percepción ( $DUR$ ), el área total bajo de la curva ( $AUC$ )

y el área bajo la curva de la fase de decrecimiento de la percepción ( $AUC_{DEC}$ ) (Eib y col., 2021).

❖ Dominancia Temporal de Sensaciones (TDS): este test fue desarrollado hace pocos años y representa un avance en las técnicas dinámicas ya que permite evaluar simultáneamente varios atributos de un mismo alimento a lo largo del tiempo. Lo innovador de este método se basa en la idea de determinar la dominancia de una sensación, en lugar de la intensidad de la misma. Determinar la sensación dominante es mucho más simple para un consumidor que puntuar la intensidad, por lo que la realización de este test sólo requiere una breve familiarización con el programa de adquisición de datos. Una limitación de esta técnica es que exige poder describir en un máximo de 12 atributos el producto, aunque es recomendable que sean menos. A partir de esa lista, los panelistas deben seleccionar aquellos atributos que sienten dominantes a lo largo del consumo del alimento (Schlich, 2017).

## 2 Objetivos



## 2.1. Hipótesis y objetivo general

La tendencia mundial de las últimas décadas basada en buscar una vida más saludable y convivir de manera armoniosa con el medio ambiente ha impulsado a la industria de los alimentos a buscar nuevas tecnologías de procesamiento. El consumidor actual exige productos menos procesados, más naturales, con menos aditivos, funcionales, pero a la vez con calidad similar o superior al producto fresco, novedoso y/o obtenido por tecnologías verdes, entre otras tendencias. Asimismo, las nuevas tecnologías que se proponen deben asegurar estabilidad microbiológica, de modo tal de obtener productos seguros para el consumo.

En este marco, los jugos frutales tratados por tecnologías emergentes de preservación, surgen como una alternativa interesante para satisfacer las nuevas exigencias del mercado. La luz ultravioleta de onda corta (UV-C), representa una alternativa prometedora para obtener productos microbiológicamente seguros y de buena calidad. Sin embargo, la efectividad de la luz UV-C para la descontaminación de jugos frutihortícolas se ve disminuida por la presencia de sólidos solubles; sólidos en suspensión y/o compuestos coloreados que absorben la luz ultravioleta, los cuales impiden que los fotones de luz UV-C alcancen las células microbianas (Shah y col., 2016). Es por este motivo que la asistencia de la luz UV-C por calor moderado (50 °C) podría acrecentar la efectividad del tratamiento, logrando superar las limitaciones del procesamiento que utiliza luz UV-C individual (Guerrero y col., 2022). Los factores seleccionados se caracterizan por no dejar residuos, sus costos son comparables a otras técnicas tradicionales con efectos similares y son en general fáciles de incorporar a las líneas de producción

El objetivo general de esta tesis es evaluar la viabilidad de un procesamiento por luz UV-C asistida por calor moderado, a escala piloto, en un reactor de flujo tipo Dean, que pueda destinarse tanto a matrices líquidas simples como complejas y que fue diseñado y construido durante el desarrollo de esta investigación. La meta radica en proponer un procesamiento efectivo, que logre productos seguros, con mínimos cambios en la calidad fisicoquímica y sensorial, a la vez de resultar económicamente ventajosa y amigables con el medio ambiente, en comparación a las tecnologías térmicas tradicionalmente aplicadas en la preservación de alimentos líquidos. La obtención sistemática de datos microbiológicos y fisicoquímicos confiables utilizando luz UV-C asistida, su modelado y caracterización en

función de los parámetros críticos del proceso propuesto permitirá proponer tiempos de exposición y dosis necesarias.

El desarrollo de esta tesis se organizó en dos etapas:

1. Estudios en reactor UV-C a escala laboratorio.
2. Estudios en reactor UV-C individual o asistido por calor, en reactor a escala piloto.

## 2.2. Objetivos específicos

### **Primera parte: escala laboratorio**

- Caracterizar las siguientes matrices en función de ciertos parámetros fisicoquímicos que influyen sobre la efectividad del procesamiento por luz UV-C (color, pH, °Brix, turbidez, distribución de tamaño de partícula, coeficiente de absorción UV y viscosidad) a saber: jugo blend exprimido natural de naranja-mandarina, jugo blend de banana-mango-kiwi-frutilla, jugo de naranja y jugo de limón claro.
- Determinar los parámetros característicos de procesamiento: número de Reynolds, distribución de tiempos de residencia de los elementos de volumen (DTR); dosis UV-C incidente ( $H_i$ ), dosis UV-C absorbida ( $H_r$ ), fluencia UV-C entregada ( $H_d$ ) actinométrica ( $H_{d\ act}$ ) y biodosimétrica germicida ( $H_{d\ bio}$ ); dosis de reducción equivalente (RED) para un microorganismo patógeno (*Escherichia coli*) y un deteriorativo de interés (*esporas de Alicyclobacillus acidoterrestris*).
- Evaluar la efectividad del tratamiento usando luz UV-C individual (20 °C) en un jugo fresco de naranja-mandarina sobre la inactivación de una variada gama de microorganismos típicos contaminantes de jugos frutales, ya sea en inóculos simples como en cócteles de microorganismos.
- Evaluar la efectividad del tratamiento UV-C sobre esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugos comerciales de limón claro y turbio y en jugo blend de banana-mango-kiwi-frutilla-naranja.
- Caracterizar la cinética de inactivación de los microorganismos inoculados en el jugo blend de naranja-mandarina tratado con luz UV-C utilizando modelos matemáticos conceptualmente diferentes. Comparar la efectividad de los mismos mediante distintas herramientas estadísticas.

- Examinar ciertos parámetros de calidad (contenido de polifenoles, actividad antioxidante total, turbidez, ° Brix, pH, color) del jugo de naranja-mandarina procesado con el tratamiento UV-C y del mismo jugo sin tratamiento (control).
- Evaluar la efectividad del tratamiento UV-C para inactivar la microbiota nativa en un jugo natural exprimido de naranja-mandarina, y compararlo con un jugo control tratado por altas temperaturas.

### **Segunda parte: escala piloto**

- Evaluar y optimizar las condiciones de operación del reactor UV-C (caudal, número de Reynolds, número de Dean; temperatura de asistencia, número de pasadas, etc.) en un equipo de procesamiento por luz UV-C en flujo continuo y sistema Dean construido para el desarrollo de esta tesis.
- Caracterizar el procesamiento por luz UV-C: energía total de entrada, potencia total de salida UV-C, energía total por volumen, energía UV-C por volumen, energía UV-C por pasada, dosis UV-C incidente ( $H_i$ ), dosis UV-C absorbida ( $H_r$ ) y dosis UV-C entregada ( $H_d$ ) mediante actinometría ( $H_{d\ act}$ ).
- Caracterizar diversas matrices simples y complejas (agua peptonada, solución modelo de tartrazina, jugos comerciales de pera, limón turbio, naranja-mandarina y mix de naranja-banana-mango-kiwi-frutilla) utilizados en esta etapa de la tesis, en función de ciertos parámetros fisicoquímicos que influyen su procesamiento por luz UV-C a escala piloto.
- Evaluar y comparar la efectividad del tratamiento usando luz UV-C individual (20 °C) o asistida por calor moderado (50 °C), en la inactivación de una variedad de microorganismos típicos contaminantes de jugos frutales utilizando inóculos simples a gran escala, en una variedad de matrices frutales de diferente complejidad óptica.
- Evaluar la efectividad del tratamiento UV-C individual en la inactivación de esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugos de diferente complejidad óptica.
- Modelar la cinética de inactivación de los sistemas evaluados, tratados por UV-C individual o UV-C asistido por calor moderado utilizando modelos matemáticos conceptualmente diferentes. Comparar la efectividad de los mismos mediante distintas herramientas estadísticas.

- Evaluar la efectividad del tratamiento UV-C asistido por calor moderado a escala piloto para inactivar la microbiota nativa en un jugo natural exprimido de naranja-mandarina, y compararlo con un jugo control tratado por altas temperaturas.
- Examinar ciertos parámetros de calidad del jugo de naranja-mandarina natural, procesado con el tratamiento UV-C asistido y del mismo jugo sin tratamiento alguno (control).
- Realizar una variada gama de estudios sensoriales estáticos y dinámicos de jugos de naranja-mandarina natural y comercial con procesamiento por luz UV-C asistida, con un panel de consumidores masivos, con el propósito de determinar el perfil sensorial y los cambios del mismo durante la ingesta del jugo .Comparar con un producto ideal definido por los consumidores.

## 3 Materiales y Métodos





## PARTE 1: ESCALA LABORATORIO

### 3.1 Materia prima

#### 3.1.1 Matrices

En esta parte del estudio de tesis se utilizaron las siguientes matrices:

- ❖ Jugo natural exprimido de naranja-mandarina (*Citrus sinensis*, var. Valencia - *Citrus reticulata* var. Okitsu; preparado en proporción 1:1; pH:  $3,9 \pm 0,1$ ;  $13,1 \pm 0,1$  °Brix ;  $1811 \pm 10$  NTU).
- ❖ Jugos comerciales concentrados sin conservantes de: limón claro (pH:  $2,85 \pm 0,10$ ;  $8,4 \pm 0,1$  °Brix;  $2,22 \pm 0,10$  NTU) y mix (banana-mango-kiwi-frutilla, naranja- 50:27:10:10:3; pH:  $3,6 \pm 0,1$ ;  $13,9 \pm 0,1$  °Brix;  $1767 \pm 10$  NTU).
- ❖ Jugo de manzana (Baggio, Gualaguaychú, Entre Ríos, Argentina. pH:  $3,4 \pm 0,1$ ;  $12,1 \pm 0,6$  °Brix;  $23 \pm 1$  NTU).

Para la obtención del jugo natural exprimido se compraron naranjas y mandarinas en un mismo proveedor local.

Para los estudios de reto microbiano y de calidad, las frutas se desinfectaron externamente mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante 15 minutos. Luego se enjuagaron en agua destilada y se secaron con paños de papel descartable. Los utensilios utilizados para la obtención de los jugos se sanitizaron con alcohol etílico al 70 % y se expusieron luego a la luz UV-C por 15 minutos con el fin de lograr su completa descontaminación. La fruta se exprimió en condiciones asépticas con una exprimidora gastronómica (340 W, ANION, Buenos Aires, Argentina), se recolectó en recipientes estériles y se centrifugó a 157 g por 10 minutos (centrifuga Rolco AMC 3550, Ciudad de Buenos Aires, Argentina) a fin de reducir parte de la pulpa. Con el fin de obtener un jugo blend, se mezclaron iguales cantidades de jugo naranja y de mandarina obteniendo de este modo un jugo de naranja-mandarina en relación 1:1. El jugo se utilizó inmediatamente luego de su obtención.

Para los estudios de microbiota nativa, se siguieron las condiciones habituales bajo las cuales se obtiene el jugo en la industria y por lo tanto este jugo no se obtuvo en condiciones de esterilidad. Se utilizaron utensilios limpios y las naranjas y mandarinas se procesaron

fuera de la cabina de bioseguridad. El jugo así obtenido se centrifugó igual que el ítem anterior y se almacenó un día en refrigeración ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ) en recipientes estériles, color caramelo con el fin de aumentar su carga microbiana.

Los jugos comerciales utilizados en esta tesis se recibieron directo de la fábrica del proveedor en bidones cerrados, refrigerados. En todos los casos se trató de jugos frutales concentrados, congelados, sin aditivos. Se mantuvieron en refrigeración ( $-18^\circ\text{C}$ ) hasta su uso, momento en el cual se los diluyó convenientemente hasta llegar a los °Brix deseados en cada caso, con agua corriente estéril ya que se utilizaron para estudios de reto microbiano y no deseaba evitar contaminaciones ajenas a los inóculos de los microorganismos de interés.

### 3.1.2 Reactivos

- ❖ Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) (Biopack, Argentina)
- ❖ Ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) (Anedra, Argentina)
- ❖ Ácido gálico (Biopack, Buenos Aires, Argentina)
- ❖ Ácido tricloroacético (Biopack, Argentina)
- ❖ Ácido tiobarbitúrico (Biopack, Argentina)
- ❖ Alcohol etílico absoluto (Biopack, Buenos Aires Argentina)
- ❖ Azul de bromotimol (Merck, Darmstadt, Alemania)
- ❖ Bifosfato de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (Sigma, EEUU)
- ❖ Catequina (Biopack, Buenos Aires Argentina)
- ❖ Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Biopack, Buenos Aires, Argentina)
- ❖ Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Parafarm, Argentina)
- ❖ Cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Anedra, Argentina)
- ❖ Cloruro de cobre ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Biopack, Argentina)
- ❖ Cloruro de manganeso ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) (Anedra, Argentina)
- ❖ Cloruro de níquel ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Biopack, Argentina)
- ❖ Cloruro de potasio (KCl) (Anedra, Argentina)
- ❖ Cloruro de sodio (NaCl) (Anedra, Argentina)
- ❖ Extracto de levadura (Laboratorios Britania, Argentina)
- ❖ Etanol 100% (Biopack, Argentina)
- ❖ Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Sigma, EEUU)
- ❖ Glucosa (Britania, Argentina)
- ❖ Guaiacol (Biopack, Argentina)

- ❖ Hidróxido de sodio 0,1 N (NaOH) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- ❖ Iodato de potasio (KIO<sub>3</sub>) (Laboratorios Cicarelli, Argentina)
- ❖ Ioduro de potasio (KI) (Química Oeste, Argentina)
- ❖ Pectina (Sigma, EEUU)
- ❖ Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Biopack, Argentina)
- ❖ Pirocatecol (Biopack, Argentina)
- ❖ Polivinilpolipirrolidona (PVPP) (Sigma, EEUU)
- ❖ 2,6-diclorofenol indofenol (Sigma, EEUU)

### 3.1.3 Medios de cultivo

- ❖ Agua Peptona bufferada (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), composición (g/L): peptona 10; cloruro de sodio 5; fosfato disódico 3,5; fosfato monopotásico 1,5; pH: 7,2 ± 0,2.
- ❖ Caldo Nutritivo (CN) (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), composición (g/L): pluripeptona 5,0; extracto de carne 3,0; cloruro de sodio 8,0; pH: 7,3 ± 0,2.
- ❖ Agar Nutritivo (AN) (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), composición (g/L): pluripeptona 5,0; extracto de carne 3,0; cloruro de sodio 8,0; agar 15,0; pH: 7,3 ± 0,2.
- ❖ Agar Tripteína Soja (ATS-E) (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), composición (g/L): tripteína 15; peptona de soja 5; cloruro de sodio 5; agar 15; extracto de levadura 6; pH: 7,3 ± 0,2.
- ❖ Caldo Tripteína Soja (CTS-E) (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), composición (g/L): tripteína 17; peptona de soja 3; cloruro de sodio 5; fosfato dipotásico 2,5; glucosa 2,5; extracto de levadura 6; pH: 7,3 ± 0,2.
- ❖ Agar de Recuento en Placa (APC) (Merck, Darmstadt, Alemania), composición (g/L): peptona de caseína 5; extracto de levadura 2,5; D-(+) glucosa 1; agar-agar 14; pH: 7,0 ± 0,2.
- ❖ Agar Extracto de Levadura-Glucosa-Cloranfenicol (YGC) (Merck, Darmstadt, Alemania), composición (g/L): extracto de levadura 5; D-(+) glucosa 20; cloranfenicol 0,1; agar-agar 14,9; pH: 6,6 ± 0,2.

- ❖ Caldo Sabouraud dextrosa (Sab Caldo) (BiokarDiagnostics, Beauvais, Francia), composición (g/L): triptona 5; peptona de carne 5; glucosa 20; pH:  $5,7 \pm 0,2$ .
- ❖ Agar Sabouraud dextrosa (Sab) (BiokarDiagnostics, Beauvais, Francia), composición (g/L): peptona de carne 10; glucosa 35; agar bacteriológico 15; pH:  $5,7 \pm 0,2$ .
- ❖ Caldo *Bacillus acidoterrestris* (Caldo BAM), preparado según Silva y Gibbs (2001) con la siguiente composición (g/L):  $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,25;  $\text{MgSO}_4$  0,5;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,2; extracto de levadura 2; glucosa 5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,03;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,3;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,2;  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,01;  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,02;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,3; pH:  $4,0 \pm 0,2$  ajustado con ácido cítrico.
- ❖ Agar *Bacillus acidoterrestris* (AAM), preparado según Silva y Gibbs (2001) con la siguiente composición (g/L):  $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,25;  $\text{MgSO}_4$  0,5;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,2; extracto de levadura 2; glucosa 5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,03;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,3;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,2;  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,01;  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,02;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,3; agar bacteriológico (Laboratorios Oxoid, Hampshire, Inglaterra) 15; pH:  $4,0 \pm 0,2$  ajustado con ácido cítrico.
- ❖ Agar *Alicyclobacillus acidoterrestris* (AAM), preparado con la siguiente composición (g/L): extracto de levadura 2, glucosa, 2,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,5, agar bacteriológico (Laboratorios Oxoid, Hampshire, Inglaterra) 30; pH:  $4,0 \pm 0,2$  ajustado con ácido cítrico.
- ❖ Agar Mac Conkey (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), composición (g/L): peptona de carne 1,5; peptona de gelatina 17,0; tripteína 1,5; lactosa 10,0; mezcla de sales biliares n°3 1,5; cloruro de sodio 5,0; rojo neutro 0,03; cristal violeta 0,001; agar 13,5; pH:  $7,1 \pm 0,2$ .
- ❖ Caldo Man, Rogosa y Sharpe (Caldo MRS) (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), composición (g/L): proteosa peptona n°3 10,0; extracto de carne 10,0; extracto de levadura 5,0; glucosa 20,0; sorbitánmonoleato 1mL; fosfato dipotásico 2,0; acetato de sodio 5,0; citrato de amonio 2,0; sulfato de magnesio 0,2; sulfato de manganeso 0,05; pH:  $6,5 \pm 0,2$ .
- ❖ Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), composición (g/L): proteosa peptona n°3 10,0; extracto de carne 10,0; extracto de levadura 5,0; glucosa 20,0; sorbitánmonoleato 1mL; fosfato dipotásico 2,0; acetato de

sodio 5,0; citrato de amonio 2,0; sulfato de magnesio 0,2; sulfato de manganeso 0,05; agar 13,0; pH: 6,4 ± 0,2.

### 3.1.4 Microorganismos

Se realizaron en esta tesis, ensayos de reto microbiano utilizando determinados microorganismos de manera tal de representar a los grupos más relevantes en la contaminación de jugos frutales cítricos.

Se seleccionó como representante de la especie *E. coli* a la cepa *E. coli* ATCC 25922, por haber demostrado ser una adecuada subrogante de la cepa patógena *Escherichia coli* O157:H7 (Sauer y Moraru, 2009; Kim y Harrison, 2009). Cabe aclarar que, las cepas subrogantes son aquellas no patógenas que se comportan de un modo similar frente a un agente estresor que la cepa patógena de interés y que generalmente tienen igual o mayor resistencia a los tratamientos estudiados, de modo tal que pueden ser utilizadas como indicadoras para medir la efectividad del procesamiento (Ozturk y col, 2020; Schultze y col, 2020).

Dentro del grupo de las bacterias ácido lácticas se utilizó *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014.

Asimismo, se estudió la respuesta a los tratamientos aplicados de microorganismos deteriorativos. Por un lado, una bacteria esporulada descomponedora, de alta relevancia en la industria de bebidas por las características ya descritas en la Sección 1.5., *Alicyclobacillus acidoterrestris* utilizando la cepa ATCC 49025. Por otro lado, se utilizó una levadura, *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 (Ferrario y col., 2016).

Para simular el efecto de la microbiota acompañante que existe naturalmente en los jugos y su influencia en la inactivación de un microorganismo indicador, se armaron 3 cócteles de fondo, a saber:

- a) cepas no patógenas de *E. coli*: ATCC 35218, 11229 y 8738.
- b) cepas de levaduras: *Pichia anomala* 3668, *Saccharomyces cerevisiae* KE162, *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256 y *Candida parapsilosis* 22019.
- c) Microbiota aislada de cáscara de naranja y madarina \*

En resumen, se utilizaron inóculos simples de:

- ❖ *Escherichia coli* ATCC 25922
- ❖ *Saccharomyces cerevisiae* KE 162
- ❖ *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014
- ❖ Esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* ATCC 49025.

Por otro lado, los inóculos compuestos estuvieron compuestos por cócteles de:

- ❖ 4 cepas de *Escherichia coli*: ATCC 25922, ATCC 35218, ATCC 11229 y ATCC 8738.
- ❖ *Escherichia coli* ATCC 25922 + 4 cepas de levaduras: *Pichia anomala* ATCC 3668, *Saccharomyces cerevisiae* KE 162, *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019.
- ❖ *Escherichia coli*: ATCC 25922 + microbiota nativa no identificada aislada de la cáscara de mandarina y naranja.
- ❖ 4 cepas de levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* KE 162, *Pichia anomala* ATCC 3668, *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019.
- ❖ *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 + 4 cepas de *Escherichia coli*: ATCC 25922, ATCC 35218, ATCC 11229 y ATCC 8738.
- ❖ *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 + microbiota nativa no identificada aislada de la cáscara de mandarina y naranja.

Todas las cepas utilizadas pertenecen al cepario del Laboratorio de Desarrollo de Tecnologías de Intervención Asistidas donde se realizó este trabajo de tesis. Las mismas fueron donadas oportunamente por el Instituto Malbrán, MEDICATEC SRL o bien compradas (*A. acidoterrestris*).

Para la utilización de las cepas, las mismas se sembraron en estrías de ATS-E, para *E. coli*, Sab para las levaduras y MRS, para *L. plantarum*. Los tubos se incubaron a 37 °C y 27 °C, respectivamente por 24 h, almacenándolos luego a 4°C para su posterior utilización. En el caso de *A. acidoterrestris*, el estriado se realizó en BAM y se incubó a 43 °C por 48 horas previo a la esporulación.

\*Para aislar la microbiota de naranja y mandarina se siguió el siguiente procedimiento: se sumergieron 10 g de cáscaras de naranja y mandarina sin higienizar en 90 mL de agua peptona estéril, dentro de bolsas de polietileno (Whirl-Pack, Nasco, USA). Luego se homogeneizó en el Stomacher (AES Laboratories, Nueva Dheli, India) a máxima velocidad por 3 min. Se sembró la muestra obtenida (el agua peptonada recuperada de las

bolsas de polietileno) en placas de Petri conteniendo los medios de cultivo YGC y AN y se incubó a 27°C por 72 horas y a 30°C por 48 horas para permitir el desarrollo de levaduras y de bacterias mesófilas, respectivamente. Los cultivos se mantuvieron en tubos de agar Sab y AN dispuestos en pico de flauta, refrigerados a 4°C hasta su uso.

### 3.1.5 Preparación de inóculos

Los inóculos simples se prepararon el día previo transfiriendo una ansada de cultivo fresco a un erlenmeyer conteniendo 20 mL de CTS-E, caldo Sab o caldo MRS para *E. coli*, *L. plantarum* y *S. cerevisiae*, respectivamente. Los mismos se incubaron en agitación a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  ó  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , respectivamente durante 18 horas, para alcanzar la fase estacionaria del desarrollo microbiano. Posteriormente se centrifugaron a 1475 g durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se re-suspendieron en 20 mL de agua peptonada estéril.

Los inóculos compuestos se obtuvieron transfiriendo una ansada de cultivo fresco de cada cepa a erlenmeyers conteniendo 20 mL de CTS-E, caldo Sab o CN para *E. coli*, levaduras y microbiota nativa, respectivamente. Se incubaron a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , respectivamente por 18 h. Luego se tomaron 5 mL de cada inóculo individual y se transfirieron a un erlenmeyer estéril vacío de modo tal de obtener las combinaciones de cepas deseadas. Posteriormente, se centrifugaron a 1475 g durante 5 min (Labnet, Edison, Nueva Jersey, Estados Unidos), se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los pellets obtenidos en 20 mL de agua peptonada estéril.

En el caso de las esporas de *A. acidoterrestris*, el inóculo se obtuvo transfiriendo una ansada de cultivo fresco a un erlenmeyer conteniendo 20 mL de caldo BAM y su posterior incubación a  $43 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 h. Luego, con el fin de lograr la esporulación del microorganismo, se sembró el inóculo con ansa cubriendo toda la superficie del agar AAM dispuesto dentro de botellas tipo Schott y se lo incubó durante una semana a  $43 \pm 1^\circ\text{C}$ . La remoción de las esporas de las botellas, se realizó agregando 15 mL de agua destilada estéril dentro de las botellas tipo Schott, y arrastrando el cultivo con rastrillo de vidrio cuidadosamente desde la superficie del agar hacia el agua. Todo el material celular desprendido se recogió en tubos Falcon estériles y se centrifugó a 700 g durante 15 min a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ . Se eliminó el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en una solución de agua-etanol 50 % v/v y se incubó entre 30-60 min con el fin de eliminar las células vegetativas presentes. Posteriormente, se volvió a centrifugar y se resuspendió el pellet en agua destilada. Este procedimiento se repitió tres veces más y por último el material celular

se dejó resuspendido en agua destilada estéril. Las esporas suspendidas en agua destiladas se fraccionaron de a 3 mL en tubos Eppendorf y se almacenaron a  $-18 \pm 1$  °C hasta su posterior utilización (Silva y Gibbs, 2001; Ferrario y col., 2015).

## 3.2 Caracterización de las matrices

### 3.2.1 Densidad, sólidos solubles, pH, turbidez y color

Para la densidad, se pesó el picnómetro vacío en una balanza analítica (fijarme marca), se registró el peso y luego se procedió a pesar el picnómetro lleno con cada muestra. Se determinó la densidad de cada muestra mediante la **Ecuación 3.1**.

$$\text{Densidad} \left( \frac{g}{mL} \right) = \frac{(\text{peso picnómetro lleno} - \text{peso picnómetro vacío})g}{10 mL} \quad (\text{Ec. 3.1})$$

La concentración de sólidos solubles (°Brix) se midió utilizando un refractómetro PR-101 Palette (ATAGO Co. LTD, Japón).

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

Por otro lado, la turbidez de los sistemas se determinó mediante un turbidímetro (LaMotte, Maryland, EEUU) usando un patrón de formazina correspondiente para cada muestra (100-2000 NTU).

### 3.2.2 Color

En cuanto al color, éste se midió usando un espectrofotómetro portable (Minolta Co. Model CM-508-d, Osaka, Japan) con una apertura de medición de 1,4 cm de diámetro, con fondo blanco y negro. Para ello, 3 mL de muestra se colocaron en portamuestras con base de vidrio y paredes de PVC opaco de 2,5 cm de diámetro interno y 1 cm de altura. Este volumen de muestra permitió alcanzar el grosor necesario para que el jugo naranja-mandarina se comportara como opaco, de modo de independizarse del color de fondo utilizado. En el caso de las muestras translúcidas, se informaron los datos de color obtenidos para fondo blanco ya que la medición directa de una capa delgada de un material translúcido sobre un fondo blanco es suficiente para separar las muestras en el espacio de color y coincide con la apreciación visual (Farroni, 2012). Las muestras fueron medidas



usando un sistema de iluminación C y un ángulo de observación estándar de 2°, sobre acrílicos de color blanco o negro. Previo a cada medición, el instrumento fue calibrado con los patrones proveídos por el fabricante. Se registraron las coordenadas de color del espacio CIE (X,Y,Z) y las componentes del espacio CIELAB, L\* (luminosidad), a\* (rojo a verde) y b\* (azul a amarillo).

### 3.2.3 Coeficiente de absortividad a 254 nm y porcentaje de transmitancia

El coeficiente de absortividad en el UV-C de los jugos ( $\alpha_{254nm}$ ) se determinó realizando una serie de diluciones de los mismos en agua destilada y midiendo la absorbancia a 254 nm ( $A_{254nm}$ ) en un espectrofotómetro UV-visible (Jasco V-630, Tokio, Japón) en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso. Luego, se graficó la absorbancia en función de la concentración de jugo (% v/v) en cada dilución. De esta manera trazando la línea de tendencia lineal y obteniendo la ecuación de la recta, se determinó a partir de la pendiente el coeficiente de absortividad ( $\alpha_{254nm}$ ) de cada jugo. Este último no es el coeficiente de absortividad molar ya que las concentraciones no estuvieron expresadas en concentraciones de mol/L (Oteiza y col., 2010).

La transmitancia UV ( $TUV$ ) se calculó según la **Ecuación 3.2** (Koutchma, 2009):

$$TUV (\%) = 100 * 10^{-A_{254 nm}} \quad (3.2)$$

En donde  $A_{254nm}$  (-) es la absorbancia de la matriz a 254 nm.

### 3.2.4 Tamaño de partícula

El tamaño de partícula de los jugos, en un rango de 0,1 a 1000  $\mu m$  se determinó mediante dispersión estática de luz (DEL) en un equipo Mastersizer 2000 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido) equipado con una unidad de dispersión Hydro 2000MU (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). La velocidad de la bomba se configuró a 1800 rpm.

Por otro lado, el tamaño de partículas en el rango de 0,6 nm a 6  $\mu m$  se obtuvo por dispersión dinámica de luz (DDL) a 20 °C (Zetasizer Nano-Zs; Malvern, Worcestershire, UK) provisto de un láser de He-Ne (633 nm) y un correlacionador digital (Modelo ZEN3600). Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado y a un ángulo de dispersión fijo de

173°. En DDL, la muestra es iluminada con un rayo láser y la intensidad de la luz dispersada es dependiente del tamaño de partícula debido a las fluctuaciones en la intensidad. La relación entre el tamaño de partícula y el coeficiente de difusión se define por la ecuación Stokes-Einstein ( $d(H) = (k.T) / (3. \pi. \eta. D)$ ) (Malvern Instruments, 2004) donde  $d(H)$  es el diámetro hidrodinámico (m);  $D$ : coeficiente de difusión traslacional ( $m^2 s^{-1}$ );  $k$ : constante de Boltzman ( $1,38 \times 10^{-23} N m K^{-1}$ );  $T$ : temperatura absoluta (K);  $\eta$ : viscosidad del solvente ( $N.s.m^{-2}$ ). La distribución de intensidad en tamaño se convirtió, usando la teoría de Mie (Malvern Instruments, 2004), en una distribución en volumen. Para ambos rangos de medición, se empleó un valor de índice de refracción de los jugos de 1,35 y absorptividad igual a 0,1.

### 3.2.5 Viscosidad

La viscosidad de los jugos se determinó utilizando un reómetro dinámico tangencial (Paar Physica, modelo MCR 300; AntonPaar GmbH, Graz Austria). Las determinaciones se llevaron a cabo a esfuerzo constante, en modo rotacional, utilizando una geometría de cono/plato (CP 75-2), con un gap de  $5 \times 10^{-5} m$  y 5 mL de muestra. Las determinaciones se realizaron a dos temperaturas ( $20,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ C$  y  $50,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ C$ ) por triplicado para cada matriz, que corresponden a las temperaturas utilizadas en los ensayos de reto microbiano. La temperatura se controló mediante el Peltier del equipo, conectado a un baño termostático seteado a  $40 \pm 1 \text{ } ^\circ C$  lo cual nos permitió trabajar a las 2 temperaturas de interés. Se registraron las curvas de viscosidad aparente en función de la velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) en un rango de  $0 - 100 s^{-1}$ .

## 3.3 Equipos de procesamiento por luz UV-C a escala laboratorio

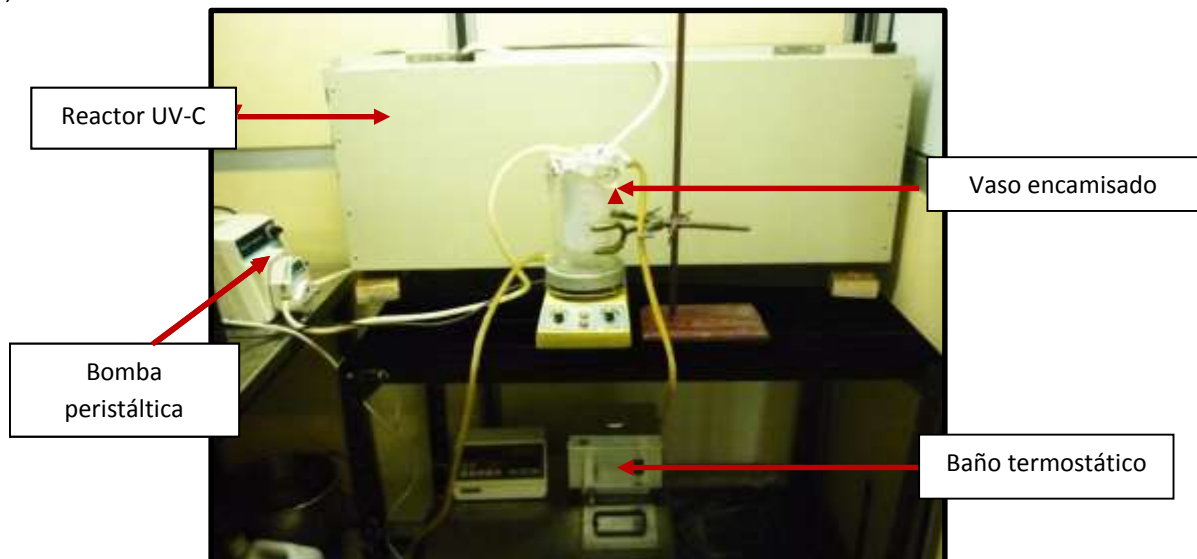
### 3.3.1 Descripción del equipo

El equipo de flujo continuo en capa delgada para el tratamiento UV-C de sistemas líquidos fue diseñado y ensamblado en el laboratorio en 2013 (**Figura 3.1** a, b). El mismo consta de una carcasa metálica herméticamente cerrada, dentro de la cual había dos lámparas de mercurio de baja presión de luz UV (15 Watt, modelo TUV T8, Philips) dispuestas en serie. Estas lámparas emiten en mayor porcentaje en el rango germicida de la radiación UV-C que corresponde a la longitud de onda de 254 nm (**Figura 3.2**). Cada

lámpara se encuentra en el interior de una camisa de vidrio, dejando un espacio anular muy delgado entre la lámpara y la camisa por donde circulan las muestras (**Figura 3.3**). Los extremos se encuentran sellados mediante o-rings y resina de contacto. Las lámparas están conectadas entre sí mediante una manguera flexible autoclavable (Cole-Parmer, Masterflex, L/S 24, Illinois, EEUU), a la vez cada lámpara está conectada por este tipo de mangueras a un vaso doble camisa de 800 mL de capacidad, que a su vez se conecta a un baño termostático HAAKE (Mess-Technik, Karlsruhe, Alemania). Entre las lámparas y el vaso doble camisa, se encuentra la bomba peristáltica (CPX-400, Cole Parmer, Vernon Hills, Illinois, USA) para bombear el líquido desde y hacia el vaso doble camisa, a través del reactor a un caudal máximo de 1,6 L/min. El objetivo de trabajar con recirculación fue contrarrestar las desventajas de trabajar en régimen laminar y de este modo aumentar la efectividad del proceso tal como ha sido comentado por Antonio-Gutiérrez y col. (2019b).

**Figura 3.1.** a) Equipo a escala laboratorio de flujo continuo para tratamiento: UV-C. b) Interior del reactor de tratamiento por luz UV-C.

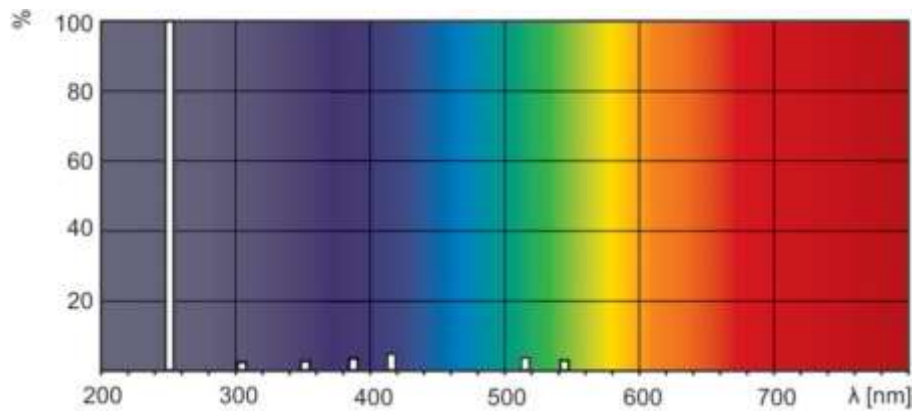
a)



b)



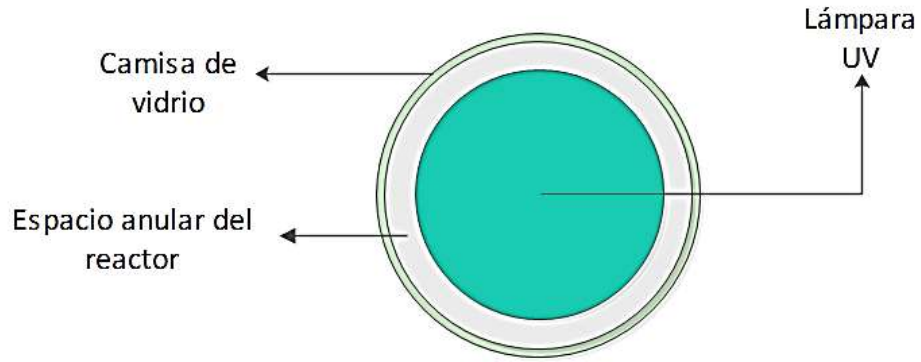
**Figura 3.2.** Espectro de emisión de lámpara Philip TUV T8.



Fuente: <https://www.lighting.philips.es/prof/lamparas-y-tubos-convencionales/lamparas-especiales>.

Cada lámpara mide 0,87 m de largo y el espacio anular libre entre ellas y la camisa dentro de la que se encuentran se constituye como reactor (cámara de irradiación). Ese espacio anular tiene un radio de 0,0035 m que está determinado por la distancia entre el diámetro de la lámpara de 0,024 m y la camisa de vidrio de 0,031 m.

**Figura 3.3.** Detalle de una lámpara de luz UV-C encamisada



### 3.3.2 Caracterización del flujo en el reactor UV-C.

El número de Reynolds hidráulico ( $Re_h$ ) se calculó considerando al flujo anular dentro de los dos cilindros concéntricos determinados por las lámparas y las camisas de vidrio, de acuerdo a la siguiente ecuación:

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

en donde,  $D_h$  es el diámetro hidráulico ( $D_h = 2 * d$ , siendo  $d$  el espesor del espacio anular),  $\rho$  es la densidad,  $v$  es la velocidad media de flujo y  $\mu$  es la viscosidad dinámica del fluido (Koutchma, 2009).

Por otro lado, el tiempo de residencia teórico se determinó mediante la **Ecuación 3.5**:

$$\tau = \frac{V_R}{F_v} \quad (3.5)$$

donde,  $V_R$  es el volumen del reactor calculado según la **Ecuación 3.6** y  $F_v$  es el caudal volumétrico de alimentación calculado mediante la **Ecuación 3.7**:

$$V = \pi * r^2 * L \quad (3.6)$$

$$F_v = A * v \quad (3.7)$$

siendo, en la **Ecuación 3.7**,  $r$  el radio y  $L$  es el largo total de las lámparas; y en la ecuación 6  $v$  es la velocidad de flujo y  $A$  el área anular del equipo, según:

$$A = \frac{\pi}{4} * D_{ext}^2 - \frac{\pi}{4} * D_{int}^2 \quad (3.8)$$

en donde,  $D_{ext}$  es el diámetro interno de la camisa de vidrio y  $D_{int}$  es el diámetro externo de la lámpara UV-C.

### 3.3.3 Distribución de los tiempos de residencia en el reactor

La estimación de la distribución de tiempos de residencia (DTR) se realizó mediante la técnica de estímulo-respuesta por inyección de una solución saturada de cloruro de sodio (Koutchma y col., 2004). La misma consiste en inyectar una solución marcadora de cloruro de sodio al 5 % (m/v) en el caudal estable dentro del reactor (1,6 L/min) por medio de un inyector ubicado inmediatamente antes de la entrada al reactor. Luego de la inyección, se midió la conductividad (Hanna Combo pH EC HI-98129, Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, Estados Unidos) de la solución a la salida del reactor cada 5 s, hasta alcanzar los 5 min. La concentración de cloruro de sodio a la salida del reactor se determinó mediante la comparación contra una curva de calibración confeccionada por soluciones de concentraciones conocidas de cloruro de sodio y su conductividad. La distribución de la concentración de la curva de cloruro de sodio  $c(t)$  se normalizó para obtener la curva  $E(t)$  (**Ecuación 3.9**). A partir de la curva  $E(t)$ , se calculó el tiempo de residencia medio  $\bar{t}$  (**Ecuación 3.10**).

$$E(t) = \frac{c(t)}{\int_0^t c(t) dt} \quad (3.9)$$

$$\bar{t} = \int_0^t t \cdot E(t) dt \quad (3.10)$$

### 3.3.4 Determinación de las diferentes dosis UV-C

Para una correcta caracterización del reactor UV-C escala laboratorio se determinaron diferentes dosis.

Para estimar la *fluencia incidente* ( $H_i$ , mJ/cm<sup>2</sup>) se midió la irradiancia de las lámparas con un radiómetro (ThermoLab, modelo S302C, Munich, Alemania). Para ello se encendieron las lámparas UV-C durante 15 min para estabilizarlas previo a las mediciones. Luego se retiró la carcasa externa del equipo tomando las precauciones adecuadas para no exponer al operador a la luz UV-C, y apoyando el sensor del radiómetro sobre la camisa de vidrio que rodea la lámpara, se registraron los valores de irradiancia. Posteriormente, de acuerdo a Biancaniello y col. (2018) se obtuvo  $H_i$ , mediante la Ecuación 3.11:

$$H_i = I_0 * t \quad (3.11)$$

en donde,  $I_0$  (mW/cm<sup>2</sup>) es la irradiancia medida en (mW, mili watt) medida con el radiómetro dividido por el área del sensor del mismo (área<sub>sensor</sub>=7,85 x 10<sup>-5</sup> m<sup>2</sup>) y  $t$ , representa el tiempo de tratamiento (s, segundos). Se reportó el valor promedio de las mediciones surgidas de ambas lámparas.

La *fluencia absorbida y dispersada* ( $H_r$ , mJ/cm<sup>2</sup>), es dependiente tanto de la fluencia incidente,  $H_i$  como del diseño del reactor y de las características de la matriz a tratar. Se calcula según:

$$H_r = I_r * t \quad (3.12)$$

en donde  $I_r$  es la irradiancia UV (determinada mediante el uso de un radiómetro) a una distancia  $r$  respecto del centro, y se calcula según:

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

en donde  $\alpha$  es el coeficiente de absorción de la matriz,  $r$  es la distancia radial entre la superficie de la matriz y el centro de la fuente de luz UV-C y  $r_0$  es el radio de la lámpara UV-C ( $r_0 = 1,3$  cm).

Por otro lado, se determinaron la fluencia entregada ( $H_d$ ) mediante actinometría ( $H_{d, act}$ , fluencia recibida) y la fluencia entregada germicida mediante biosimetría ( $H_{d, bio}$ , fluencia germicida) .

La actinometría permite cuantificar la energía de la luz UV irradiada a través de la generación de reacciones fotoquímicas. En este caso, se utilizó el par actinométrico Ioduro-

Iodato (Rhan,1997) que al ser expuesto a la luz UV forma triioduro ( $I_3^-$ ), según la siguiente reacción estequiométrica (**Ecuación 3.14**), y éste puede ser medido espectrofotométricamente ya que es coloreado:



La actinometría se llevó a cabo preparando una solución de Iodato de potasio (0,1 M) y Ioduro de potasio (0,6 M), en buffer borato (0,01 M, pH: 9,25), la cual se cargó en el vaso encamisado y se la hizo circular a través el reactor con las lámparas UV-C encendidas de modo continuo (1,6 L/h), tomando muestra a intervalos de tiempo preestablecidos entre 0 y 15 minutos. Posteriormente, se midió la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro (Hewlett Packard 8453, Hanover, Alemania) a 352 nm y se realizaron los siguientes cálculos pertinentes para cuantificarla recurriendo a las siguientes expresiones:

Ley de Lambert-Beer:

$$Abs_{352} = \varepsilon * b * C \quad (3.15)$$

$$Moles I_3^- = \frac{Abs_{352} * V(L)}{\varepsilon * b} \quad (3.16)$$

Con  $\varepsilon$ : 26.400 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

$$N^\circ Einstein (fotones absorbidos) = \frac{Mol I_3^-}{QY} \quad (3.17)$$

Siendo,

$$QY = Rendimiento cuántico = 0,75 * [1 + 0,02 * (T - 20,7)] * (1 + 0,23 * (C - 0,577)) \quad (3.18)$$

Con,

T= temperatura (°C) y C= concentración de yoduro

Entonces,

$$E (J) = 4,27 * 10^5 \left( \frac{J}{einstein} \right) * N^\circ Einstein \quad (3.19)$$

Conociendo la absorbancia a 352 nm de las muestras luego de cada tiempo de exposición, se calculó el número de moles de triioduro ( $I_3^-$ ) formados mediante la **Ecuación 3.16**. A partir de este dato y utilizando el valor de rendimiento cuántico calculado con la



**Ecuación 3.18**, se aplicó la **Ecuación 3.17** para obtener el número de fotones absorbidos ( $N^\circ$  Einstein). Finalmente, mediante la **Ecuación 3.19** se obtuvo la energía ( $E$ , Joule) recibida por la muestra luego de cada intervalo de tiempo de exposición a la luz UV-C. Con estos valores se realizó un gráfico de energía en función del tiempo de exposición y se determinó hasta qué tiempo de exposición la respuesta de la reacción colorimétrica es lineal ya que esto dependerá de la potencia de las lámparas y del área del reactor (Rhan, 1997). A partir de ello, se extrapolaron los valores para conocer la energía recibida por la muestra luego del tiempo de tratamiento implementado (15 min) en las experiencias con las muestras. Para ello se multiplicó al resultado por el tiempo de exposición y se dividió por el área del equipo, llegando así al valor de fluencia recibida ( $H_{d\ act}$ ) en unidades de energía por unidad de área ( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ).

En cuanto a la dosis biodosimétrica o germicida,  $H_{d\ bio}$ , se realizó mediante el método de biodosimetría modificado (Koutchma y col., 2009), el cual consistió en la inyección de un pulso microbiano, 5 mL de un inóculo de *E. coli* ATCC 35218 (obtenido según el apartado 3.1.5), como trazador en una corriente de flujo estable (1,6 L/h) de un jugo de manzana comercial (Baggio, Gualeguaychú, Entre Ríos, Argentina). 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. Previo a la experiencia se desinfectó el equipo de luz UV-C mediante el encendido de las lámparas por 15 min y mediante la recirculación de 1 L de agua clorada al 5 %, durante 15 min. Las fracciones de jugo a la salida fueron recolectadas según una función dependiente del tiempo posterior a la inyección. Luego de la inyección a la entrada del reactor se recolectaron muestras a la salida del mismo cada 5 s, durante 5 min, y se sembraron en placas de TSA, posteriormente incubadas a  $37 \pm 1$  °C por 24 h. El procedimiento se repitió con las lámparas apagadas. El procedimiento se realizó por duplicado.

La medición con lámparas apagadas reflejó la distribución de tiempos de residencia (DTR); mientras que la medición con lámparas encendidas reflejó los efectos combinados de la DTR y la distribución de irradiancias de luz UV-C (LID) en el reactor.

La distribución LID se midió determinado la irradiancia en distintos puntos del espacio anular constituido como reactor según la **Ecuación 3.13**.

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 mediante la **Ecuación 3.20**.

$$I_{av} = \frac{\sum r_0 I_r * V_r}{V} \quad (3.20)$$

donde,  $I_r$  es la irradiancia en cada elemento de volumen dentro del reactor,  $V_r$  es el volumen es ese elemento de volumen y  $V$  es el volumen total de reactor

$$V_r = \pi * D * r_{ext}^2 - * D * r_{int}^2 \quad (3.21)$$

donde,  $D_{ext}$  es el diámetro interno de la camisa de vidrio y  $D_{int}$  es el diámetro externo de la lámpara UV-C.

La cantidad de células bacterianas inactivadas en cada fracción de volumen recolectado 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 graficándolas versus el tiempo.

La dosis UV de reducción decimal ( $D_{10UV}$ ) de *E. coli* se obtuvo multiplicando la irradiancia UV promedio ( $I_{av}$ ) por el tiempo de residencia medio ( $\bar{t}$ ), y dividiendo ambos por el logaritmo decimal de la inactivación bacteriana (**Ecuación 3.22**). La curva de inactivación de *E. coli* se construyó graficando las reducciones log obtenidas [ $Log(N/N_0)$ ] en comparación con la dosis, donde  $N$  y  $N_0$  son los conteos microbianos a un dado tiempo y a tiempo cero, respectivamente.

$$D_{10UV} = \frac{I_{av} * \bar{t}}{Red \log} \quad (3.22)$$

Se repitió el mismo procedimiento utilizando un microorganismo deteriorativo representativo o de interés, en este caso se eligieron esporas de *A. acidoterrestris* ATCC 49025. De este modo se obtuvo la *dosis de reducción equivalente* (RED) multiplicado el valor de  $D_{10UV}$  obtenido para cada microorganismo por los ciclos logarítmicos de reducción exigidos por la FDA (5 ciclos logarítmicos para este tipo de alimento).

Por último, la dosis  $H_{d,bio}$ , se calculó como el valor de  $D_{10UV}$  multiplicado por las caída logarítmica ( $LogN_0 - LogN_t$ ) lograda a cada tiempo de tratamiento para las esporas de *A. acidoterrestris*, como se indica para microorganismos deteriorativos. Mientras que la dosis  $H_{d,bio}$  para *E. coli* se obtuvo multiplicando el valor de  $D_{10UV}$  por las reducciones logarítmicas específicas exigidas por la FDA para microorganismos patógenos en jugos, que es de 5

ciclos logarítmicos. De ambas dosis  $H_{d\ bio}$  obtenidas, se seleccionó como representativa de dosis germicida ( $H_{d\ bio}$ ) requerida aquella de mayor valor.

### 3.4 Estudios de reto microbiano

Para los estudios de reto microbiano se procedió en primer lugar a la limpieza del equipo de luz UV-C. Para ello se encendieron las lámparas con el fin de estabilizarlas y también para que esterilizaran el reactor, y a la vez se hizo circular 1 L de agua clorada al 5 %, durante 15 min en modo de recirculación. Posteriormente, se realizaron 2 enjuagues de 750 mL cada uno con agua destilada estéril, hasta asegurar la completa eliminación del agua clorada.

Posteriormente, 745 mL de jugo preparado asépticamente (ver *Sección 3.1.1*) fueron inoculados con 5 mL de inóculo simple o compuesto (ver *Sección 3.1.5*). En el caso de las esporas de *A. acidoterrestris*, se colocaron 3 mL de inóculo. Se colocó el jugo inoculado en el vaso doble camisa y se lo dejó recircular a través del reactor con las lámparas apagadas durante 2 min a fin de homogeneizar todo el sistema y de eliminar las burbujas de aire que pudiera haber. Luego, se encendieron las lámparas, y se tomaron muestras de 5 mL durante los 15 min de tratamiento, a intervalos de tiempo preestablecidos (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 5; 7; 10; 15 min).

En los casos en que se evaluó la evolución de la población sobreviviente a lo largo del almacenamiento refrigerado, se fraccionó el jugo tratado o no (control) en frascos color caramelo de 15 mL. Para evitar el ingreso de oxígeno, se tuvo el cuidado de llenarlos hasta el tope y cerrarlos bien y luego se los almacenó en la heladera a  $5 \pm 1$  °C. Se fueron tomando las muestras cada 24-72 hs para realizar el recuento microbiano correspondiente, y se confeccionaron gráficos de Log N versus día de almacenamiento refrigerado para observar la evolución de la microbiota.

### 3.5 Estudios de microbiota nativa

Se analizó la microbiota nativa para el procesamiento UV a escala laboratorio del jugo exprimido de naranja-mandarina (1:1) obtenido como se describió en la *Sección 3.1.1*, con la única diferencia de que la fruta no fue desinfectada previamente ni se trabajó asépticamente, de modo de conservar la microbiota nativa proveniente de la fruta natural y

evaluar el efecto del tratamiento de luz UV-C sobre la misma. Una parte del jugo obtenido fue reservado sin recibir tratamiento como Control.

Para el tratamiento UV-C, en primer lugar, se sanitizó el equipo como se describió en la *Sección 3.4*. Posteriormente, se introdujeron 750 mL del jugo en el vaso doble camisa. Con las lámparas apagadas, se hizo circular el jugo durante 2 min a 1,6 L/min para eliminar las burbujas de aire de todo el sistema y de homogeneizarlo. Luego, se encendieron las lámparas y se trató el jugo durante 15 min en modo de recirculación. Al finalizar el tiempo de tratamiento se recolectó la muestra y se la fraccionó en frascos estériles de 15 mL, color caramelo, completamente llenos para evitar la presencia de oxígeno dentro del frasco y se almacenaron a  $5^{\circ}\text{C} \pm 1$ . Lo mismo se hizo con la muestra control. En el día 0 y durante los días subsiguientes en intervalos de 24 - 48 o 72 hs se tomaron 2 frascos de cada muestra y se realizaron los siguientes recuentos, en distintos medios de cultivo:

- Aerobios mesófilos: Agar PCA, incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  - 72 h.
- Hongos y levaduras: Agar YGC, incubación a  $25^{\circ}\text{C}$  - 5 días.
- Coliformes totales: Mc Conkey, incubación  $37^{\circ}\text{C}$  - 48 h.

Con el fin de observar la evolución de la microbiota nativa a lo largo del almacenamiento, se procedió como se describió en la *Sección 3.4* y se confeccionaron gráficos de Log N versus día de almacenamiento refrigerado.

Se evaluó la influencia del tratamiento aplicado (UV-C) en la población de microbiota nativa en comparación con el control mediante un ANOVA de dos factores. El nivel de significación fue fijado en  $p < 0,05$ . Se verificaron las suposiciones de homocedasticidad, normalidad, y se removieron datos anormales, si correspondía. Los contrastes de interacción se efectuaron mediante la prueba de Tukey.

### **3.6 Enumeración de los microorganismos sobrevivientes**

Para la enumeración de los microorganismos sobrevivientes, se tomaron alícuotas de los sistemas tratados por luz UV-C y se realizaron diluciones 1/10, en caso de ser necesario, en tubos de agua peptonada (0,1 % p/v). Se sembraron por duplicado en superficie con un plaqueador orbital (Autoplate 4000, SpiralBiotech, EEUU), en medio Agar Sab, TSA y Agar MRS para las levaduras, *E. coli* y *L. plantarum*, respectivamente. Las placas se incubaron a  $27^{\circ}\text{C}$  ó  $37^{\circ}\text{C}$  para levaduras y bacterias, respectivamente, durante 24 ó 48 h.

En el caso de las esporas *A. acidoterrestris*, previo a la siembra, las muestras fueron sometidas a calentamiento a  $80 \pm 1$  °C durante 10 min en un baño termostático, con el objetivo de inactivar las células vegetativas que pudieran haber quedado presentes (Ferrario y Guerrero, 2018; Ferrario y col., 2015; Vercammen y col., 2012). Posteriormente, se realizaron las diluciones adecuadas de acuerdo a los recuentos esperados y fueron sembradas en agar BAM e incubadas a 43 °C durante 72 h (Silva y Gibbs, 2001).

Cuando los recuentos esperados eran bajos (menor a  $10^2$  UFC/ml) se utilizó la técnica de siembra en profundidad. La misma consistió en volcar 1 ó 2 ml de muestra en una placa de Petri estéril vacía y cubrirla con agar fundido a menos de 30°C, se homogeneizó mediante movimientos en forma de 8 sobre la mesada y luego se dejó solidificar el agar antes de la incubación.

El recuento de colonias se realizó sobre una grilla provista junto al equipo plaqueador en el caso de la siembra en superficie, y con un contador automático (COMECTA S.A., Barcelona, España) para la siembra en profundidad.

Las curvas de supervivencia se generaron a partir de los datos experimentales, graficando la fracción sobreviviente como  $\log N/N_0$  (donde N es el número de UFC/mL a un tiempo dado y  $N_0$  el número inicial de UFC/mL) versus el tiempo de tratamiento (t).

### 3.7 Modelado matemático

Se aplicaron tres modelos matemáticos conceptualmente diferentes, a saber: modelo de distribución de frecuencias de muerte de Weibull, modelo de Coroller y modelo bifásico con hombro, para caracterizar e interpretar la cinética de inactivación microbiana en todos los sistemas ensayados.

#### 3.7.1 Modelo de Weibull

El primer modelo aplicado fue el modelo de distribución de frecuencias de resistencias de Weibull (Peleg y Cole, 1998) el cual considera que cada organismo en una población muere o es inactivado a un tiempo de tratamiento específico:

$$S(t) = \log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -b \cdot t^n \quad (3.23)$$

donde S es la fracción de microorganismos supervivientes; b y n son los parámetros de escala y de forma respectivamente. Una vez obtenidos, los parámetros b y n fueron utilizados para generar las curvas de frecuencia de resistencias mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{d}{dt_c} = b \cdot n \cdot t_c^{n-1} \exp(-b \cdot t_c^n) \quad (3.24)$$

donde  $t_c$  es una medida de la resistencia o sensibilidad del microorganismo al tratamiento aplicado y  $\frac{d\phi}{dt_c}$  es la distribución de tipo Weibull correspondiente a  $t_c$ , Adicionalmente, se calcularon otros parámetros estadísticos para explicar mejor las frecuencias halladas (moda ( $t_{cm}$ ), media ( $t_c$ ), varianza ( $\sigma_{t_c}^2$ ) y coeficiente de sesgo ( $v_1$ )) (Peleg y Cole, 1998) a partir de las siguientes ecuaciones:

$$t_{cm} = [(n - 1)/nb]^{1/n} \quad (3.25)$$

$$t_c = \{[(n + 1)/n]/b^{1/n}\} \quad (3.26)$$

$$\sigma_{t_c}^2 = \{\Pi [(n + 2)/n] - (\Pi[(n + 1)/n])^2\}/b^{2/n} \quad (3.27)$$

$$v_1 = \frac{[\Pi(n+3/n)/b^{3/n}]}{[\Pi(n+2/n)/b^{2/n}]^{3/2}} \quad (3.28)$$

donde  $\Pi$  es la función gamma. La distribución moda,  $t_{cm}$ , representa el tiempo de tratamiento al cual la mayor parte de la población muere o es inactivada, es decir la máxima frecuencia. La media,  $t_c$ , corresponde al tiempo medio de los distintos tiempos de inactivación con su varianza,  $\sigma_{t_c}^2$ . El coeficiente de sesgo,  $v_1$ , representa el sesgo de la distribución y está relacionado con los miembros más resistentes de la población microbiana.

### 3.7.2 Modelo de Coroller

Se aplicó la versión modificada de 4 parámetros propuesta por Coroller y col. (2006), la cual se basa en la combinación de dos distribuciones de resistencias de Weibull. Por ello este modelo es llamado doble Weibull y asume de un modo muy interesante que cada subpoblación (sensible y resistente) es caracterizada por una distribución de tiempos de muerte:

$$\log_{10} \left( \frac{N}{N_0} \right) = \frac{1}{1+10^\alpha} \left[ 10^{-\left(\frac{t}{\delta_1}\right)^p + \alpha} + 10^{-\left(\frac{t}{\delta_2}\right)^p} \right] \quad (3.29)$$

donde,  $p$  es el parámetro de forma,  $\alpha$  es la proporción logarítmica entre la fracción sensible ( $f$ ) y la resistente ( $1-f$ ) de la población,  $\delta_1$  y  $\delta_2$  son el tiempo de tratamiento necesario para la primer reducción decimal de la subpoblación sensible y de la subpoblación resistente, respectivamente.

### 3.7.3 Modelo bifásico con hombro

Las curvas de inactivación microbiana se ajustaron, por último, a la versión modificada del modelo bifásico con hombro propuesta por Geeraerd y col. (2005), cuya fórmula es:

$$\log_{10} \left( \frac{N}{N_0} \right) = \left\{ (1-f) * e^{-k_{sens}*t} * \frac{e^{(k_{sens}*SL)}}{1+[e^{(k_{sens}*SL)-1}] * e^{(-k_{sens}*t)}} + f * e^{(-k_{res}*t)} * \left( \frac{e^{(k_{sens}*SL)}}{1+[e^{(k_{sens}*SL)-1}] * e^{(-k_{sens}*t)}} \right)^{\frac{k_{res}}{k_{sens}}} \right\} \quad (3.30)$$

En donde  $f$  representa a la fracción de la población inicial que es más sensible al tratamiento mientras que  $(1-f)$  corresponde a la subpoblación más resistente,  $k_{sens}$  y  $k_{res}$  son los ratios específicos de inactivación de ambas poblaciones y  $SL$  representa el largo del hombro (min).

Los modelos se validaron mediante el cálculo y análisis de los siguientes parámetros estadísticos: la raíz cuadrada de los cuadrados medios del error (RMSE) (Ferrario y col., 2013), el criterio de Akaike (AIC) (Akaike, 1973), el criterio Bayesiano Schwarz (BIC) (Quinn y Keough, 2002) y el coeficiente de determinación ajustado por los grados de libertad del modelo ( $R^2_{aj}$ ). Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) a fin de mostrar la relación entre las reducciones logarítmicas alcanzadas para cada sistema y los parámetros de los tres modelos aplicados. Adicionalmente, se realizó un PCA a fin de mostrar la relación entre las reducciones logarítmicas alcanzadas para cada microorganismo y las características físico-químicas de los sistemas tratados (turbidez, °Brix, coeficiente de absortividad, viscosidad, color, transmitancia, acidez, pH y tamaño de partícula). El coeficiente de correlación cofenética (CCC) se obtuvo como una medida de fidelidad de

cuánto conserva el análisis las distancias euclídeas originales entre los datos. Un adecuado análisis de PCA se corresponde con valores de CCC cercanos a 1,0 (Ferrario y col., 2013).

Para todos los análisis mencionados en esta Sección, se utilizó el programa InfoStat 2009 (Grupo InfoStat, FCA-UNC, Córdoba, Argentina).

## **3.8 Estudios de calidad físico-química**

### **3.8.1 Color, pH, turbidez y sólidos solubles.**

Con el objetivo de evaluar si el tratamiento UV-C/T modificó los parámetros físicos de calidad del jugo naranja-mandarina luego del tratamiento y durante el almacenamiento, se midieron los parámetros de color, el pH, la turbidez y los sólidos solubles siguiendo la metodología descrita en la *Sección 3.2.1* a lo largo de 20 días posteriores al tratamiento.

### **3.8.2 Contenido de polifenoles totales**

El contenido de polifenoles totales (CPT) en las muestras se determinó mediante el método de Folin Ciocalteu (Singleton y col., 1999). Para ellos se preparó una curva de calibración utilizando soluciones seriadas de ácido gálico en metanol (0,0025 a 0,125 mg/mL). A 1 mL de cada dilución se les agregaron 5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (10%) y 4 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7%) para obtener un volumen de 10 mL totales. La mezcla se agitó y se incubó durante 30 min a 40°C. Luego se midió la absorbancia de cada dilución a 760 nm y con los datos obtenidos se graficó la absorbancia en función de la concentración para obtener la curva de calibración correspondiente ( $y=13.2465x+0.0518$ ,  $R^2=0.99$ ). Se repitió el procedimiento para cada muestra y a partir de la absorbancia a 760 nm obtenida para cada una, se calculó el CPT mediante la curva de calibración. Los resultados se expresaron como mg de Ácido gálico por mL de jugo (mg EAG/mL).

### **3.8.3 Capacidad antioxidante**

#### **3.8.4 DPPH**

Este es un método colorimétrico basado en la capacidad de la muestra de captar radicales libres, la cual se evalúa usando el radical estable 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl



(DPPH) de acuerdo a la metodología propuesta por Gutiérrez y col. (2015). Se diluyeron 80  $\mu$ L de muestra 1500 veces con metanol y se mezclaron con 2200  $\mu$ L de DPPH (0,02 g/L metanol). Se dejó reposar la mezcla en oscuridad durante  $30 \pm 1$  °C por 30 min y luego se midió la absorbancia de la misma a 515 nm con un espectrofotómetro UV-vis (V-630, Jasco, Tokio, Japon). Se obtuvo una curva de calibración utilizando 6-hidroxy-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-c (Trolox) como estándar, los resultados se calcularon a partir de ella ( $y=0,00084x-0,0024$ ,  $R^2=0,98$ ) y se expresaron como mg equivalentes de Trolox por mL de muestra (mg Eq.Trolox/mL).

### 3.8.5 ABTS

La capacidad antioxidante también se midió mediante la capacidad de la muestra de atrapar el catión radical 2-2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS<sup>+</sup>), de acuerdo al procedimiento descrito por Shalaby y Shanab (2013). Para la obtención del ABTS<sup>+</sup> se mezclaron iguales proporciones (1:1, v/v) de una solución stock de ABTS (7mM) y de persulfato de potasio (2,45 mM) y se dejó reposar la mezcla en oscuridad por 18 h hasta completar la reacción y estabilizar la absorbancia de la misma. La solución resultante, de ABTS<sup>+</sup>, se diluyó en etanol puro (1/10, v/v) para su uso. Los ensayos fotométricos se realizaron mezclando 8 mL de la solución final de ABTS<sup>+</sup> con 0,2 mL de muestra (1/5000, v/v). Luego de agitar la mezcla vigorosamente, se la dejó reposar por 1,5 h para luego medir la absorbancia de la misma a 734 nm en un espectrofotómetro. Los valores de capacidad antioxidante se determinaron mediante una curva de calibración de Trolox ( $y=0,0031x+0,0264$ ,  $R^2=0,9901$ ), y los resultados se expresaron como mg equivalentes de Trolox por mL de muestra (mg Eq.Trolox/mL).

## PARTE 2: ESCALA PILOTO

### 3.9 Materia prima

#### 3.9.1 Matrices

- ❖ Solución modelo de tartrazina (0,2 %), azúcar (11 %), ácido cítrico (1%) (pH:  $5,8 \pm 0,1$ ;  $8,9 \pm 0,1$  °Brix;  $2,39 \pm 0,10$  NTU)
- ❖ Agua peptona 1 % (pH:  $7,0 \pm 0,1$ ;  $0,6 \pm 0,1$  NTU)
- ❖ Jugos comerciales concentrados congelados y sin conservantes de: pera (pH:  $3,82 \pm 0,10$ ;  $15,1 \pm 0,1$  °Brix;  $21,87 \pm 0,10$  NTU), limón claro (pH:  $2,85 \pm 0,10$ ;  $8,4 \pm 0,1$  °Brix;  $2,22 \pm 0,10$  NTU), limón turbio (pH:  $2,53 \pm 0,10$ ;  $7,4 \pm 0,1$  °Brix;  $2097 \pm 10$  NTU), naranja-mandarina (1:1; pH:  $3,54 \pm 0,10$ ;  $12,43 \pm 0,1$ ;  $3100 \pm 10$  NTU) y mix (naranja-banana-mango-kiwi-frutilla, 50:27:10:10:3; pH:  $3,6 \pm 0,1$ ;  $13,9 \pm 0,1$  °Brix;  $1767 \pm 10$  NTU).

En el caso de la solución modelo, se preparó una solución de sacarosa comercial (Ledema) en agua destilada al 11 % y se esterilizó en el autoclave a 121 °C por 15 minutos, para cada experiencia. Inmediatamente previo a su uso se diluyeron la tartrazina (Givaudan, Argentina) en un 0,2% en la solución de sacarosa con ayuda del agitador del tanque receptor. La tartrazina se agregó luego de la esterilización para evitar el cambio indeseado del color de la misma por la exposición a altas temperaturas y porque siendo un colorante seco, el desarrollo de microorganismos en el mismo es nulo (Wang et al., 2009).

En cuanto a los jugos comerciales, éstos fueron generosamente donados por Tradecos SRL (Beccar, Buenos Aires, Argentina) y ECA Agroindustria (Concordia, Entre Ríos, Argentina). Los mismos se recibieron concentrados (65-70 °Brix) y se mantuvieron a -18 °C hasta su uso. Inmediatamente previo a cada experiencia se diluyeron en agua potable, a modo de facilitar la operación y al mismo tiempo simular la preparación de un jugo industrial, hasta alcanzar los °Brix deseados en cada caso.

#### 3.9.2 Reactivos

Se utilizaron todos los reactivos mencionados en el *Apartado 3.1.2* y además:

- ❖ 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH) (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>) (Merck, Billerica, EEUU)
- ❖ Ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS) (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S<sub>4</sub>) (Merck, Billerica, EEUU)
- ❖ Ácido tricloroacético (Biopack, Buenos Aires, Argentina)
- ❖ Ácido tiobarbitúrico (0,025 M) (Anedra, Argentina)
- ❖ HMF (Sigma Aldrich)
- ❖ Metanol (Biopack, Buenos Aires, Argentina)
- ❖ Molibdato de sodio (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>) (Anedra, Argentina)
- ❖ Nitrito de sodio (NaNO<sub>2</sub>) (Anedra, Argentina)
- ❖ Persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) (Anedra, Argentina)
- ❖ Potasio fosfato monobásico anhidro (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Biopack, Argentina)
- ❖ Reactivo de Folin-Ciocalteu (Biopack, Buenos Aires, Argentina)
- ❖ Sodio fosfato dibásico anhidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Anedra, Argentina)
- ❖ Solución buffer pH 4,0 (Biopack, Buenos Aires, Argentina)
- ❖ Solución buffer pH 7,0 (Biopack, Buenos Aires, Argentina)
- ❖ Sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Biopack, Argentina)
- ❖ Sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) (Biopack, Argentina)
- ❖ Sulfato de manganeso (MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O) (Anedra, Argentina)
- ❖ Sulfato de zinc (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) (Biopack, Argentina)
- ❖ Tartrazina (Givaudan, Argentina)
- ❖ Tricloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>) (Anedra, Argentina)
- ❖ Trolox (Merck, Billerica, MA USA)
- ❖ Azul de bromotimol (Sigma Aldrich)
- ❖ Pectina (Biopack, Argentina)
- ❖ Cloruro de sodio (NaCl) (Biopack, Argentina)

### 3.9.3 Medios de cultivo

Se utilizaron los mismos medios de cultivo que los previamente descritos en la Sección 3.1.3.

### 3.9.4 Microorganismos

Se utilizaron los mismos microorganismos descritos para los inóculos simples

descritos en los de la *Sección 3.1.4*.

### 3.9.5 Preparación de inóculos

Para las experiencias a escala piloto se trabajó con inóculos simples para la preparación de los cuales se siguió un procedimiento para propagación de inóculo seguido por Char (2008). En primer lugar, los inóculos se prepararon transfiriendo una ansada de cultivo fresco a un erlenmeyer conteniendo 20 mL de CTS-E, caldo Sab o caldo MRS para *E. coli*, *L. plantarum* y *S. cerevisiae*, respectivamente. Los mismos se incubaron con agitación a  $37 \pm 1$  °C o  $27 \pm 1$  °C, respectivamente durante 18 h, para alcanzar la fase estacionaria del desarrollo microbiano. Posteriormente, todo el contenido del erlenmeyer fue volcado en un nuevo erlenmeyer conteniendo 980 mL del mismo caldo de acuerdo al microorganismo de trabajo de modo de obtener un inóculo de mayor volumen y se volvió a incubar con agitación a  $37 \pm 1$  °C o  $27 \pm 1$  °C, según correspondiera, por 18 h más. Posteriormente se centrifugó el cultivo fresco a 1475 g durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se re suspendió en 100 mL de agua peptona estéril.

En el caso de los inóculos de esporas de *A. acidoterrestris*, se llevó a cabo el mismo procedimiento que en la *Sección 3.1.5*, con la única diferencia de que a final del procedimiento las esporas se fraccionaron en tubos Falcon en 25 mL de agua destilada estéril, y se conservaron a  $-18 \pm 1$  °C hasta su uso.

## 3.10 Caracterización de las matrices

Se realizaron las determinaciones ya descritas en la *Sección 3.2* a las matrices usadas en las experiencias a escala piloto.

## 3.11 Equipo de procesamiento por UV-C a escala piloto

### 3.11.1 Descripción del equipo

El reactor UV-C (**Figura 3.4 a y b**) para estudios a escala piloto fue diseñado y ensamblado en la facultad para el desarrollo de esta tesis e investigaciones futuras con ayuda del personal técnico (Sres. Daniel Araujo y Julio Sosa) de la Planta Piloto general

del Departamento de Industrias, FCEN, UBA y con la colaboración de personal técnico contratado especialista en el montaje de instalaciones sanitarias.

Se trata de un diseño de reactor de flujo continuo tipo Dean (**Figura 3.4**). El mismo consiste en una plataforma que sostiene una carcasa octogonal de acero inoxidable (el reactor), un tablero de control de energía y temperatura, una bomba centrífuga sanitaria (EBT, modelo AISI 304, Buenos Aires, Argentina), un caudalímetro (New-Flow, MF200E, Kaohsiung 806, Taiwan), dos tanques (uno de alimentación y otro receptor) de acero inoxidable con tapa (50 L, Cerrinox SRL, Buenos Aires Argentina), llaves de paso, cañerías y válvulas, todas ellas de instalación sanitaria. El tanque de alimentación, posee en su interior un agitador de paletas de acero inoxidable controlado por un motor ubicado sobre la tapa del tanque. Éste mismo tanque posee además en su interior un sensor de temperatura con corte automático de calentamiento (termostato PT100) conectado a una camisa calefactora controlada por un relé de monitoreo de temperatura. La **Figura 3.5** muestra un esquema de la parte externa del equipo UV-C. Los dos tanques y todas las cañerías estaban cubiertas de aislante térmico de goma (1/2 pulgada) para evitar pérdidas de calor.

La parte externa del reactor está conformada por la carcasa octogonal de acero inoxidable que guarda en su interior un arreglo del tubo reactor y lámparas UV-C. El reactor consiste de un tubo de etileno-propileno-fluorado-FEP (procedencia: China, transparencia al UV-C: 0,98-0,99; largo: 13,9 m; diámetro interno: 19 mm) dispuesto en forma de hélice o coil por donde circula la muestra líquida. Cada una de las hélices que conforman la estructura fue inmovilizada por calor suave en estufa para tal fin. De esta forma se conformó una hélice mayor de diámetro: 40 cm y longitud: 85 cm. Dentro del reactor se encuentran también, las 12 lámparas de luz UV-C (Phillips T8/36 W) acomodadas de modo tal de irradiar al coil por dentro (4) y por fuera (8) (ver **Figura 3.6 a y b**)

**Figura 3.4.** Equipo de tratamiento UV-C, escala piloto. a) vista externa, b) vista del interior del reactor.

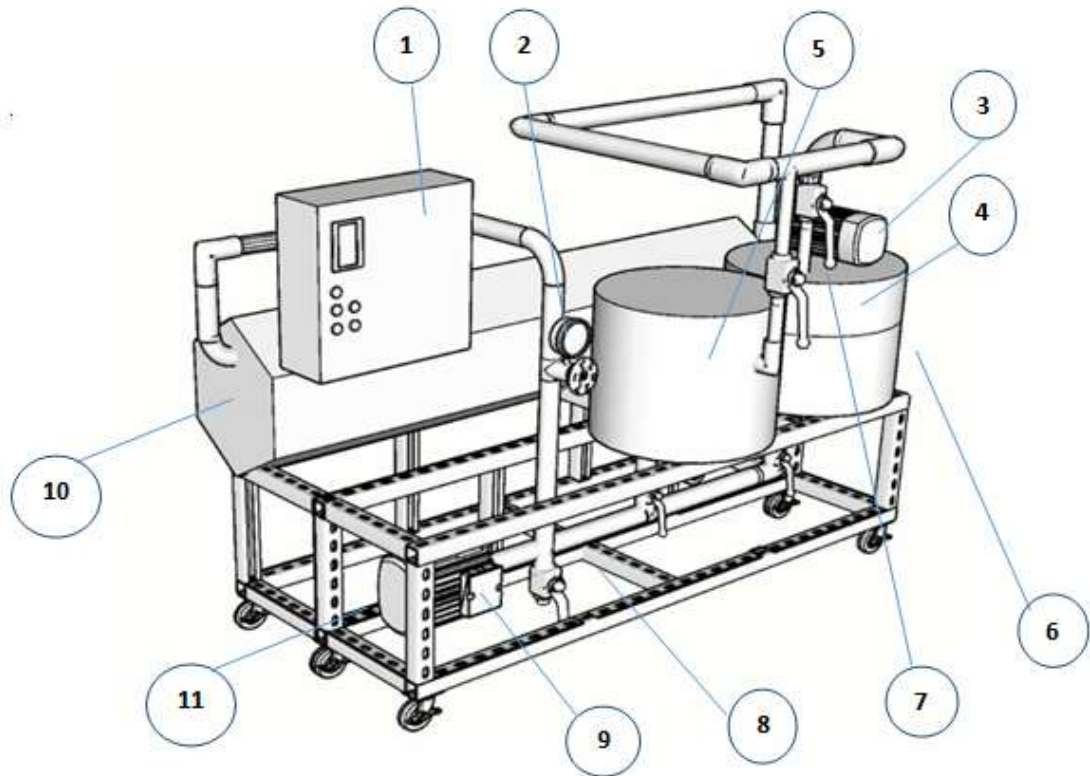
a)



b)

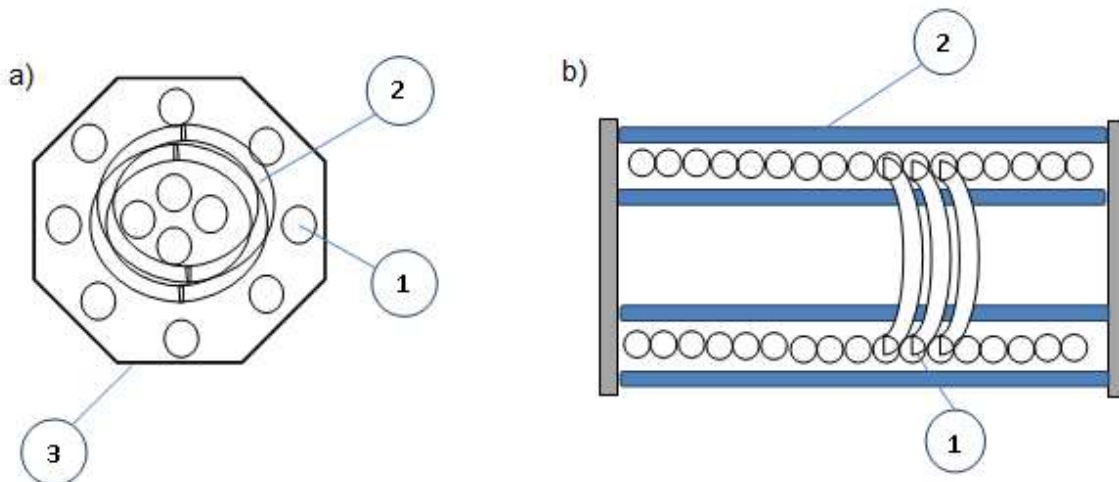


**Figura 3.5.** Esquema del equipo de UV-C de planta.



- |                          |                       |                      |
|--------------------------|-----------------------|----------------------|
| 1-Tablero de control     | 2-Caudalímetro        | 3-Agitador           |
| 4-Tanque de alimentación | 5-Tanque receptor     | 6-Camisa calefactora |
| 7-Válvula de paso        | 8-Válvula de descarte | 9-Bomba centrífuga   |
| 10-Reactor               | 11-Plataforma         |                      |

**Figura 3. 6.** Esquema del interior del reactor. a) Corte transversal del reactor: Lámpara UV-C (1); tubo de FEP dispuesto en forma de coil (2); carcasa de acero inoxidable (3), b) Corte longitudinal del reactor: tubo de FEP dispuesto en forma de coil (1); lámpara UV-C (2).



### 3.11.2 Optimización de las condiciones de operación del reactor UV-C

Debido a que el reactor UV-C a escala piloto fue diseñado y ensamblado durante esta tesis, su prueba, optimización de funcionamiento y puesta a punto fue una parte importante de la misma. Se realizaron una serie de pruebas a fin de seleccionar las condiciones de operación más adecuadas para los tratamientos UV-C.

En primer lugar, se midió el caudal de flujo real correspondiente a cada caudal teórico seleccionado en la bomba. Para ello, se llenó el tanque de alimentación con 50 L de agua y se la hizo circular por el equipo de modo continuo, a distintos caudales. Mientras el agua circulaba, se tomó el tiempo en que un determinado volumen demoraba en salir del reactor. Luego, se realizaron los cálculos adecuados mediante la **Ecuación 3.31** de modo de obtener el caudal en L/h.

$$Q = V/t \quad (\text{Ec. 3.31})$$

Donde,  $Q$  es el caudal real en L/h,  $V$  es el volumen de agua en L medido a la salida del reactor y  $t$  es el tiempo en h durante el cual se midió el  $V$  de salida.

Posteriormente, con los datos del caudal real obtenidos y los valores de viscosidad de cada matriz a evaluar se determinaron los valores del número de Reynolds (ver *Sección 3.3.2*). De este modo se seleccionó como caudal de trabajo, el mínimo que resultara en un régimen turbulento ( $Re > 2000$ ) (Koutchma y col., 2007) de modo tal de trabajar con un mezclado adecuado pero lograr el mayor tiempo de residencia posible dentro del reactor.



Por otro lado, según estudios anteriores se decidió que se trabajaría a 20 °C y a 50 °C ya que la primera temperatura permitió evaluar el efecto del tratamiento UV-C simple, mientras que la segunda implicó un factor de estrés adicional moderado que no perjudicaría la calidad del producto de igual modo que temperaturas mayores (García Carrillo y col 2017, Ferrario y col., 2018). Para mantener la temperatura constante a 20 o 50 °C, se evaluó previamente por un lado, si el calor generado por las lámparas UV dentro del reactor ocasionaba un aumento en la temperatura del sistema durante el tratamiento. Por otro lado, se determinó si al trabajar a 50 °C se perdía calor debido al intercambio de calor entre la cañería y el ambiente externo. Para estas pruebas, se hizo circular agua por el reactor a temperatura ambiente (20 °C) y mediante el uso de dos termocuplas tipo T y un registrador, se registraron las temperaturas de salida del agua a lo largo del tiempo de tratamiento (19 min). Este mismo procedimiento se realizó para el agua a 50 °C. De este modo, se pudo observar si existía un cambio de temperatura o no en el sistema a lo largo del tiempo de tratamiento.

Finalmente se evaluó el modo de operación (por pasada o de modo continuo) que mejor homogeneización de mezclado lograba. Para ello se evaluó en primer lugar el mezclado trabajando con agua peptonada como matriz de prueba, inoculada con *E. coli* ATCC 25922, tomando muestras durante el trabajo en continuo cada 1 minutos tanto en el tanque de alimentación como en el receptor y realizando el recuento del microorganismo inoculado, pero se vio que los resultados eran erróneos ya que el jugo “tratado”, es decir el que ya había atravesado el reactor, se mezclaba de forma poco homogénea con el jugo que aún no había llegado a atravesar el reactor, dando recuentos incoherentes. Por ello, en segundo lugar se determinó que haciendo circular el jugo durante 2 minutos, de un tanque otro, se lograba hacer atravesar por el reactor a prácticamente todo el jugo, evitando que entrara aire en las cañerías, lo cual representaba un problema operativo si se esperaba a que el tanque de alimentación se vaciara completamente. Luego, ese jugo tratado se volvía a circular por 2 min hacia el tanque ahora vacío, y así se trabajó sucesivamente por pasadas, tomando muestras cada 2 pasadas, siempre del mismo tanque. De este modo se estableció que este sistema de trabajo era el que mejor control de las condiciones permitía y mejor mezclado lograba.

### 3.11.3 Caracterización del flujo en el reactor

El cálculo del Reynolds se realizó considerando un caudal de entrada del líquido al reactor de 380 L/h, y con la viscosidad de cada matriz a 20 ó 50 ±1 °C determinada de acuerdo al apartado 3.2.5. El número de Reynolds se obtuvo mediante la ecuación:

$$Re = \frac{D \cdot \rho \cdot v}{\mu} \quad (3.32)$$

En donde  $D$  es el diámetro del tubo de FEP,  $\rho$  es la densidad de la muestra,  $v$  es la velocidad superficial del fluido y  $\mu$  es la viscosidad obtenida de acuerdo al apartado 3.2.5.

Adicionalmente, se calculó el número de Dean ( $De$ ) (**Ecuación 3.33**) con el fin de determinar la existencia de un flujo secundario dentro del tubo que implica la formación de vórtices debido a la curvatura de la cañería (**Figura 3.8**) llamado “efecto Dean” el cual favorece el mezclado del fluido (Koutchma y col, 2009).

$$De = Re * \sqrt{\frac{D}{D_c}} \quad (3.33)$$

En donde  $D$  es el diámetro interno del tubo y  $D_c$  es el diámetro de la hélice que forma el coil.

Por último, se calculó la relación  $D/D_c$ , ya que cuando la misma tiene un valor de entre 0,03 y 0,10, el mezclado se ve favorecido debido a que se promueve la formación de vórtices secundarios (Koutchma (2009).

### 3.11.4 Distribución de los tiempos de residencia en el reactor

La estimación de la distribución de tiempos de residencia (DTR) se realizó mediante la técnica de estímulo-respuesta por inyección de una solución saturada de cloruro de sodio como fue descrito en la *Sección 3.3.3*. Para ello se ensambló una maqueta que imitó el interior del reactor UV-C (**Figura 3.7**). La misma consistió de un tubo coil del mismo diámetro (19 mm) y largo (13,9 m) que aquel presente en el reactor y dispuesto en la misma forma alrededor de una estructura central que lo sostenía. El tubo se conectó en la cañería del reactor luego de la bomba y el caudalímetro, con el objetivo de realizar las pruebas sobre aquellos utilizados para las experiencias reales. Se colocó la jeringa sobre le coil de la maqueta a la distancia que imitaba la entrada al reactor. Luego se inyectó un pulso de 5 mL de una solución marcadora de cloruro de sodio al 10% (m/v) en el caudal estable (380

L/h). La mayor concentración de sal en la solución marcadora respecto a aquella utilizada en la experiencia a escala laboratorio, se implementó para compensar el efecto de dilución que sufriría ya que se trató una mayor sección del coil y un mayor volumen de líquido. Luego de la inyección, se midió la conductividad (Hanna Combo pH EC HI-98129, Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, Estados Unidos) de la solución a la salida del reactor cada 5 s, hasta alcanzar los 90 s. La concentración de cloruro de sodio a la salida del reactor se determinó mediante la comparación contra una curva de calibración confeccionada por soluciones de concentraciones conocidas de cloruro de sodio y su conductividad. La distribución de la concentración de la curva de cloruro de sodio  $c(t)$  se normalizó para obtener la curva  $E(t)$  (Ec. 3.9) y a partir de ella se calculó el tiempo de residencia medio  $\bar{t}$  por medio de la Ecuación 3.10, ambas ya descriptas en la Sección 3.3.3.

**Figura 3.7.** Medición de la distribución de los tiempos de residencia en el reactor UV-C a escala piloto, mediante la inyección de un pulso de NaCl en una maqueta idéntica al reactor.



### 3.11.5 Determinación de la dosis de radiación UV-C

En primer lugar se determinó la potencia total de entrada ( $PTE$ , Watt) del equipo mediante la **Ecuación 3.34**:

$$PTE = P * n^{\circ}lámparas \quad (3.34)$$

donde  $P$  es la potencia total emitida por cada lámpara (Watt) declarada por el fabricante.

Luego se obtuvo el factor de luz UV-C de las lámparas mediante la **Ecuación 3.35**:

$$Factor\ UVC\ (\%) = \frac{(P_{UV-C} * 100)}{P} \quad (3.35)$$

donde  $P_{UV-C}$  es la potencia emitida por cada lámpara en el rango de las longitudes de onda correspondientes al UV (W) y  $P$  es la potencia total emitida por cada lámpara (Watt) ambos datos declarados por el fabricante.

Teniendo en cuenta el factor de transparencia a la luz UV-C del material del tubo coil por donde circulan las muestras dentro del reactor, informado por el fabricante del mismo, el cual tuvo un valor de 0,98, se calculó la potencia UV-C total de entrada ( $PTE_{UV-C}$ , Watt) mediante la **Ecuación 3.36**:

$$PTE_{UV-C} = PTE * Factor\ UVC * 0,98 \quad (3.36)$$

Adicionalmente, se calculó la energía UV-C entregada por volumen ( $E_{UV-C}$ , kJ/L) mediante la **Ecuación 3.37**:

$$E_{UV-C} = \frac{PTE_{UV-C} * Q}{1000} \quad (3.37)$$

donde  $PTE_{UV-C}$  es la potencia UV-C total de entrada expresada en (Watt=J/s) y  $Q$  es el caudal real en L/s.

Posteriormente, se estimaron los valores de los diferentes tipos de fluencia UV-C dentro del reactor a escala piloto, análogamente a lo detallado en la **Sección 3.3.4** para el equipo a escala laboratorio, excepto por la fluencia entregada biosimétrica. La fluencia UV-C incidente ( $H_i$ , mJ/cm<sup>2</sup>) se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, midiendo con el radiómetro (ThermoLab, modelo S302C, Munich, Alemania) sobre las 12 lámparas y registrando los valores medidos (Watt). Posteriormente, aplicando la ecuación 3.20 ya descrita en la **Sección 3.3.4**, se obtuvieron los valores de  $H_i$ .

En el caso de la fluencia absorbida ( $H_r$  mJ/cm<sup>2</sup>), que es dependiente tanto del tiempo y de la fluencia UV-C incidente, como del diseño del reactor y de la matriz a tratar, y se calculó según la **Ecuación 3.38** descrita previamente en la Sección 3.3.4, la cual es:

$$H_r = I_r * t \quad (3.38)$$

en donde, para el caso del reactor a escala piloto,  $I_r$  se se calculó de acuerdo a la **Ecuación 3.39** que se presenta a continuación, a diferencia del descrito en la Sección 3.3.4 para el equipo escala laboratorio ya que en este caso el reactor no tiene un espacio anular:

$$I_r = I_0 * e^{(-\alpha*(r-r_0))} \quad (3.39)$$

en donde  $\alpha$  es el coeficiente de absortividad de la matriz,  $(r-r_0)$  representa la profundidad alcanzada por la luz UV-C ya que es la distancia radial entre la superficie del tubo coil donde incide la luz y las distintas posiciones dentro tubo hasta el centro del mismo (entre 0 mm y 9,5 mm), siendo  $r$  la posición en donde se desea calcular la fluencia y  $r_0$  la superficie del tubo coil (0 mm).

La dosis actinométrica ( $H_{dact}$ ) se midió siguiendo el procedimiento y cálculos análogos a la técnica descrita para esta determinación a escala laboratorio (Sección 3.3.4). En este caso se cargaron 50 L de la solución de Iodato de potasio (0,1 M) y Ioduro de potasio (0,6 M), en buffer borato (0,01 M, pH: 9,25), en el tanque de alimentación y se la hizo circular a través el reactor con las lámparas UV-C encendidas a 380 L/h durante 31 pasadas imitando el proceso propuesto. Se tomaron muestras a intervalos pre-establecidos. Posteriormente, se midió la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro (Hewlett Packard 8453, Hanover, Alemania) a 352 nm y se realizaron los cálculos pertinentes para cuantificarla recurriendo a las **Ecuaciones 3.15-3.19**.

### 3.12 Estudios de reto microbiano

Para los estudios de reto microbiano a escala piloto se prepararon inóculos propagados de 100 mL (Sección 3.8.5) de los siguientes microorganismos: *L. plantarum*, *E. coli*, *S. cerevisiae* y esporas de *A. acidoterretris*, como se detalla en el Esquema 1. Las matrices seleccionadas (descritas en la Sección 3.8.1) para estos estudios fueron: agua peptonada (AP), solución modelo (SM), jugo de pera (JP), jugo blend de naranja-mandarina

(NM) y jugo mix para las bacterias y levaduras; y jugos de limón claro (LC) y limón turbio (LT) para las esporas.

Previo a cada experiencia, se desinfectó el equipo de luz UV-C mediante el encendido de las lámparas por 15 minutos y un enjuague con una solución al 0,5% de un limpiador desinfectante apto para su uso en equipos de tratamiento de alimentos (BioBac, Seiq, Argentina) y tres enjuagues posteriores con agua estéril. Posteriormente cada matriz se cargó en el tanque de alimentación (50 L) y para las experiencias de UV-C simple, se agregaron los 100 mL del inóculo correspondiente y se lo hizo recircular por el equipo con las lámparas apagadas durante 2 min a fin de eliminar las burbujas de aire del sistema y de homogeneizarlo. En el caso de las experiencias de UV-C asistido por calor moderado (UV-C/T, 50 °C), una vez introducida la matriz a tratar en el tanque de alimentación, se encendió la camisa calefactora y se seleccionó a temperatura deseada a alcanzar 50 °C en el controlador. Con el agitador encendido, para mantener un buen mezclado durante el proceso de calentamiento, se esperó hasta que el jugo alcanzara los  $50 \pm 1^\circ\text{C}$  (aproximadamente 15 min). Luego, se agregaron los 100 mL de inóculo e inmediatamente después se recirculó el jugo con las lámparas apagadas por 2 min. Una vez homogeneizado el sistema, ya sea para UV-C o para UV-C/T, se procedió a trabajar por pasadas, haciendo circular a la totalidad del jugo durante 2 minutos cada vez, de un tanque a otro a través del reactor encendido, y se tomaron 5 mL de muestra cada 2 pasadas para su posterior siembra y análisis. El total de pasadas realizadas por corrida fueron 31, determinado en estudios preliminares, lo cual equivalió a 19 min de procesamiento. Todas las experiencias fueron realizadas por triplicado.

### 3.13 Estudios de la microbiota nativa

Se analizó la microbiota nativa para el procesamiento UV-C a escala piloto del jugo exprimido de naranja-mandarina (1:1) obtenido como se describió en la *Sección 3.1.1*, con la única diferencia de que la fruta no fue desinfectada previamente ni se trabajó asépticamente, de modo de conservar la microbiota nativa proveniente de la fruta natural y evaluar el efecto del tratamiento UV-C sobre la misma.

En primer lugar, se sanitizó el equipo como se describió en la *Sección 3.11*. Posteriormente, se introdujo el jugo blend en el tanque de alimentación. Con las lámparas apagadas, se hizo circular el jugo durante 2 min a 380 L/h con el fin de eliminar las burbujas de aire de todo el sistema y de homogeneizarlo. Luego, se recolectó el jugo nuevamente

en el tanque de alimentación, se encendieron las lámparas y se hizo circular al jugo desde el tanque de alimentación hacia el tanque receptor, por 2 min que es el tiempo necesario para que todo el jugo atravesara el reactor, sin llegar a vaciarse ninguna sección de la cañería, evitando el aire en el sistema. Este procedimiento se repitió haciendo circular el jugo a través del reactor de un tanque a otro sucesivamente hasta alcanzar las 31 pasadas y finalmente se recolectó muestra del tanque receptor, para el recuento posterior de microbiota remanente. La muestra tratada y la muestra control (no tratada) fueron fraccionadas en frascos estériles de 20 mL, color caramelo, completamente llenos para evitar la presencia de oxígeno dentro del frasco y se almacenaron a  $5^{\circ}\text{C} \pm 1$ . En el día 0 y durante los días subsiguientes en intervalos de 24 - 48 o 72 hs se tomaron 2 frascos de cada muestra y se realizaron los siguientes recuentos, en distintos medios de cultivo:

- Aerobios mesófilos: Agar PCA, incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  - 72 h.
- Hongos y levaduras: Agar YGC, incubación a  $25^{\circ}\text{C}$  - 5 días.
- Coliformes totales: Mc Conkey, incubación  $37^{\circ}\text{C}$  - 48 h.

Con el fin de observar la evolución de la microbiota nativa a lo largo del almacenamiento, se confeccionaron gráficos de Log N versus día de almacenamiento refrigerado.

Se evaluó la influencia del tratamiento aplicado (UV-C/T,  $50^{\circ}\text{C}$ ) y la población de microbiota nativa, se realizó un ANOVA de dos factores. El nivel de significación fue fijado en  $p < 0,05$ . Se verificaron las suposiciones de homocedasticidad, normalidad, y se removieron datos anormales si correspondía. Los contrastes de interacción se efectuaron mediante la prueba de Tukey.

### **3.14 Enumeración de los microorganismos sobrevivientes**

El recuento de los microorganismos sobrevivientes tanto en las experiencias de reto microbiano como en las de microbiota nativa se realizó según la *Sección 3.6*.

### **3.15 Modelado matemático**

Una vez recolectados los datos obtenidos en los experimentos de reto microbiano, se realizó el modelado matemático como se describió en la *Sección 3.7*.

### 3.16 Estudios de calidad físico-química

Con el objetivo de evaluar si el tratamiento UV-C/T a escala piloto modificó la calidad físico-química de los jugos blend de naranja-mandarina exprimido y comercial inmediatamente luego del tratamiento y durante el almacenamiento, se midieron los parámetros de color, pH, turbidez, sólidos solubles, contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante siguiendo la metodología descrita en la *Sección 3.8* a lo largo de 30 días posteriores al tratamiento. Se sumó además para el jugo utilizado a escala piloto, la determinación de flavonoides.

#### 3.16.1 Flavonoides

Para la determinación del contenido de flavonoides se mezclaron 500  $\mu\text{L}$  de muestra de jugo con 1,25 mL de agua y 0,075 mL de  $\text{NaNO}_2$ . Se dejó reposar la muestra al resguardo de la luz, durante 5 min y luego se le agregaron 0,5 mL de  $\text{NaOH}$  y 0,275 mL de agua destilada. Luego de 6 min de reposo en oscuridad se le agregaron 0,125 mL de  $\text{AlCl}_3$  e inmediatamente se midió en un espectrofotómetro, la absorbancia de la muestra a 510 nm. Luego se calculó el contenido de flavonoides mediante la **Ecuación 3.40**:

$$\text{CF} \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \left( \frac{\text{Abs} - 0,0028}{5,157} \right) * \text{factor dilución} \quad (3.40)$$

#### 3.16.2 HMF

Para la cuantificación de HMF se mezclaron 5 mL de muestra con 5 mL de etanol (95%v/v) y se centrifugó a 1000 rpm por 15 min. El sobrenadante (2 mL) se mezcló luego con 2 mL de ácido tricloroacético (12% p/p) y 2 mL de ácido tiobarbitúrico (0,025 M). La mezcla se incubó a 40°C por 50 min, se enfrió inmediatamente y se midió la absorbancia de la misma a 443 nm. Se realizó una curva de calibración con un patrón de HMF (99 % p/p, Sigma Aldrich, EEUU) para poder cuantificar la concentración del mismo en las muestras (**Ecuación 3.41**)

$$\text{HMF mg/L} = 0,0219 x + 0,0116 \quad (3.41)$$

#### 3.16.3 Vitamina C



La cuantificación de vitamina C en las muestras se llevó a cabo mediante una titulación empleando 2,6-diclorofenol indofenol al 0,1% como valorante. Para ello, se colocó 1 mL de 2,6-diclorofenol indofenol en un tubo de ensayo y se tituló gota a gota con una solución estándar de ácido ascórbico al 0,1%, hasta la decoloración total del 2,6-diclorofenol indofenol. Se registró el volumen de solución estándar de ácido ascórbico utilizado para valorar el 2,6-diclorofenol indofenol, para luego compararlo con la muestra. Luego se procedió a la titulación de 1 mL de 2,6-diclorofenol indofenol utilizando la muestra como valorante, y se registró el volumen de la misma utilizado. La concentración de ácido ascórbico se calculó mediante la **Ecuación 3.42**, y el resultado se expresó en mg de ácido ascórbico/100 mL de muestra.

$$\frac{mg\ AA}{100\ mL\ muestra} = \frac{Vol\ sn\ estándar\ de\ AA\ 0,1\%}{Vol\ muestra} * 100\ (3.42)$$

#### 3.16.4 Actividad enzimática

Para la determinación de la actividad de la enzima pectin metilesterasa (PME) en las muestras se preparó, el día previo a la determinación, una solución sustrato de pectina compuesta por 1%*m/v* de pectina y 0,3 M de NaCl y se la llevó a pH 7,5 mediante el agregado gota a gota de NaOH 0,05 N. Para lograr la completa disolución de la pectina se trabajó sobre un agitador magnético, agregando la pectina previamente tamizada, poco a poco. En el día de la medición se preparó una solución de azul de bromotimol al 0,01%*v/v* y se la colocó junto a la solución de pectina durante 1 hora en la estufa a 30°C, a fin de atemperar los reactivos. Luego, se centrifugaron 5 mL de muestra a 3200 *g* durante 10 min, se conservó el sobrenadante y se ajustó el pH del mismo 7,5 agregando gota a gota una solución de NaOH al 0,05 N. Posteriormente, se fijó la longitud de onda de medición en el espectrofotómetro en 620 nm, y se mezclaron directamente en la cubeta del mismo 500 µL de solución de azul de bromotimol al 0,01%, 1 mL de solución de pectina, 775 µL de agua destilada y 250 µL del sobrenadante de la muestra con pH ajustado. Se midió inmediatamente la absorción a 620 nm y se registró cada 2 segundos durante 10 min. A continuación se graficó la absorbancia en función del tiempo y se obtuvo la pendiente (*m*) de la sección lineal de la curva obtenida. Mediante la **Ecuación 3.43** se obtuvo la actividad enzimática expresada en U:

$$Actividad\ PME = \frac{1U*m}{0,01} * \frac{1\ mL}{0,250\ mL}\ (3.43)$$

En el caso de la determinación de la actividad de las enzimas polifenol oxidasa (PPO) y peroxidasa (POD), se preparó un buffer fosfato 0,2 M mezclando 7,2 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,68 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 58,4 g de NaCl en 1 L de agua destilada y se lo ajustó a pH 6,5 utilizando una solución de NaOH 0,05 N. Se tomaron 100 mL del buffer y se adicionaron 4 g de PVPP previamente tamizado, en constante agitación sobre el agitador magnético a 30°C. Luego, se mezclaron 10 mL de muestra con 10 mL de buffer fosfato 0,2 M con 4% de PVPP, previamente preparado y se agitó la mezcla en un agitador magnético durante 1 h a 4°C para lograr una extracción. Posteriormente, se centrifugó la mezcla a 3200 g por 15 min a 4°C y se conservó el sobrenadante del extracto enzimático.

Parte del sobrenadante se utilizó para determinar la actividad de la PPO. Para ello se seteó el espectrofotómetro en la longitud de onda de 480 nm, se realizó el autocero con buffer fosfato, y luego se mezcló en la cubeta ya colocada 1 mL de sobrenadante con 2,5 mL de pirocatecol 0,07 M previamente atemperado en estufa a 30°C. Este último debe estar fresco, es decir preparado hace pocos días o en el día, y debe encontrarse translúcido. Se registró la absorbancia a 480 nm de la muestra cada 20 segundos durante 3 minutos. Se graficó la absorbancia en función del tiempo y se obtuvo la actividad enzimática a partir del valor de la pendiente (m) de la zona lineal de la curva obtenida, expresada en U mediante la **Ecuación 3.44**:

$$\text{Actividad PPO} = \frac{1U*m}{0,01} * \frac{1 mL}{0,5mL} \quad (3.44)$$

Otra parte del sobrenadante del extracto enzimático se utilizó para la determinación de la actividad de la enzima POD. Para ello se mezclaron en la cubeta del espectrofotómetro, previamente seteado en 470 nm, 200 µL del sobrenadante con 3 mL de guaiacol 1% v/v disuelto en el buffer fosfato previamente preparado y 200 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,5% v/v en agua destilada (preparada en el día). Todos los reactivos deben estar previamente atemperados a 30°C. Inmediatamente, se procedió a registrar la absorbancia a 470 nm de la mezcla cada 20 segundos durante 3 minutos. Luego se graficó la absorbancia en función del tiempo y se obtuvo la actividad enzimática a partir del valor de la pendiente (m) de la zona lineal de la curva obtenida, expresada en U mediante la **Ecuación 3.45**:

$$\text{Actividad POD} = \frac{1U*m}{0,01} * \frac{1 mL}{0,200 mL} \quad (3.45)$$

## 3.17 Análisis sensorial

### 3.17.1 Área de prueba

Las evaluaciones sensoriales se llevaron a cabo en un Laboratorio de Análisis de Alimentos. El mismo fue diseñado siguiendo las normas internacionales. El laboratorio cuenta con tres sectores: el área de preparación de muestras que cuenta con mesadas amplias, microondas, heladera y pileta de lavado; la sala de discusión o entrenamiento donde hay una mesa, sillas y una computadora, y el área de prueba donde se ubican 6 cabinas de prueba. Las cabinas se componen de una mesada de color blanco iluminada con un juego de 3 luces para el enmascaramiento de muestras, una computadora, llamador de luz de doble comando y un pasa-muestras por donde los evaluadores entregan las bandejas a los panelistas con el objetivo de no perturbar a los mismos durante el análisis. La tecla de luz de doble comando, al ser presionada por los panelistas, enciende una luz roja del lado externo de la cabina para solicitar la atención de los evaluadores de manera silenciosa. Por último, las cabinas cuentan con 3 tipos de luces: luz blanca, roja y azul, las cuales son utilizadas según el tipo de muestra y de test a realizar. La luz blanca se implementa en pruebas donde no es necesario o no se desea enmascarar el aspecto de las muestras, mientras que la luz roja o azul tienen como objetivo que los panelistas no perciban determinadas características del aspecto de las muestras que están comparando que no desea el organizador de la prueba que incidan en la respuesta. Adicionalmente el laboratorio es blanco para no llamar la atención en ningún sentido, cuenta con un equipo de aire acondicionado para mantener una temperatura agradable. La sala es silenciosa, aislada de distracciones externas y tiene acceso a internet para cada terminal de computadora (ISO 8589:2007).

### 3.17.2 Evaluadores

Para cada análisis sensorial se convocaron entre 100 y 120 consumidores frecuentes de jugos frutales de edades entre 18 y 60 años, que pudieran desenvolverse cómodamente con las planillas digitales. Todos ellos fueron no remunerados y, en el caso del test TDS, se los capacitó en el uso del software previo a la prueba (**Figura 3.8 a**).

**Figura 3.8.** Laboratorio de Análisis Sensorial de Alimentos. a) Sala de entrenamiento/discusión donde se explica y capacita a los panelistas sobre la evaluación a

realizar y el uso del software, b) Bandeja preparada para la prueba sensorial de jugo de naranja-mandarina: un vaso de agua, un vaso con muestra UV-C/T y un vaso con muestra Control, c) Bandejas dispuestas en las cabinas ocupadas por consumidores y evaluadora entregando las muestras a través del pasa-muestras, d) y e) panelistas realizando la evaluación sensorial del jugo.

a)



b)



c)



d)



e)



### 3.17.3 Evaluación sensorial del jugo comercial de naranja-mandarina

#### 3.17.3.1 Test de campo

El Test de campo se realizó para el jugo comercial diluido de naranja-mandarina tratado por UV-C/T (UV-C/T-comercial) y para una muestra del mismo jugo, procesada mediante un procesamiento térmico tradicional (T-comercial) como control de procesamiento. El tratamiento térmico aplicado fue de  $80 \pm 1$  °C durante 6 min. Para ello se conectó un tubo coil de vidrio encamisado, conectado por mangueras sanitarias (Masterflex, Barrington, Illinois, Estados Unidos), a un baño térmico a 80°C (**Figura 3.9**). Una vez alcanzada la temperatura se hizo recircular el jugo por el coil durante 6 min, siendo descargado en un contenedor de vidrio previamente sanitizado (García Carrillo y col., 2020).

La evaluación sensorial se realizó, en primer lugar, sobre jugo comercial como prueba preliminar previa a su realización sobre jugo natural exprimido, la cual se llevó a cabo en la etapa posterior. Esta decisión se tomó para optimizar recursos ya que es una gran cantidad de fruta la que se precisa para cada experimento realizado sobre jugo natural a escala piloto.

La prueba se diseñó de acuerdo a las recomendaciones citadas por Lawless y Heymann (2010b). En primer lugar, se solicitó a todos los evaluadores que juzgaran al producto de acuerdo a su aceptabilidad global en una escala hedónica balanceada de 9

puntos siendo 1 “me disgusta extremadamente” y 9 me “gusta extremadamente”. Luego, en el mismo formulario se hicieron preguntas sobre ciertos atributos del producto para que el consumidor respondiera mediante en una escala de punto justo (JAR) de 5 puntos, en donde 1 representaba por ejemplo “muy poco ácido”, el 3 era “adecuada acidez” y 5 era “extremadamente ácido”, de modo de evaluar que tan adecuado se expresaba ese atributo en la muestra para el consumidor (**Formulario 1**). Para analizar el cambio en la percepción y aceptabilidad del jugo a lo largo del consumo del producto, se pidió a los consumidores que probaran la misma muestra en tres sorbos consecutivos (se les sirvió cada muestra repetida en 3 vasos separados, donde cada vaso representaba 1 sorbo, **Figura 3.10**) y que completaran la planilla luego de ingerido cada sorbo.

Finalmente se procedió a analizar la información recolectada mediante la distribución de frecuencias de los puntajes asignados en la prueba de impresión global. Dado que la distribución de frecuencias resultó bimodal, se llevó a cabo un análisis de conglomerados (método de agrupamiento promedio ponderado y distancia Euclídea) para vislumbrar la existencia de segmentación en la preferencia de los consumidores por el jugo de NM. La bondad del ajuste global se midió por el coeficiente CCC (Lawless, 2013).

Se realizó un Análisis de la Varianza multivariado para revelar si las muestras fueron significativamente diferentes entre sí. Se realizó un PCA para encontrar asociaciones entre los grupos de preferencia o clúster encontrados y los puntajes otorgados en el test hedónico y en las escalas de los distintos atributos, de modo de poder vislumbrar en qué atributos residían las diferencias encontradas entre los grupos de consumidores.

Se aplicó un *test de penalidad* sobre los datos obtenidos a partir del JAR clasificando a los consumidores en tres grupos: por debajo, por sobre o sobre el punto justo de cada categoría evaluada. La diferencia entre el puntaje hedónico otorgado por el grupo de consumidores que puntuó los atributos por sobre y por debajo del punto justo (*Mean drop*) se graficaron en función de la proporción del total de consumidores. De este modo, el test de penalidad permite evaluar cuál de los atributos percibido como fuera de su punto justo, penaliza en mayor medida a la aceptabilidad global de la muestra, es decir, al puntaje hedónico otorgado por los consumidores.

**Figura 3.9.** Tratamiento térmico (80°C - 6 min) de jugo naranja-mandarina en coil de vidrio conectado a baño termostático.



### 3.17.3.2 Test T-CATA

La prueba de T-CATA (“Temporal-Check All That Apply”) permite seleccionar qué atributos sensoriales son percibidos en la muestra y a lo largo del tiempo de consumo con el propósito de establecer un cambio el perfil sensorial debido a posibles efectos de fusión, solapamiento y/o emergencia de atributos sensoriales a medida que procedía la ingesta. Para ello, los panelistas respondieron un cuestionario digital realizado en Google forms (**Formulario 1**), el cual consistió en seleccionar dentro de una lista de descriptores, aquellos que aplicaban a la muestra que se estaba evaluando. En el caso del jugo comercial de tratado por el procesamiento UV-C asistido (UV-C/T-comercial), los descriptores utilizados fueron: *color débil, color intenso, sabor natural, dulce, sabor intenso, sabor artificial, refrescante, frutal, poco frutal, sabor persistente, cuerpo agradable, amargo, ácido, aroma agradable y saludable*. Los descriptores aparecieron en orden aleatorio para cada



consumidor siguiendo las recomendaciones de Ares y Jaeger (2013). Con el objetivo de analizar la influencia del paso del consumo en la percepción del sabor, se pidió a los evaluadores que completaran la misma planilla de T-CATA (**Formulario 1**) en 3 sorbos consecutivos. Con las tablas de frecuencias de mención obtenidas para los atributos para cada muestra y sorbo, se realizó un Análisis de Correspondencias, que se basa en la distancia Chi-cuadrado, y se obtuvo la representación gráfica bidimensional del mismo.

**Formulario 1.** Planilla para Test de Campo y T-CATA de jugo comercial de naranja-mandarina tratado por UV-C/T.

---

## Evaluación de un jugo a base de naranja-mandarina

número de panelista

.....

código de muestra

.....

Número de sorbo

.....

Pruebe el sorbo completo de la muestra recibida y confiando en su primera impresión, 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. No me gusta ni me disgusta
- 4. Me disgusta algo
- 3. Me disgusta moderadamente
- 2. Me disgusta mucho
- 1. Me disgusta extremadamente

1. ¿Cuán ÁCIDO es el producto?

- muy poco ácido
- poco ácido
- adecuada acidez
- muy ácido
- extremadamente ácido

2. ¿Cuál es su opinión acerca del AROMA del producto?

- demasiado débil
- débil
- adecuado
- fuerte
- demasiado fuerte

3. ¿Cuál es su opinión acerca del SABOR FRUTAL del producto?

- demasiado débil
- débil
- adecuado
- fuerte
- demasiado fuerte

4. ¿Cuál es su opinión acerca del CUERPO/VISCOSIDAD del producto? \*

- muy poco cuerpo
- poco cuerpo
- adecuado
- muy viscoso
- extremadamente viscoso

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

- sabor artificial
- fresco/refrescante
- acidez
- dulzor
- amargor
- sabor natural
- sabor persistente (con regusto)
- sabor frutal
- sabor a cocido
- sabor intenso
- color suave
- aroma agradable
- no mucho sabor afrutado
- color intenso
- saludable

**Figura 3.10.** Presentación de una muestra dividida en 3 sorbos para la realización de Test de campo y T-CATA.



#### 3.17.4 Evaluación sensorial de jugo natural de naranja-mandarina

Posteriormente al análisis del jugo comercial, se realizó un análisis sensorial sobre el jugo natural exprimido de naranja-mandarina con procesamiento por luz UV-C asistida, UV-C/T, (UV-C/T natural) a escala piloto (21 pasadas, 12 min). Cabe aclarar que, de acuerdo a los resultados obtenidos en las experiencias de reto microbiano y al análisis sensorial preliminar realizado sobre jugo comercial diluido, se optimizó el tratamiento para el producto propuesto, reduciendo la cantidad de pasadas de 31 a 21, lo que equivale a 12 minutos de tratamiento.

##### 3.17.4.1 Test de campo

Mediante un formulario digital (**Formulario 2**), se solicitó a todos los evaluadores que en primer lugar juzgaran al producto de acuerdo a su aceptabilidad global en una escala hedónica balanceada de 9 puntos siendo 1 “*Me disgusta extremadamente*” y 9 “*Me gusta extremadamente*”. A continuación debieron valorar mediante en una escala de punto justo (JAR) de 5 puntos, siendo el punto 3 el “adecuado”, la acidez, el cuerpo/viscosidad y el

sabor frutal del jugo. El aroma lo evaluaron en una escala hedónica de 5 puntos, siendo 1 “Muy desagradable” y 5 “Muy agradable”.

La información recolectada de modo digital se analizó teniendo en cuenta la distribución de frecuencias de los puntajes asignados en la prueba de impresión global. Se realizó un Análisis de la Varianza multivariado para revelar si las muestras fueron significativamente diferentes entre sí y para ver si hubo diferencias significativas en la puntuación de cada atributo en las escalas JAR.

Se aplicó un *test de penalidad* sobre los datos obtenidos a partir del JAR clasificando a los consumidores en tres grupos: por debajo, por sobre o sobre el punto justo de cada categoría evaluada. La diferencia entre el puntaje hedónico otorgado por el grupo de consumidores que puntuó los atributos por sobre y por debajo del punto justo (*Mean drop*) se graficaron en función de la proporción del total de consumidores. De este modo, determinamos cuál de los atributos percibido como fuera de su punto justo, penaliza en mayor medida a la aceptabilidad global de la muestra.

#### 3.17.4.2 Test CATA

En una prueba de CATA (“Check All That Apply”) los consumidores deben seleccionar de entre una lista de descriptores o atributos, aquellos que consideran que son adecuado para describir a la muestra que están evaluado. Las palabras de la lista se seleccionan previamente teniendo en cuenta las características del producto y las mismas aparecieron en orden aleatorio para cada consumidor (Ares y Jeger, 2013). En este caso los descriptores de la lista fueron: *sabor artificial, ácido, natural, dulce, color natural, aroma agradable, sabor cítrico, color artificial, saludable, picante, amargo, refrescante/fresco, sabor persistente/con regusto y con pulpa (Formulario 2)*. A diferencia del test T-CATA descrito previamente en la Sección 3.17.3.2, la prueba CATA se realiza sólo una vez, es decir no se realiza contestando el formulario consecutivamente para distintos sorbos ya que en este caso se busca evaluar la muestra en el tiempo ni conocer la influencia del sabor residual.

Con las tablas de frecuencias de mención obtenidas para cada descriptor realizó un Análisis de Correspondencias, que se basa en las distancia Chi-cuadrado, y se obtuvo la representación gráfica bi-dimensional donde se pudo ver espacialmente a qué palabra se asoció cada muestra.

### 3.17.4.3 Jugo Ideal

Por último, los consumidores debieron seleccionar de una lista de descriptores o atributos, aquellos que a su criterio aplican a lo que sería una muestra ideal de jugo cítrico (**Formulario 2**). La lista de palabras fue a misma que en la prueba de CATA descripta previamente en el *Apartado 3.17.4.2*. Los datos obtenidos se procesaron junto a aquellos obtenidos para la prueba CATA realizada sobre las muestras y se incluyeron en el Análisis de Correspondencias previamente detallado en el *Apartado 3.17.4.2*.

**Formulario 2.** Formulario digital (Google Forms) del Test de campo y CATA para la evaluación sensorial de un jugo natural de naranja-mandarina tratado por UV-C asistido por calor moderado (UV-C/T natural), un jugo comercial tratado por alta temperatura (T-comercial) y un jugo cítrico Ideal.

---

## Evaluación de un jugo cítrico

Numero de panelista \*

.....

Pruebe un sorbo de la muestra recibida y confiando en su primera impresión, 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. No me gusta ni me disgusta
- 4. Me disgusta algo
- 3. Me disgusta moderadamente
- 2. Me disgusta mucho
- 1. Me disgusta extremadamente

Pruebe nuevamente el producto y a continuación de su opinión respecto a cada atributo:

1. ¿Cuán ÁCIDO es el producto?

- muy poco ácido
- poco ácido
- adecuada acidez
- muy ácido
- extremadamente ácido

2. ¿Cuál es su opinión acerca del AROMA del producto?

- muy desagradable
- un poco desagradable
- agradable
- un poco agradable
- muy agradable

3. ¿Cuál es su opinión acerca del SABOR CÍTRICO del producto?

- demasiado débil
- débil
- adecuado
- fuerte
- demasiado fuerte

4. ¿Cuál es su opinión acerca del CUERPO/VISCOSIDAD del producto? \*

- muy poco cuerpo
- poco cuerpo
- adecuado
- muy viscoso
- demasiado viscoso



a) Por favor, tilde todas las palabras o frases que usted considere que aplican a la bebida (puede volver a probar la bebida si lo necesita)

- sabor artificial
- ácido
- natural
- sabor a cocido
- dulce
- color natural
- aroma agradable
- sabor a naranja
- color artificial
- saludable
- picante
- amargo
- refrescante/fresco
- sabor persistente/con regusto
- con pulpa
- sabor a mandarina

Seleccione todas las palabras o atributos que usted considere IDEALES en un jugo de frutas cítricas

- sabor artificial
- ácido
- natural
- sabor a cocido
- dulce
- color natural
- aroma agradable
- color artificial
- saludable
- picante
- amargo
- refrescante/fresco
- sabor persistente/con regusto
- con pulpa
- sabor a fruta

#### **3.17.4.4 Test de Dominancia Temporal de Sensaciones (“TDS”)**

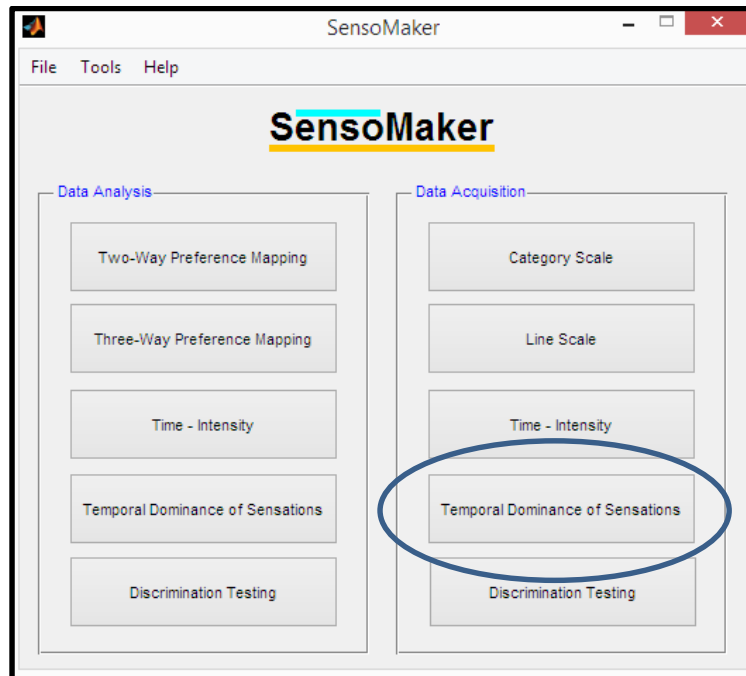
El test de Dominancia temporal de sensaciones (TDS) es un método sensorial descriptivo reciente, que consiste en evaluar y determinar repetidamente cuál sensación es dominante, hasta que el sabor deja de persistir. Es decir, que esta metodología tiene en consideración la naturaleza dinámica del acto de comer que implica un cambio constante en la respuesta sensorial al ingerir un producto. Para esta técnica se utilizó el software “Sensomaker” el cuál fue desarrollado por la Universidad de Lavras, Lavras, Brasil en el

año 2014. El mismo es de descarga y uso gratuito. Este software permite la realización de varios test sensoriales entre ellos el TDS (**Figura 3.11**).

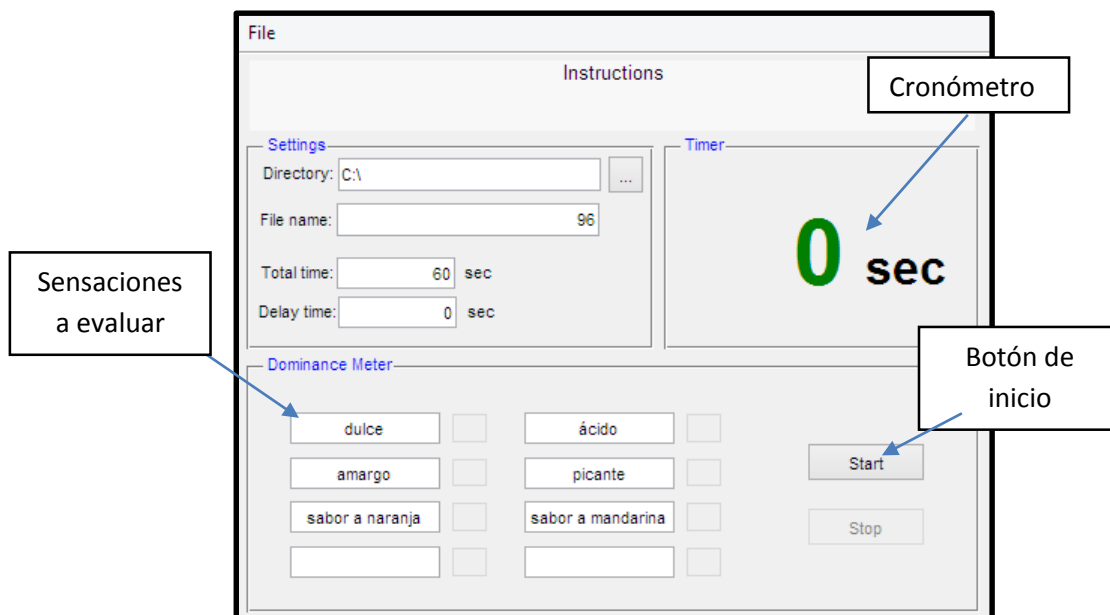
Para la realización del test se procedió a convocar a 100 consumidores frecuentes de jugos cítricos. Una vez en el laboratorio de análisis sensorial de alimentos, en la sala de discusión preparada para ello, se les explicó en qué consistía la prueba TDS y se los capacitó en el uso del software mediante la realización de una prueba de entrenamiento realizada con una galletita de agua sin sal. Todos los consumidores debieron realizar el entrenamiento previo a la prueba de los jugos para familiarizarse con la prueba, con el software y para despejar cualquier duda que tuvieran. La prueba se diseñó de forma tal de imitar el consumo habitual de un alimento, por lo tanto, en el caso del entrenamiento con la galletita, se le solicitó a los consumidores dieran inicio a la prueba apretando “start”, e inmediatamente (casi simultáneamente) probara un mordisco y comenzara a seleccionar la palabra que describiera la sensación dominante en su boca. En caso de que la sensación perdurara debían seleccionar (es decir, “clickear”) la palabra constantemente hasta dejar de sentirla o hasta que otra sensación dominara. En caso de esto último, el consumidor debía entonces, seleccionar la palabra que describiera la nueva sensación y continuar mientras perdurara. Luego de 20 segundos, que se podían visibilizar en un cronómetro que aparece en pantalla a lo largo de la prueba, los consumidores debían probar un segundo mordisco y repetir el procedimiento de selección de la sensación dominante a lo largo de 20 segundos más. Por último, al alcanzar los 40 segundos de prueba, los consumidores debían probar un tercer mordisco y continuar con la selección de sensaciones dominantes. A los 60 segundos, la prueba finalizaba automáticamente.

**Figura 3.11.** Pantallas del software Sensomaker. a) Pantalla inicial para la selección del test a realizar, b) pantalla visible al momento previo a realizar el test, c) pantalla visible durante la realización del test.

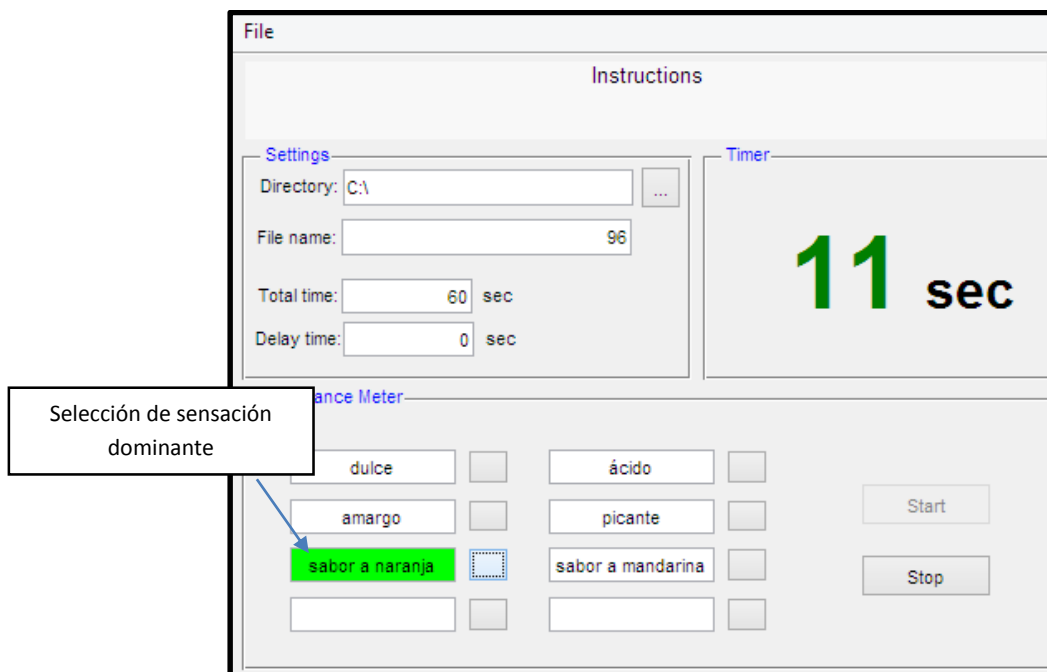
a)



b)



c)



Inmediatamente después del entrenamiento, cada consumidor se acomodó en una cabina, y realizó la prueba sobre dos muestras de jugo (**Figura 3.8 c, d y e**). Como se detalla en la *Sección 3.17.5* la muestra a evaluar fue el jugo exprimido de naranja-mandarina tratado por UV-C asistido por calor moderado (50°C) a escala piloto durante 12 minutos (UV-C/T natural). La muestra control fue jugo concentrado comercial de naranja, previamente diluido según las indicaciones del fabricante y pasteurizado por temperatura en un coil (T-comercial, 6 min-80 °C) a fin de imitar la segunda pasteurización que se realiza en las industrias antes de envasar el jugo diluido. En el caso de los jugos, el consumidor debía realizar en primer lugar la prueba TDS, consumiendo 3 sorbos consecutivos cada 20 segundos, y seleccionar las sensaciones dominantes en cada instante, al igual que se explicó previamente con los mordiscos de la galletita en el entrenamiento. Luego, procedía a realizar el test de campo (*Apartado 3.17.5.2*) para la misma muestra. Al finalizar, se enjuagaba la boca con agua y una galletita de agua sin sal y debía proceder a realizar ambas pruebas con la segunda muestra.

La muestra control y la correspondiente UV-C/T se entregaron en orden aleatorio a fin de balancear el posible sesgo en la percepción de una muestra sobre la otra.

## 4 Resultados y discusión



## PARTE 1: ESCALA LABORATORIO

Con el objetivo de evaluar el efecto del tipo de matriz y del microorganismo a tratar en la eficacia del tratamiento por luz UV-C, se comenzó a trabajar en un reactor continuo de capa delgada a escala laboratorio. En estas experiencias se procesó un volumen de matriz de 750 mL y se evaluaron matrices simples (bebidas claras) y complejas (blends y jugos fuertemente coloreados, de elevada turbidez y/o con partículas en suspensión) desde el punto de vista óptico. Se estudió la inactivación de un amplio espectro de microorganismos de interés en jugos frutales. Adicionalmente, se realizó reto microbiano empleando diferentes cócteles como microbiota de fondo. De este modo, se investigó la resistencia y cinética de inactivación de cada microorganismo y el efecto de la microbiota de fondo, simulando el contexto real de los jugos, en la eficacia del tratamiento.

### 4.1 Caracterización de las matrices

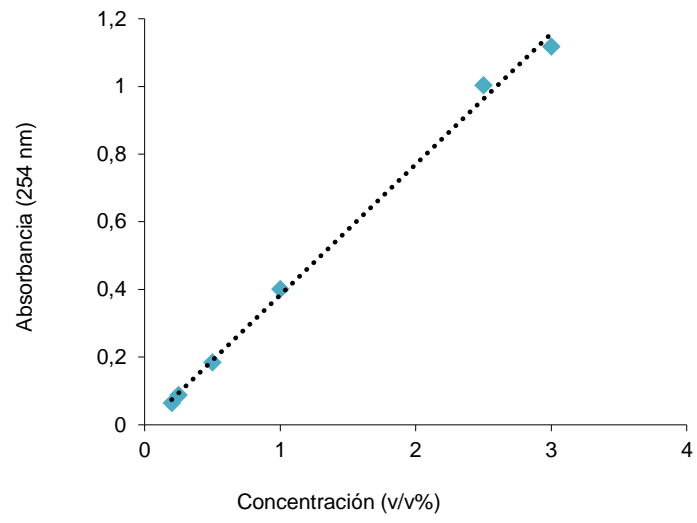
La **Figura 4.1** presenta los gráficos de concentración (% v/v) versus absorbancia a 254 nm ( $A_{254\text{nm}}$ ), realizado para el jugo exprimido de naranja-mandarina y los jugos comerciales de limón claro y mix, obtenidos de acuerdo al procedimiento descrito en la *Sección 3.2.2*. A partir de la pendiente de la recta obtenida en el gráfico, se determinó el coeficiente de absorptividad ( $\alpha_{254\text{nm}}$ ) de la matriz (**Tabla 4.1**). Por otro lado, se calculó el valor de transmitancia UV (TUV) mediante la **Ecuación 3.2** (**Tabla 4.1**) teniendo en cuenta el valor de  $A_{254\text{nm}}$  de cada matriz.

La **Figura 4.2** muestra las distribuciones de tamaño de partícula de los blends naranja-mandarina y mix, las cuales fueron multimodales, presentando un pico en el valor de 630  $\mu\text{m}$  y dos picos de 0,478 y 120  $\mu\text{m}$ , respectivamente (**Tabla 4.1**). El valor medio de tamaño de partícula del jugo de limón claro fue medido en el equipo Zetasizer, tal como se describe en el *Apartado 3.2.4* y tuvo un valor de 0,532  $\mu\text{m}$ .

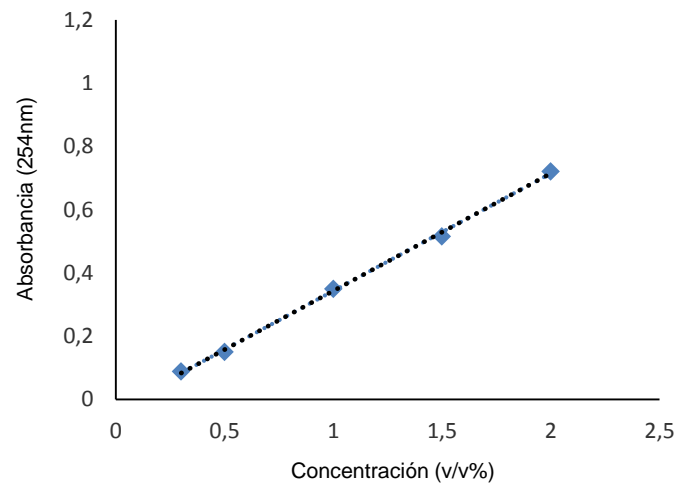
Por otro lado, la **Tabla 4.1**, presenta también los valores de pH, turbidez, %UVT, °Brix, color y viscosidad de las tres matrices estudiadas en esta etapa.

**Figura 4.1.** Concentración (v/v%) versus absorbancia (a 254 nm) de las diferentes matrices evaluadas: a) jugo de naranja-mandarina exprimido, b) jugo Mix, c) jugo de limón claro.

a)

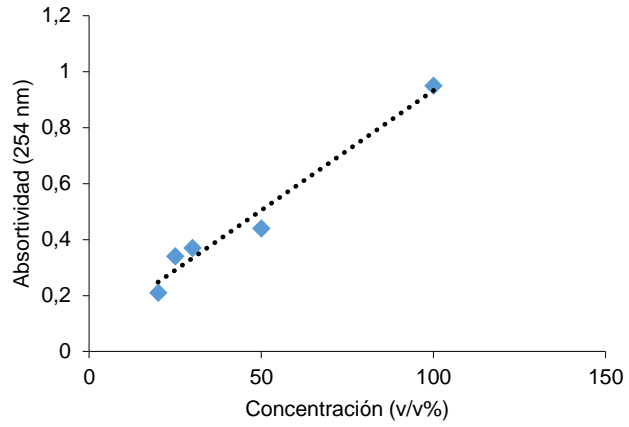


b)



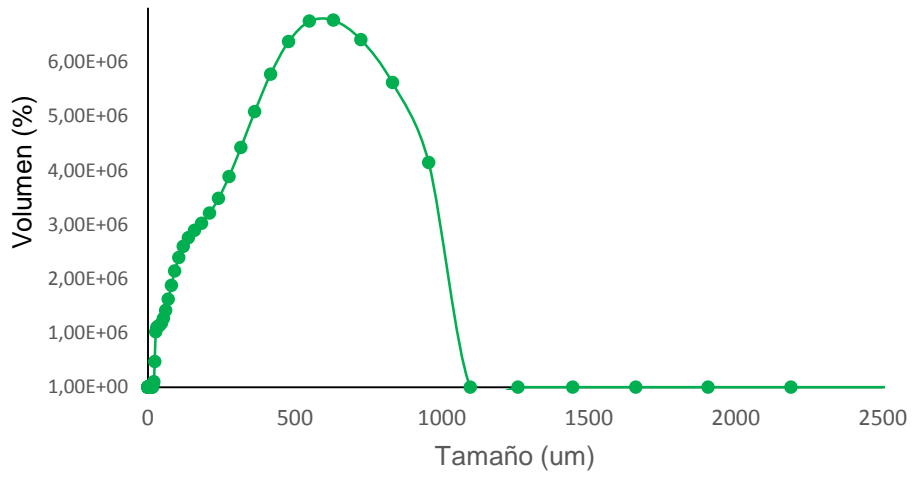
c)



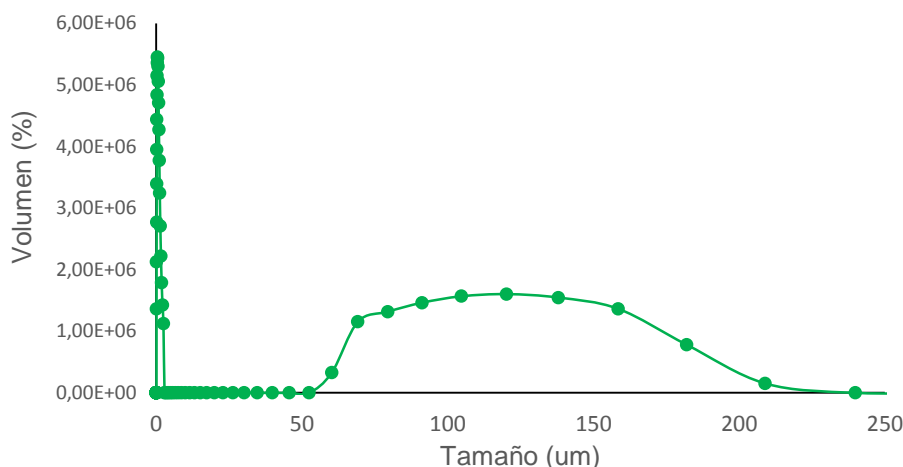


**Figura 4.2.** Volumen de partículas (%) versus tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ ) de a) jugo exprimido de naranja-mandarina, b) jugo mix.

a)



b)



De acuerdo a los resultados obtenidos (**Figuras 4.1 y 4.2, Tabla 4.1**), el jugo de limón claro fue el de menor turbidez, tamaño de partícula y coeficiente de absorptividad ( $\alpha_{254nm}$ ). A la vez, fue el jugo más ácido presentando un pH de  $2,9 \pm 0,1$ , mientras que los jugos de naranja-mandarina y mix tuvieron valores de pH muy similares, de  $3,9 \pm 0,1$  y  $3,7 \pm 0,1$ , respectivamente. Comparando estas últimas dos matrices, que son las más complejas, fueron muy similares en la mayoría de las características fisicoquímicas, excepto en el valor de viscosidad la cual fue mayor en el jugo natural de naranja-mandarina ( $12,4 \pm 0,0$  mPa/s) que en el mix, el cual tuvo un valor mucho menor ( $3,6 \pm 0,0$  mPa/s).

La determinación de las características previamente descritas es fundamental para el diseño del tratamiento ya que se ha comprobado que la efectividad de la luz UV-C es altamente dependiente de las mismas. Esto se debe a que, para que la inactivación ocurra, los fotones de luz deben alcanzar a las células microbianas blanco, por lo cual, la presencia de cuerpos que absorban la luz y/o impidan el paso de la misma, perjudicarán la efectividad del tratamiento. Es por ello que se esperan resultados menos satisfactorios cuando se tratan matrices complejas como jugos turbios, comparadas con jugos o bebidas claras. Por ejemplo, Barut Gök (2021) evaluó la inactivación de *Lactobacillus plantarum* NRIC1749 y *Saccharomyces cerevisiae* NCIB4932 en jugos de manzana y de uva morada tratados por luz UV-C simple en un reactor de flujo Dean ( $1668 \text{ mJ cm}^{-2}$  and  $1232 \text{ mJ cm}^{-2}$  respectivamente). Como era esperable, el autor concluyó que la inactivación microbiana fue mucho mayor en el jugo de manzana ( $\alpha_{254nm}=0,35 \text{ cm}^{-1}$ ) logrando 4,07 y 1,80 reducciones logarítmicas para *L. plantarum* y *S. cerevisiae*, respectivamente, y menor en el jugo de uva

cuyo valor de  $\alpha_{254nm}$  fue  $1,00 \text{ cm}^{-1}$  y se alcanzaron tan solo 0,69 y 0,46 reducciones logarítmicas, respectivamente.

**Tabla 4.1.** Valores promedio con su desviación estándar de: pH, grados Brix, turbidez (T), coeficiente de absortividad ( $\alpha_{254nm}$ ), transmitancia UV-C (TUV), color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), densidad ( $d$ ), viscosidad ( $\mu$ ) y tamaño de partícula (TP) de los jugos de naranja-mandarina exprimido (NM exprimido); limón claro (LC) y naranja-banana-mango-kiwi-frutilla (MIX)

Matri z	pH	°Brix	T (NTU)	$\alpha_{254nm}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	TUV (%)	$L^*$	$a^*$	$b^*$	TP ( $\mu\text{m}$ )	$d$ ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )	$\mu$ 20°C ( $\text{mPa}\cdot\text{s}$ )	$\mu$ 50°C ( $\text{mPa}\cdot\text{s}$ )
NM expri mido	3,9± 0,1	13,1 ±0,1	1811± 10	0,387±0 ,010	< 1	35,5± 0,1	0.0± 0.2	19,8± 0,0	630	1098±1	12,4 ± 0,0	3,46 ± 0,0
LC	2,9± 0,1	8,4± 0,1	2,22±0, 1	0,007±0 ,010	10	35,48 ±0,51	- 0,99 ±0,0 3	7,51± 0,37	0,532	1080±1	1,4 ± 0,0	-
MIX	3,7± 0,1	13,9 ±0,1	1767,3 3±10	0,371±0 ,010	< 1	28,72 ±0,25	0,45 ±0,1 4	45,52 ±0,22	0,478 a 120	1108±1	3,6 ± 0,0	2,2 ± 0,0

## 4.2 Caracterización del flujo dentro del reactor

En la **Tabla 4.2** se presentan los valores de  $Re_h$ , obtenidos mediante la *Ecuación 3.4* (*Sección 3.3.2*) para las matrices utilizadas (NM exprimido, LC y MIX), ya que el mismo depende no solo de las condiciones de operación del reactor sino que también de la densidad y viscosidad de cada bebida y del caudal (1,6 l/h). Los valores calculados de  $Re_h$  oscilaron entre 301 (NM exprimido) y 972 (LC).

De acuerdo a la teoría de flujo, estos valores representan el establecimiento de un flujo laminar (Koutchma, 2009). Es importante resaltar que incluso en condiciones de flujo laminar, es posible alcanzar altas inactivaciones microbianas mediante luz UV-C. Por ejemplo, Antonio-Gutiérrez y col. (2019b) alcanzaron hasta 6 reducciones logarítmicas de un inóculo de *S. cerevisiae* en jugo de uva, tras exponerlo a un tratamiento UV-C ( $35,8 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ ) en modo de recirculación bajo condiciones de flujo laminar. Por lo tanto, estos investigadores concluyeron que es posible encontrar condiciones de operación efectivas

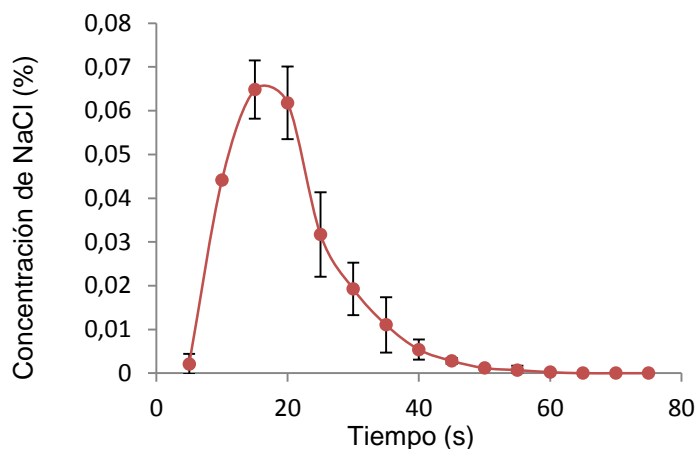
bajo régimen laminar, debido al buen mezclado que aporta la recirculación, permitiendo que gran parte de los elementos de volumen del fluido queden expuestos a la luz UV-C.

**Tabla 4.2.** Número de Reynolds hidráulico ( $Re_h$ ) obtenido a 1,6 L/h y 20 °C en el reactor UV-C escala laboratorio para cada matriz estudiada.

Matriz	$Re_h$
NM exprimido 20°C	301
MIX 20°C	390
LC 20°C	972

Por otro lado, se determinó la distribución de los tiempos de residencia (DTR) dentro del reactor inyectando un pulso de una solución de cloruro de sodio y midiendo la conductividad a la salida, tal como se describió en el *Apartado 3.3.3*. La DTR fue monomodal como se puede observar en la **Figura 4.3** y el tiempo medio de residencia ( $t_m$ ) fue de 19.8 segundos al aplicar un caudal de 1,6 L/h. Con el objetivo de evaluar la eficiencia del equipo se calculó también el tiempo de residencia teórico ( $t_i$ ), el cual tuvo un valor de 20,6 segundos. Por lo tanto, la relación  $t_m/t_i$  tuvo un valor de 0,96, lo cual indica que el volumen efectivo del reactor es alto. Cuanto más cercano es el valor de  $t_m/t_i$  a 1, más eficiente es el reactor. Hirt y col (2022) también midieron la DTR en un reactor de capa delgada, bajo flujo laminar, mediante el uso de una solución de cloruro de sodio. Los autores determinaron que a un caudal aplicado de 30 L/h el  $t_m$  fue de 16,8 segundos mientras que a caudales más altos como 150 L/h fue de 3,66 segundos.

**Figura 4.3.** Distribución de los tiempos de residencia utilizando un pulso de solución de cloruro de sodio como rastreador, en un equipo UV-C de capa delgada, de escala laboratorio, bajo condiciones de flujo laminar. (●) Puntos experimentales, (I) Desviación estándar.



### 4.3 Determinación de las dosis UV-C del reactor a escala laboratorio

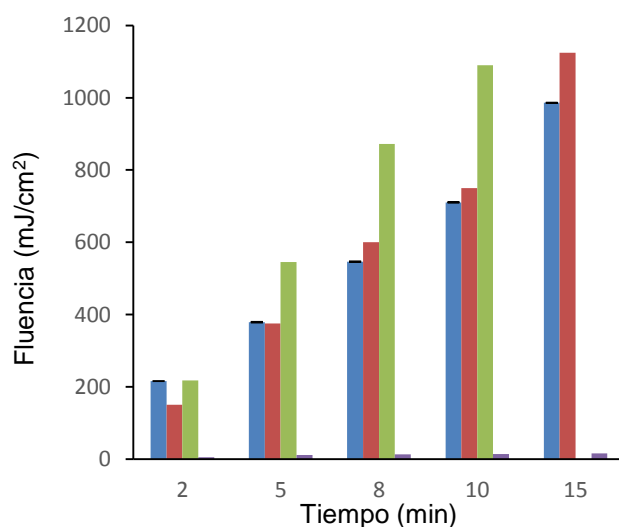
Al caracterizar a un equipo de tratamiento UV-C es importante determinar los diferentes tipos de dosis aplicadas ya que las mismas dependen tanto del diseño del reactor como de las características de los fluidos a tratar. Los distintos tipos de dosis fueron definidos en la *Sección 3.3.4*.

En primer lugar se determinó la fluencia UV-C incidente ( $H_i$ ,  $J/m^2$ ), la cual se define como la energía que alcanza la superficie del producto. La misma no se ve afectada por las características ópticas de la matriz ya que solo depende de la luz emitida por la fuente y tras 15 min de tratamiento tuvo un valor de  $1635 \text{ mJ/cm}^2$ . Por otro lado, la dosis absorbida ( $H_r$ ,  $mJ/cm^2$ ), que sí se ve afectada tanto por la matriz como por el diseño del reactor y puede ser computada como función del tiempo de exposición fue de  $1125 \text{ mJ/cm}^2$ .

La fluencia entregada ( $H_d$ ) representa la energía remanente que no es absorbida ni dispersada por los componentes del fluido y por lo tanto se encuentra disponible para la inactivación de los microorganismos. La misma se determinó tanto por actinometría ( $H_{d \text{ act}}$ ) como por biodimetría ( $H_{d \text{ bio}}$ ). Tras 15 min de tratamiento, la  $H_{d \text{ act}}$  fue de  $1271 \text{ mJ/cm}^2$ . La biodimetría permitió obtener la dosis UV necesaria para lograr una reducción decimal ( $D_{10UV}$ ) para *E. coli* y para las esporas de *A. acidoterrestris*, resultando en  $2,2 \text{ mJ/cm}^2$  y  $5,2 \text{ mJ/cm}^2$ , respectivamente. Multiplicando los valores de  $D_{10UV}$  por los ciclos logarítmicos de reducción exigidos por la FDA (5 ciclos logarítmicos), se obtuvieron la fluencia de  $10,8 \text{ mJ/cm}^2$  para *E. coli*. Por otro lado, multiplicando los valores de  $D_{10UV}$  de las esporas de *A. acidoterrestris* por la caída logarítmica final obtenida se obtuvo la fluencia germicida de  $16 \text{ mJ/cm}^2$ . Por lo tanto, para el procesamiento UV-C propuesto, tomando de referencia al microorganismo más resistente se determinó que la  $H_{d \text{ bio}}$  obtenida fue de  $16 \text{ mJ/cm}^2$ .

A pesar de que las 4 dosis determinadas incrementaron con el tiempo de tratamiento (**Figura 4.4**), se pudo observar que a partir de los 5 min la  $H_{d\ bio}$ , lo hace de manera menos precipitada. Es decir que, la luz UV-C presenta una limitación para inactivar a los miembros más resistentes de la población microbiana, y que el tiempo adicional de exposición prácticamente no contribuye a su inactivación. También es importante resaltar que los bajos valores de la dosis  $H_{d\ bio}$ , comparados con los de las otras dosis determinadas, pueden atribuirse a que los reactores UV-C son sistemas no-ideales, en los cuales existen distribuciones no uniformes de los tiempos de residencia y de las irradiancias (LID) (Müller y col., 2017 ; Gopisetty y col., 2018). Esta última está limitada por la absorción de la luz UV-C por parte de las matrices y por el diseño del reactor. En consecuencia, la interacción entre los parámetros de procesamiento y las características del producto determinarán la dosis efectiva que alcanzará a cada célula microbiana (Guerrero y col., 2022). Por lo tanto, para aumentar la efectividad del tratamiento UV-C en alimentos líquidos, es necesario garantizar que todas las partículas del mismo reciban la mínima dosis UV-C necesaria para la inactivación de los microorganismos.

**Figura 4.4.** Gráfico de barras representando la fluencia incidente ( $H_i$ , ■); la fluencia absorbida ( $H_r$ , ■); la fluencia entregada actinométrica ( $H_{d\ act}$ , ■) y la fluencia germicida biosimétrica ( $H_{d\ bio}$ , ■) determinadas para el equipo de procesamiento por luz UV-C a escala laboratorio.

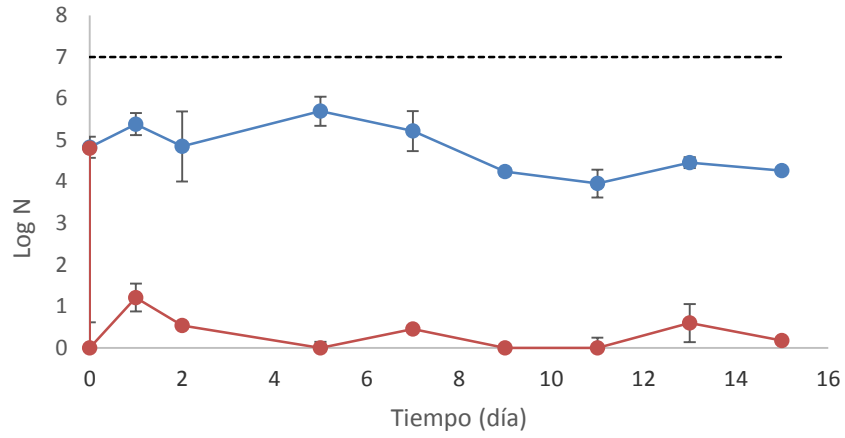


#### 4.4 Efectividad del tratamiento UV-C para inactivar la microbiota nativa

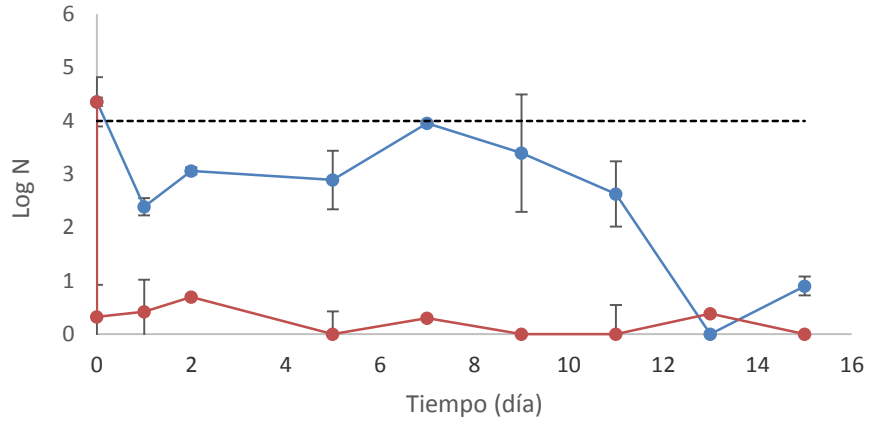
El tratamiento por luz UV-C fue altamente efectivo en inactivar la microbiota nativa presente en el jugo natural exprimido de naranja-mandarina. El mismo redujo en 4,8; 4,1 y 5,1 ciclos logarítmicos la población de aerobios mesófilos totales, coliformes totales y hongos y levaduras, respectivamente, respecto del control (sin tratamiento). En el caso de los aerobios mesófilos y coliformes totales, la población microbiana no logró recuperarse a lo largo de 15 días de almacenamiento en frío (5 °C) y no superaron el límite máximo permitido por la *Agencia de Protección de la Salud del Reino Unido* (HPA, 2009). Excepcionalmente, la población de hongos y levaduras presentes en la muestra tratada por UV-C aumentaron en 1,1 ciclo logarítmicos luego de 15 días de almacenamiento en frío. Las poblaciones de aerobios mesófilos totales y de hongos y levaduras en el jugo control se mantuvieron constantes a lo largo de 15 días de almacenamiento en frío, mientras que el recuento de coliformes totales sufrió mayores oscilaciones a lo largo del almacenamiento, reduciéndose en 3,4 ciclos logarítmicos luego de 15 días.

**Figura 4.5.** Curvas de almacenamiento de a) aerobios mesófilos totales, b) coliformes totales, c) hongos y levaduras en jugo de naranja-mandarina exprimido tratado por luz UV-C individual a escala laboratorio (—●—) y en el control sin tratamiento (—●—). Se representan también los límites máximos admitidos por la *Agencia de Protección de la Salud del Reino Unido* para las poblaciones de aerobios mesófilos totales y de coliformes totales (----).

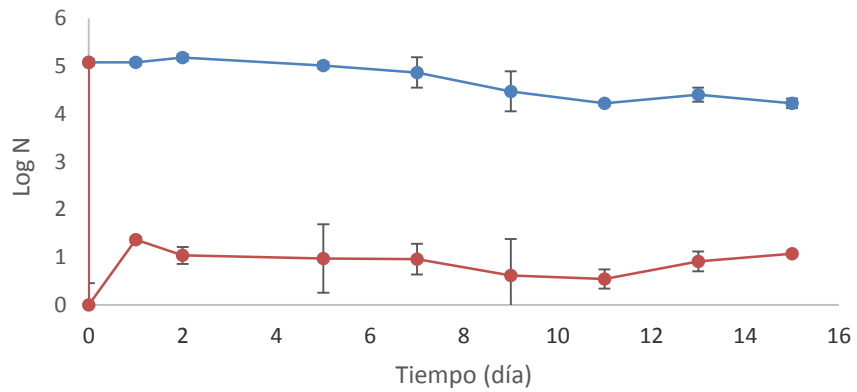
a)



b)



c)



## 4.5 Influencia de la matriz



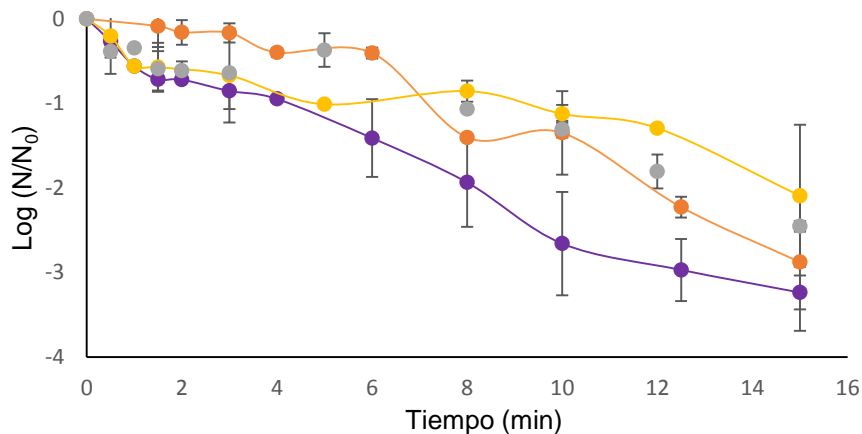
Con el objetivo de evaluar la influencia de la matriz a tratar sobre la efectividad del tratamiento UV-C, se trabajó con esporas de *A. acidoterrestris* en tres matrices de características ópticas diferentes. Por un lado se utilizó un jugo comercial de limón claro y por otro se evaluaron dos matrices turbias: jugo exprimido natural de naranja-mandarina, y en jugo comercial mix. La composición y características de las matrices han sido descritas previamente en las *Secciones 3.1.1*.

Los inóculos de esporas se prepararon según se describió en el *Apartado 3.1.5* y se procedió al tratamiento UV-C y al recuento de sobrevivientes como se especificó en las *Secciones 3.4* y *3.5*, respectivamente. Si bien se trata de un microorganismo termófilo y por lo tanto, las altas temperaturas no lo perjudican, se realizó una prueba en jugo mix aplicando UV-C asistido por temperatura moderada de 50°C (UV-CT). El fin de esto fue comprobar si la asistencia por calor tenía o no un efecto aditivo o sinérgico con el UV-C en la inactivación de las esporas.

Las curvas de inactivación obtenidas se presentan en la **Figura 4.6**. En el caso del jugo de naranja-mandarina y el jugo mix tratados por UV-C simple, y del jugo mix tratado por el procesamiento asistido por calor moderado (UV-C/T), las curvas no presentaron hombro y la pendiente cambió al aumentar el tiempo de exposición (8 y 4 min, respectivamente), logrando inactivaciones totales de  $3,2 \pm 0,2$ ;  $2,1 \pm 0,8$  y  $2,5 \pm 0,1$  ciclos logarítmicos, respectivamente. Se puede interpretar a partir de estos resultados que la combinación del UV-C con una temperatura moderada de 50°C, tuvo un efecto refractario ya que no presentó un aumento significativo en la inactivación de las esporas en comparación con el tratamiento UV-C simple, probablemente como se mencionó previamente por su condición de termófila. Como excepción, se observó un hombro evidente (3 min) en el caso del jugo de limón claro y la inactivación alcanzada luego de aplicar el máximo tratamiento, fue de  $2,9 \pm 0,8$  ciclos logarítmicos. El pH extremadamente ácido de este jugo tampoco tuvo un efecto al ser combinado con el UV-C ya que se trata de una bacteria acidófila. Por último, se concluyó que la efectividad en el jugo exprimido de naranja-mandarina, a pesar de ser una matriz compleja, fue muy satisfactoria ya que fue incluso mayor que en el jugo de limón claro, probablemente debido a que la acidez de esta última matriz favorece a las esporas.

Debido a estos resultados se seleccionó este jugo para realizar las pruebas de reto microbiano en inóculos simples y compuestos de bacterias y levaduras.

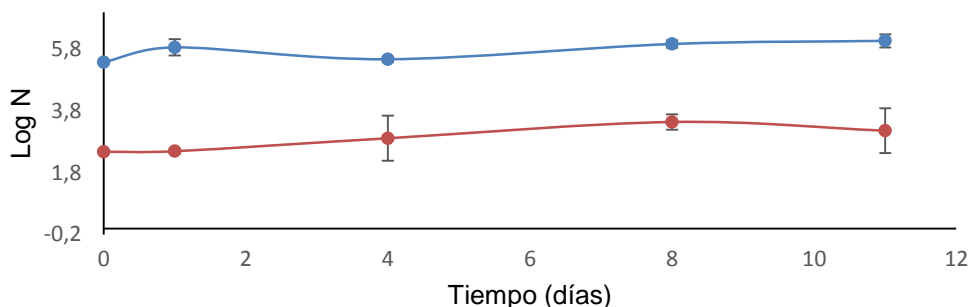
**Figura 4.6.** Curvas de inactivación obtenidas para esporas de *A. acidoterrestris* en jugo de naranja-mandarina (●), Limón claro (●) y mix tratado por UV-C simple (●) o asistido por temperatura (●).



Baysal y col. (2013) evaluaron la inactivación de esporas de *A. acidoterrestris* en un jugo claro de uvas blancas (coeficiente de absorción:  $5,82 \text{ cm}^{-1}$ ;  $5,49 \text{ NTU}$ ) y en jugo de manzanas (coeficiente de absorción:  $12,00 \text{ cm}^{-1}$ ;  $10,00 \text{ NTU}$ ) tratados en un reactor de rayos UV-C paralelos ( $500 \text{ mJ/cm}^2$ ). Estos autores reportaron curvas de inactivación con cola y sin hombro. Luego de la exposición a la máxima intensidad del tratamiento ( $1,31 \text{ mW/cm}^2$ ) alcanzaron una alta inactivación en el jugo claro de uva de 5,5 ciclos log, pero en el caso del jugo de manzana, que era más coloreado, lograron una inactivación moderada de 2,0 ciclos log. En contraste, Tremarin y col. (2017 a, b) evaluaron la inactivación de esporas de *A. acidoterrestris* en jugo de manzana (pH: 3,2;  $11 \text{ }^\circ\text{Brix}$ ;  $27 \text{ \%}$  transmitancia UV) mediante un tratamiento de UV-C ( $13,44 \text{ W/m}^2$ ) en placas de Petri (espesor de líquido de  $4 \text{ mm}$ ) con agitación. En este caso, los autores reportaron una alta eficacia del tratamiento ya que alcanzaron una inactivación de hasta 5,0 ciclos log. De todos modos, es posible que la alta efectividad del tratamiento se debiera al poco espesor de la capa de líquido expuesta a la luz UV-C.

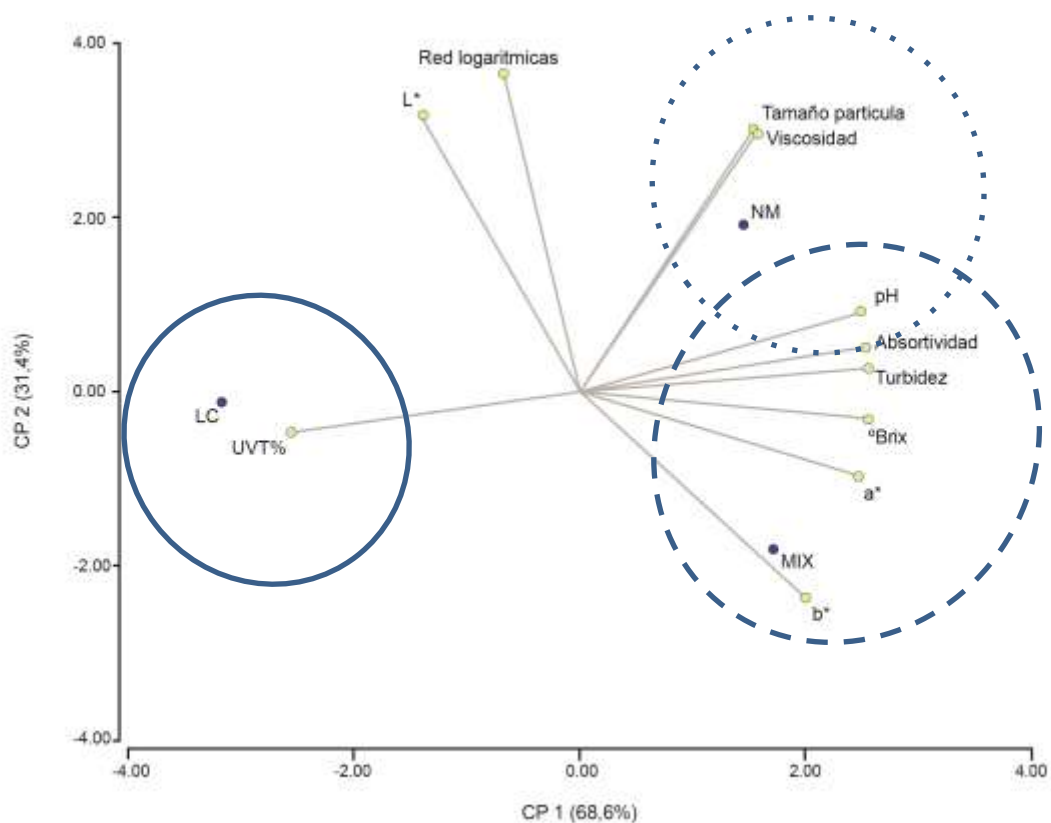
Por último, se evaluó la evolución de las esporas sobrevivientes al tratamiento aplicado en el jugo exprimido de naranja-mandarina a lo largo del almacenamiento en frío de 11 días siguiendo el procedimiento detallado en la *Sección 3.4* con el propósito de detectar algún comportamiento refractario al tratamiento aplicado de la microbiota remanente. Se observó que el comportamiento del jugo sin tratar (control) fue similar al del tratado ya que en ninguno de los casos la población aumentó ni decreció a lo largo del almacenamiento, manteniéndose constante en los valores del día 0 (**Figura 4.7**).

**Figura 4.7.** Almacenamiento refrigerado (5°C) de esporas de *A. acidoterrestris* en jugo de naranja-mandarina exprimido tratado por luz UV-C simple (—●—) y en el control sin tratar (—●—).



De modo complementario, se analizó la relación entre las características físicas de las matrices evaluadas (tamaño de partícula, viscosidad, color, pH, turbidez, UVT%, contenido de sólidos solubles y coeficiente de absortividad) y las reducciones logarítmicas obtenidas en cada una de ellas, mediante un Análisis de Componentes Principales (PCA, **Figura 4.8**). Las dos primeras componentes principales (CP<sub>1</sub> y CP<sub>2</sub>) pudieron explicar el 100% de la varianza. Se obtuvo el Coeficiente de Correlación Cofenética (CCC) que tuvo un valor de 1, indicando que el PCA preservó las distancias Euclidianas originales entre los datos (Everitt y col., 2011). La CP<sub>1</sub> asoció a las reducciones logarítmicas con el parámetro L\* (mayor luminosidad de la matriz) y la UVT%, y las separó de la absortividad, pH, °Brix, turbidez, tamaño de partícula, viscosidad y los parámetro a\* y b\*, los cuales fueron asociados positivamente entre ellos. Por otro lado la CP<sub>2</sub> relacionó positivamente a las reducciones logarítmicas con el jugo de naranja-mandarina, en el cual efectivamente se obtuvo el mayor valor de inactivación total de las esporas luego del tratamiento UV-C. Este jugo fue a la vez asociado con mayores valores de turbidez y viscosidad.

**Figura 4.8.** Bi-plot del análisis de componentes principales relacionando las características fisicoquímicas de cada matriz, con la inactivación obtenida para las esporas de *A. acidoterrestris*.



#### 4.6 Efecto de la microbiota de fondo en la inactivación microbiana

Con el objetivo de evaluar el efecto de la presencia de microbiota de fondo en la efectividad del tratamiento UV-C y de modo de simular una contaminación más real, se utilizaron inóculos simples y compuestos (cócteles) en el jugo exprimido de naranja-mandarina, seleccionado a partir de la experiencia descrita en la Sección 4.4. Los inóculos utilizados fueron: *E. coli*; un cóctel de 4 cepas de *E. coli*; *E. coli* acompañada por microbiota nativa aislada de la cáscara de naranjas y mandarinas; *E. coli* acompañada de un cóctel de 4 cepas de levaduras; y por otro lado, *S. cerevisiae*; un cóctel de 4 cepas de levaduras; *S. cerevisiae* acompañada de un cóctel de 4 cepas de *E. coli* y de *S. cerevisiae* acompañada por la microbiota nativa aislada de la cáscaras de naranjas y mandarinas en jugo exprimido

natural de naranja-mandarina. Todas las experiencias fueron llevadas a cabo como se detalló en el *Apartado 3.4*, a 20°C.

En cuanto al tratamiento por UV-C de inóculos simples y compuestos de *E. coli* en jugo natural exprimido de naranja-mandarina, cabe destacar en primer lugar que, el pH ácido del mismo no afectó la supervivencia de los inóculos, lo que se evaluó mediante una prueba preliminar en la cual, se inoculó el jugo y luego se comparó el recuento microbiano inmediatamente después de la inoculación y luego de pasadas 18 horas de almacenamiento en frío, y no se observó ninguna diferencia. La **Figura 4.9** a presenta las curvas de inactivación obtenidas para la *E. coli* ATCC 25922 individual y en presencia de los cócteles de *E. coli*, levaduras y microbiota aislada, luego del tratamiento por UV-C (1271 mJ/cm<sup>2</sup>). Todas las curvas presentaron forma sigmoidea, con hombro y una cola marcada.

La ocurrencia de un hombro generalmente es atribuida a la interacción entre el daño del ADN y la reparación del mismo, lo cual implica que para lograr una inactivación exitosa es necesario que varios fotones de luz alcancen a la célula y el daño supere a los mecanismos de reparación de la misma (teoría “*multiple-hit target*”) (Guerrero y col., 2022). Los hombros observados también eran esperables debido a la atenuación de la luz UV-C generada por el jugo, la cual disminuye el impacto de los fotones de luz en células microbianas y permite que el proceso de reparación del ADN tenga lugar (Gouma y col., 2020). Por otro lado, la ocurrencia de colas puede atribuirse, entre otras cosas, a la existencia de una proporción de la población más resistente al tratamiento UV-C (Peleg y Cole, 1998).

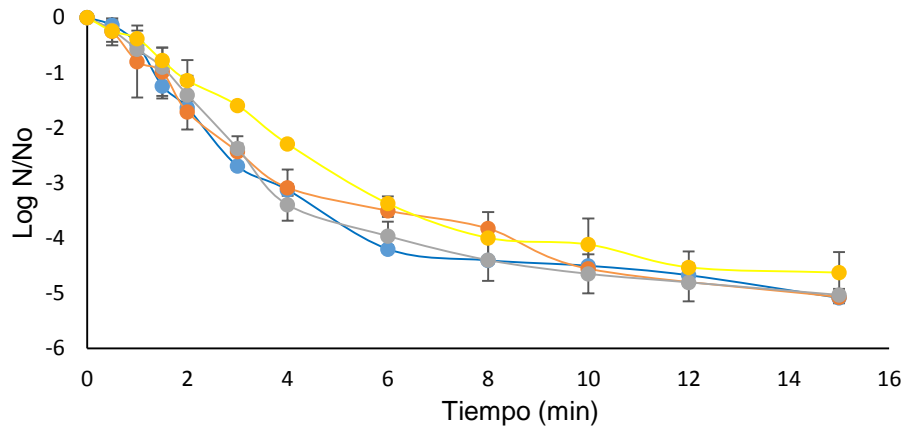
Al aplicar la máxima dosis (1271 mJ/cm<sup>2</sup>), se alcanzaron hasta  $5,1 \pm 0,1$ ,  $4,6 \pm 0,4$ ;  $5,0 \pm 0,1$ ;  $5,1 \pm 0,1$  reducciones log para *E. coli* individual o en presencia de los cócteles de *E. coli*, de levaduras o de microbiota aislada, respectivamente. Por lo tanto, la presencia de microbiota de fondo no afectó la inactivación final global ni la forma de las curvas de inactivación. De todos modos, cuando *E. coli* se inoculó dentro de un cóctel de 4 cepas de *E. coli*, se alcanzó una inactivación significativamente menor en los tiempos de tratamientos intermedios entre los 3 y los 10 min.

En cuanto a las curvas de inactivación de *S. cerevisiae* (**Figura 4.9 b**), inoculada en forma de un cóctel de 4 cepas, la efectividad del tratamiento UV-C fue menor, probablemente debido a que el mayor tamaño de las células de levadura, impidió el paso de la luz UV-C para que alcance a otras células de levadura. Este efecto, por el contrario, no se observó cuando *S. cerevisiae* tuvo al cóctel de *E. coli* debido al menor tamaño de las células bacterianas respecto a las levaduras.

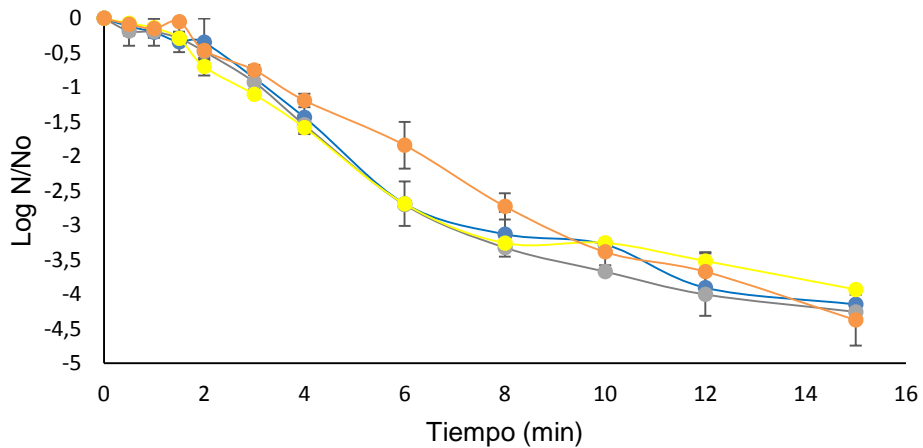
A pesar que, muchos trabajos evaluaron los efectos de la luz UV-C en la respuesta de inóculos microbianos simples, muy pocos examinaron la inactivación de inóculos compuestos que emulen las condiciones naturales de deterioro de jugos. Feliciano y col. (2019a), investigaron la inactivación de 17 cepas de levaduras en inóculos simples y compuestos ( $10^4$ - $10^5$  UFC/mL) en endospermo líquido de coco (pH 5,26; 5,8 °Brix) tratado por UV-C estanco ( $4,99$  mW/cm<sup>2</sup>, espesor de la muestra: 7 mm). Estos autores observaron que los inóculos compuestos presentaron mayor resistencia al tratamiento que los inóculos simples.

**Figura 4.9.** Curvas de inactivación para inóculos de a) *E. coli* (●), *E. coli* + microbiota nativa (●), *E. coli* + cóctel 4 cepas de levaduras (●), cóctel de 4 cepas de *E. coli* (●); b) *S. cerevisiae* (●); *S. cerevisiae* + cóctel de 4 cepas de *E. coli* (●), *S. cerevisiae* + microbiota nativa (●), cóctel de 4 cepas de levaduras (●) en jugo de naranja-mandarina tratado por luz UV-C.

a)

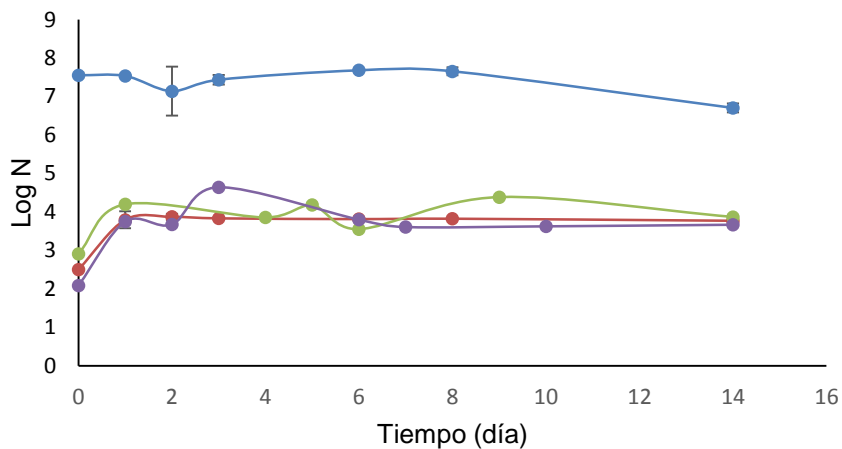


b)



Se analizó también la capacidad de recuperación a lo largo de 14 días de almacenamiento en frío de *E. coli* ATCC 25922 inoculada sola o acompañada por microbiota nativa o por el cóctel de levaduras (**Figura 4.10**). En todos los casos, se observó un leve aumento del recuento en el primer día post-tratamiento, pero luego se mantuvo constante a lo largo del almacenamiento. El control (no tratado) mostró el mismo comportamiento que las muestras y no hubo diferencias entre el inóculo simple y los compuestos.

**Figura 4.10.** Recuento microbiano de inóculo de *E. coli* (—●—), *E. coli* + cóctel de levaduras (—●—), *E. coli* + microbiota nativa (—●—) a lo largo de 14 días de almacenamiento en frío, en jugo de naranja-mandarina tratado por luz UV-C y en un control sin tratar inoculado con *E. coli* (—●—).



## 4.7 Modelado matemático

La **Figura 4.11**, muestra los ajustes de los modelos de Weibull, Coroller y bifásico con hombro a la inactivación por luz UV-C de inóculos simples y compuestos de *S. cerevisiae* (**Figura 4.11 b,c**) y *E. coli* (**Figura 4.11 d,e**) en jugo exprimido de naranja mandarina y de esporas de *A. acidoterrestris* (**Figura 4.11 a**) en jugo exprimido de naranja mandarina, jugo de limón claro y jugo mix.

Los parámetros estimados por cada modelo se presentan en la **Tabla 4.3** y los datos estadísticos relacionados a las distribuciones de Weibull se detallan en la **Tabla 4.4**. Además, se presentan en la **Tabla 4.5** los valores de la raíz del error cuadrático medio (RECM) (Alzamora y col., 2005), el criterio de información de Akaike (AIC) y el de Bayesian Schwarz (BIC) correspondiente a cada modelo. El RECM mide la desviación promedio entre los valores observados y los predichos y se aplica para evaluar el desempeño de los modelos. Los criterios de AIC y BIC se utilizan para evaluar el sobre-ajuste de los modelos. De acuerdo a la teoría de estos dos criterios, los modelos más precisos y parsimoniosos presentan los menores valores de AIC y BIC (Quinn y Keough, 2002). Ambos criterios están fuertemente relacionados y pueden medir la eficiencia del modelo parametrizado en términos de su capacidad de predecir datos. De todos modos, el criterio de BIC es más conservador ya que el término de penalización es más severo que en el AIC.

El modelo de Weibull ajustó adecuadamente en la mayoría de los casos presentando valores de  $R^2_{aj}$  entre 0,88 y 0,98. En todos los inóculos de *E. coli*, ya sea simple o compuestos, y de esporas de *A. acidoterrestris* el valor de  $n$  fue menor a 1 lo que marca una prevalencia de concavidad hacia arriba en las curvas de inactivación. Esto sugiere que la efectividad UV-C decrece con el tiempo de tratamiento, dejando una población resistente que podría corresponder a individuos adaptados al factor de estrés o que no llegan a irradiarse. Excepcionalmente, en los casos del inóculo de *S. cerevisiae* en presencia de microbiota aislada y del cóctel de levaduras, el valor de  $n$  fue 1,03 y 1,04, respectivamente. Un valor de  $n$  cercano a 1 indica un comportamiento más lineal que en el resto de los casos.

Con el objetivo de interpretar el comportamiento microbiano en la inactivación por luz UV-C, se utilizaron los parámetro  $b$  y  $n$  derivados del modelo de Weibull para calcular la frecuencia de distribución de resistencias de muerte y los parámetros estadísticos correspondientes (moda, media, varianza y sesgo) (**Tabla 4.4**). Todas las frecuencias fueron sesgadas hacia la derecha y sin moda (**Figura 4.12**), excepto en el caso del inóculo de *S. cerevisiae* compuesto con microbiota nativa el cual presentó moda, lo cual sugiere



que la mayor parte de la población fue inactivada a cortos tiempos de tratamiento. En términos generales, los inóculos de *E. coli* presentaron las menores medias (0,8-1,5 min) y mayores sesgos (3,6-5,8) que los inóculos de levadura y de esporas de *A. acidoterrestris*, indicando que fue el microorganismo que más se inactivó a cortos tiempos de tratamiento. Como era de esperar las esporas bacterianas presentaron la mayor media (3,8 min) y varianza (22,9 min<sup>2</sup>), demostrando la mayor resistencia de las esporas sobre las células vegetativas. En cuanto a la influencia de la microbiota de fondo, no hubo diferencias en la inactivación total entre los inóculos simples y compuestos de *E. coli*. A pesar de ello, el cóctel de 4 cepas presentó mayor media (1,5 min), varianza (5,2 min<sup>2</sup>) y menor sesgo (3,6) que los otros sistemas de *E. coli* ( $t_c$ : 0,8-0,9 min,  $\sigma_{tc}^2$ : 2.69-2.8 min<sup>2</sup>,  $v_f$ : 4,6-5,8), lo cual podría deberse a una mayor resistencia al UV-C por parte de las otras cepas involucradas en el cóctel. Por otro lado, entre los sistemas de levadura, el inóculo simple de *S. cerevisiae* presentó la menor media (2,7 min) y el mayor sesgo (2,6) comparado con los inóculos compuestos ( $t_c$ : 3,4-3,5 min,  $v_f$ : 2,0), por lo tanto la luz UV-C fue más efectiva en inactivar el inóculo simple a cortos tiempos de tratamiento.

El modelo de Coroller también fue apropiado para describir las curvas de inactivación microbiana ya que se obtuvieron valores de  $R^2_{aj}$  de entre 0,93 y 0,99. En todos los casos, el término  $\alpha$  fue mayor a 1 lo que significa que la mayor parte de la población fue sensible al tratamiento UV-C en todos los sistemas. En términos generales todos los sistemas de *S. cerevisiae* presentaron menores  $\alpha$  que los de *E. coli* por lo que puede inferirse una mayor resistencia al tratamiento por parte de las levaduras que de las bacterias. El efecto de la microbiota de fondo se vio reflejado en menores valores de  $\alpha$  para la inactivación del inóculo de *E. coli* acompañado de microbiota nativa (2,74) en comparación con los demás sistemas evaluados ( $\alpha$ : 3,40-3,71); mientras que en los inóculos de levadura, el inóculo de *S. cerevisiae* individual tuvo un valor de  $\alpha$  de 2,61, el cual fue el mayor de todos los sistemas de inóculo simples y compuestos de levadura ( $\alpha$ : 1,86-2,39), indicando una mayor sensibilidad del inóculo simple. Entre los valores de  $\delta_1$ , el cual representa el tiempo de tratamiento necesario para inactivar a la sub-población más sensible, el de las esporas de *A. acidoterrestris* fue el mayor (3,86 min) comparado con los demás sistemas ( $\delta_1$ : 1,32-3,72 min). Lo mismo ocurrió con el  $\delta_2$  (17,55 min), indicando que el tiempo de tratamiento necesario para destruir la sub-población más resistente es mayor para las esporas que para las células vegetativas ( $\delta_2$ : 6,87-12,01).

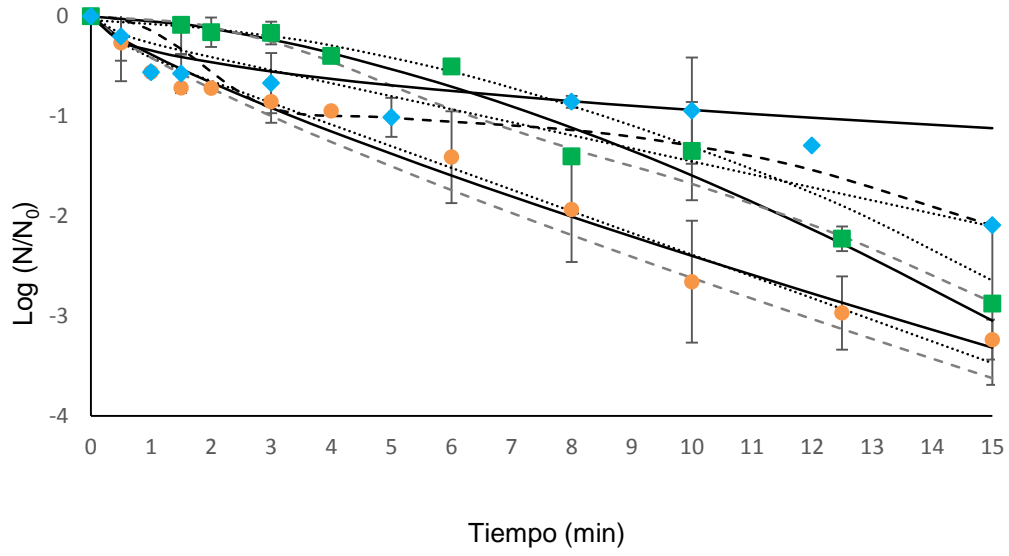
El modelo bifásico con hombro también logró describir de forma precisa las curvas de supervivencia presentando valores de  $R^2_{aj}$  de entre 0,98-0,99. En concordancia con el

modelo de Coroller, este modelo presentó valores de  $f$  entre 0,96 y 0,99, lo cual significa que la mayor parte de la población microbiana fue sensible al tratamiento UV-C. Todas las curvas de inactivación de las células vegetativas presentaron un hombro, indicando que varios fotones de luz debieron alcanzarlas para lograr su inactivación. De todos modos, los sistemas de *S. cerevisiae* presentaron largos de hombro mayores (1,32-2,70 min) que los inóculos de *E. coli*. (0,21-0,43 min). Por otro lado, las curvas de esporas de *A. acidoterrestris* no presentaron hombro. Los menores valores de  $k_{sens}$  y  $k_{res}$  se obtuvieron para las esporas (0,54 y 0,00  $\text{min}^{-1}$ , respectivamente) es decir que la velocidad de inactivación tanto de la subpoblación sensible como de la resistente de esporas es menor que el de las células vegetativas, como era esperable. Entre los distintos inóculos de *E.coli*, aquel compuesto por el cóctel de 4 cepas presentó menores  $k_{sens}$  lo cual es acorde a los datos obtenidos por el modelo de Weibull que reflejaban una mayor resistencia al tratamiento por parte de las cepas acompañantes en el cóctel. Al mismo tiempo, el inóculo simple de *S. cerevisiae* presentó el mayor valor de  $k_{sens}$  (1,68  $\text{min}^{-1}$ ) indicando una mayor sensibilidad al tratamiento.

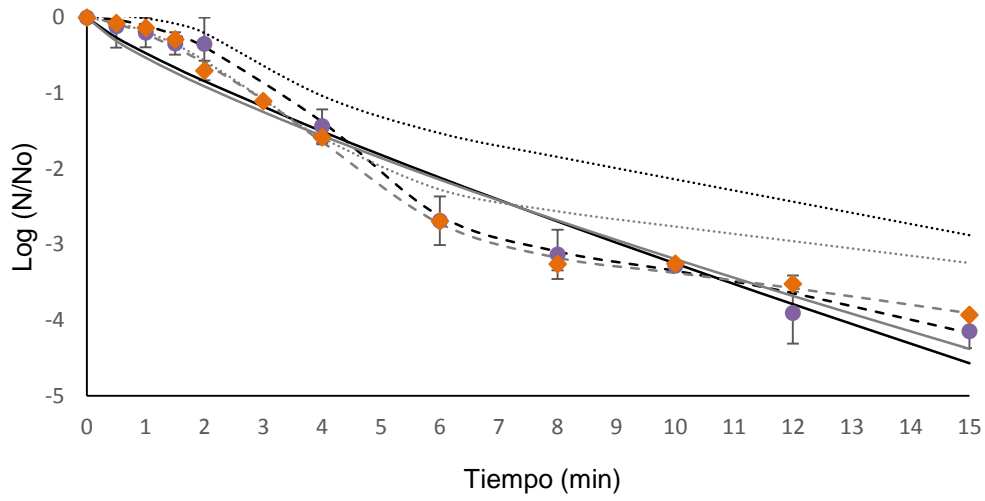
La bibliografía no presenta un amplio número de trabajos que evalúen inóculos compuestos tratados por luz UV-C en bebidas. Feliciano y col (2019b) evaluaron la inactivación de 12 cepas de levaduras por separado y de un inóculo compuesto por todas ellas en jugo exprimido de naranja. Los autores concluyeron que la mayoría de las curvas de inactivación presentaron comportamiento lineal o bifásico con concavidad hacia abajo y que, al igual que en este trabajo, el caso del inóculo compuesto presentó un estadio lag al inicio del tratamiento en el que no se observó inactivación microbiana. Esto significa que un mayor número de fotones tuvieron que alcanzar a las células para inactivarlas en comparación con los inóculos simples.

**Figure 4.11.** Curvas experimentales (puntos) y valores ajustados derivados de los modelos de Weibull (—), Coroller (- - -) y bifásico con hombro (. . .) de inóculos de a) esporas de *A. acidoterrestris* en jugo exprimido de naranja mandarina (●), jugo de limón claro (■) y jugo Mix (◆), b) Inóculo simples de *S. cerevisiae* (●) y compuesto de *S. cerevisiae* con cóctel de levaduras (◆), c) Inóculos compuesto de *S. cerevisiae* con microbiota nativa (■) y *S. cerevisiae* con cóctel de *E. coli* (▲) d) Inóculos simple de *E. coli* ATCC 25922 (●) y compuesto de *E. coli* ATCC 25922 con cóctel de *E.coli* (◆); e) inóculos compuesto de *E. coli* con microbiota nativa (■) y de *E. coli* con cóctel de levaduras (▲) en jugo exprimido de naranja-mandarina tratado por UV-C.

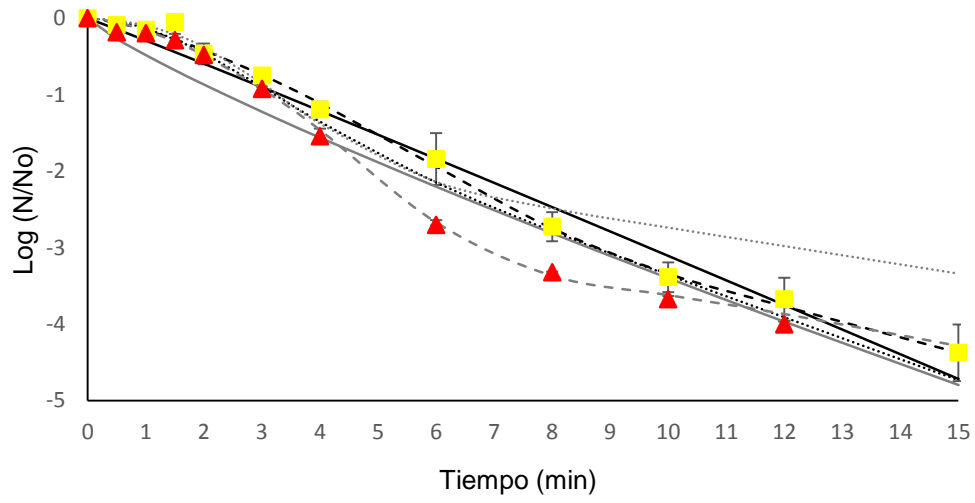
a)



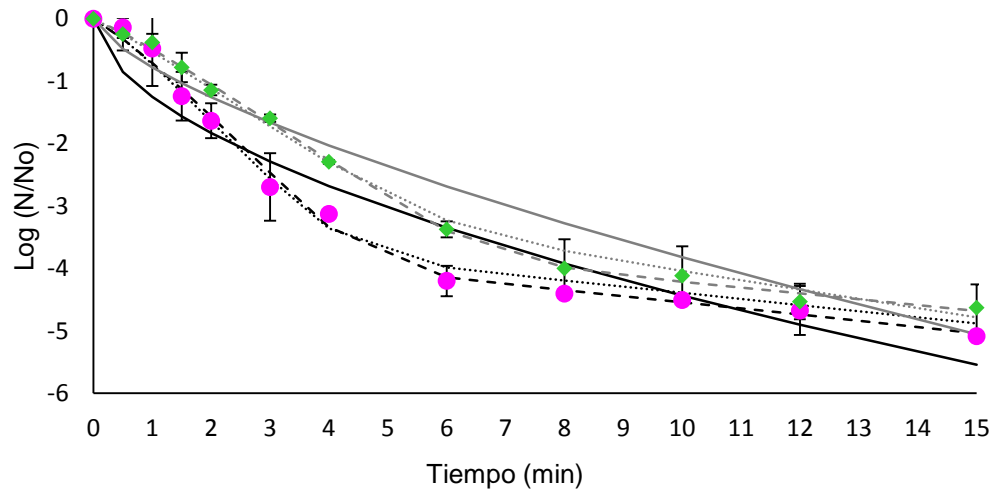
b)



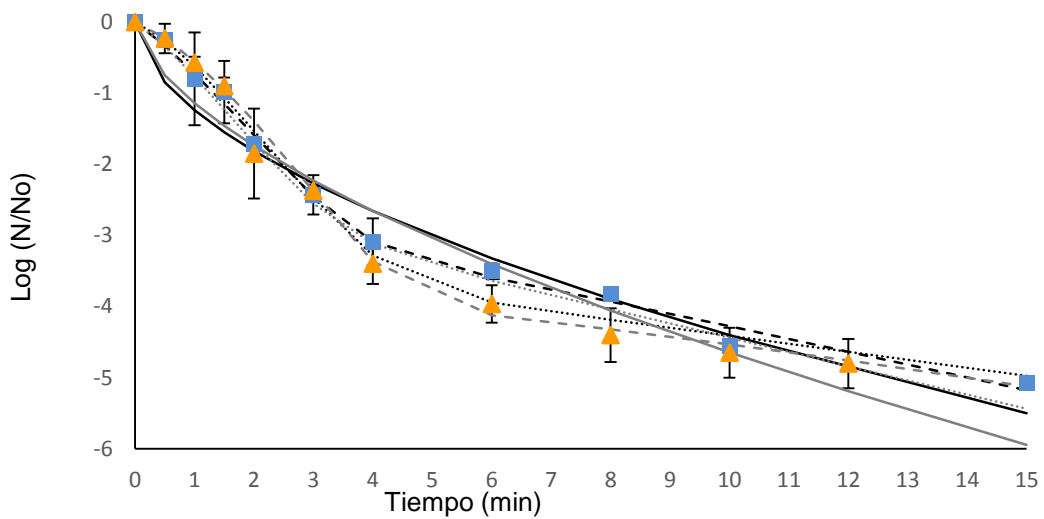
c)



d)

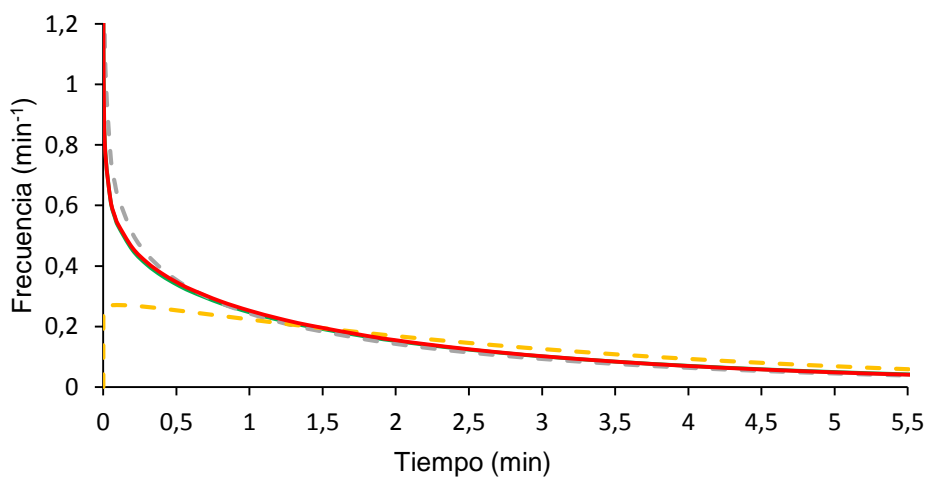


e)

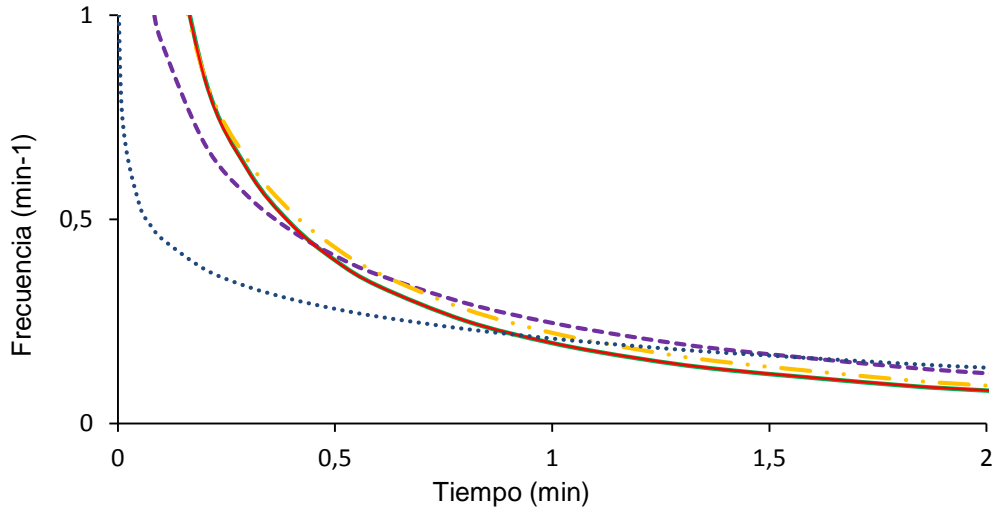


**Figura 4.12.** Distribución de las frecuencias de resistencias de Weibull correspondientes a la inactivación a) inóculo simple de *S. cerevisiae* (—), o acompañado por: un cóctel de *E. coli* (—), un cóctel de levaduras (- - -), microbiota aislada (- · - ·); b) inóculo simple de *E. coli* (—), o acompañado por un cóctel de *E. coli* (- - -), un cóctel de levaduras (· · · ·), microbiota aislada (—) y de un inóculo simple de esporas de *A. acidoterrestris* (· · ·).

a)



b)

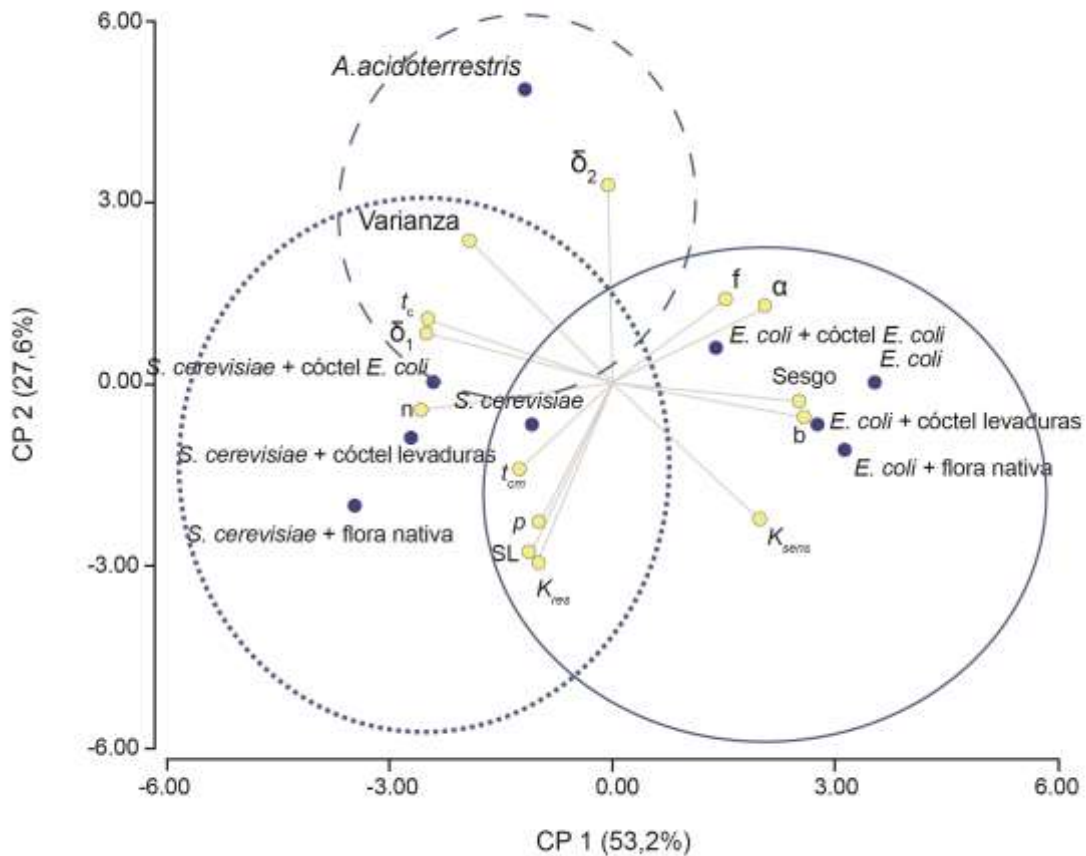


El Análisis de Componentes Principales (PCA) permitió representar espacialmente la relación entre la inactivación alcanzada de los distintos inóculos microbiológicos estudiados y los parámetros obtenidos a partir del modelado matemático realizado sobre las curvas de inactivación en jugo natural de naranja-mandarina tratado por luz UV-C (1271 mJ/cm<sup>2</sup>) (**Figura 4.13**). Las dos primeras componentes (CP1 y CP2) lograron explicar un 80,8% de la varianza y el coeficiente de correlación cofenética (CCC) obtenido fue de 0,96, indicando que se preservaron las distancias Euclidianas originales entre los datos y por lo tanto, se logró una reducción adecuada con el análisis (Everitt y col., 2011).

La CP1 separó los parámetros  $\alpha$ ,  $f$ ,  $\nu_1$  y  $k_{sens}$  (asociados positivamente) de los parámetros  $k_{res}$ , largo de hombro ( $SL$ ), moda ( $t_{cm}$ ), media ( $t_c$ ),  $\delta_1$ ,  $\delta_2$  y varianza ( $\sigma_{tc}^2$ ) (asociado negativamente). Mientras que la CP2 presentó asociación positiva con  $k_{res}$ ,  $\sigma_{tc}^2$ ,  $\delta_1$ ,  $\delta_2$ ,  $t_c$ ,  $\alpha$  y  $f$ ; separándolos de los demás parámetros que fueron asociados negativamente a la componente. Las esporas de *A. acidoterrestris* se asociaron espacialmente a mayores valores de varianza y  $\delta_2$ , lo cual reflejó la mayor resistencia de las esporas en comparación a las células vegetativas ya que mayores valor de  $\delta_2$  implican la necesidad de un mayor tiempo de tratamiento para alcanzar la primer reducción logarítmica de la sub-población más resistente. Al comparar los inóculos de células vegetativas, se observó que la bacteria fue más sensible al tratamiento que la levadura, ya que en el bi-plot se asoció a los parámetros  $\alpha$ ,  $f$ , sesgo y  $k_{sens}$ , todos ellos relacionados a la existencia de una importante proporción de población sensible al tratamiento, en concordancia con lo discutido en el análisis del modelado matemático previamente en esta sección. Por el contrario, tanto los inóculos simples como compuestos de *S.cerevisiae* se acercaron a los parámetros  $t_c$ ,  $t_{cm}$

y  $\delta_2$ , indicando que mayores tiempos de tratamiento fueron necesarios para inactivar a la población. Se puede observar que el parámetro de largo de hombro (SL) se encuentra espacialmente ubicado entre los inóculos de la levadura y lo de la *E.coli*. Esto se encuentra en concordancia con lo discutido previamente, ya que en todos estos sistemas existió un hombro inicial en las curvas de inactivación, pero fue más marcado en los sistemas de *S. cerevisiae* y es por ellos que en el PCA se encuentra espacialmente más asociado a ellos que a los sistemas de la bacteria.

**Figura 4.13** Bi-plot correspondiente al Análisis de Componentes Principales que relaciona espacialmente los parámetros obtenidos para cada modelo matemático (Weibull, Bifásico con hombro y Coroller) para la inactivación de inóculos simples y compuestos de *S. cerevisiae*, *E.coli*; y esporas de *A. acidoterrestris*, en jugo natural exprimido de naranja-mandarina tratados por luz UV-C a escala laboratorio.



**Tabla 4.3.** Parámetros estimados por los modelos de Coroller, Weibull y bifásico con hombro, correspondientes a las curvas de inactivación de los inóculos simples y compuestos de *E. coli*, *S. cerevisiae* y esporas de *A. acidoterrestris* en jugo naranja-mandarina tratado por luz UV-C (1271 mJ/cm<sup>2</sup>).

Inóculo	Coroller				R <sup>2</sup> <sub>aj</sub>	Weibull		R <sup>2</sup> <sub>aj</sub>	Bifásico con hombro				R <sup>2</sup> <sub>aj</sub>
	$\alpha$ (-)	$\delta_1$ (min)	$p$ (-)	$\delta_2$ (min)		$b$ (min <sup>-n</sup> )	$n$ (-)		SL (min)	$f$ (-)	$K_{sens}$ (min <sup>-1</sup> )	$K_{res}$ (min <sup>-1</sup> )	
<i>S. cerevisiae</i>	2,61 (-0,57)	3,33*** (-0,51)	1,84** (-0,38)	11,77** (-1,75)	0,99	0,47**** (-0,2)	0,84**** (-0,07)	0,92	2,07*** (-0,05)	0,999** **	1,68**** (-0,18)	0,34* (-0,17)	0,99
<i>S. cerevisiae</i> + cóctel <i>E. coli</i>	1,86**** (-0,12)	3,50**** (-0,08)	1,43**** (-0,18)	9,89**** (-3,12)	0,99	0,33*** (-0,13)	0,91**** (-0,07)	0,95	1,45**** (-0,19)	0,988** **	1,12** (-0,16)	0,36**** (-0,05)	0,99
<i>S. cerevisiae</i> + cóctel levaduras	2,39* (-0,09)	3,72**** (-0,13)	1,37**** (-0,52)	9,35**** (-1,39)	0,93	0,27**** (-0,2)	1,04**** (-0,07)	0,88	1,32**** (-0,05)	0,970** **	1,33** (-0,19)	0,58**** (-0,16)	0,99
<i>S. cerevisiae</i> + microbiota aislada	2,18**** (-0,09)	3,68**** (-0,13)	1,42**** (-0,13)	8,65 <sup>NS</sup> (-1,6)	0,99	0,28**** (-0,14)	1,03**** (-0,06)	0,95	1,32**** (-0,02)	0,960** **	1,34 <sup>NS</sup> (-0,27)	0,63**** (-0,19)	0,99
<i>E. coli</i>	3,69 (-0,57)	1,35 *** (-0,51)	1,14** (-0,38)	11,53 ** (-1,75)	0,99	1,25**** (-0,2)	0,55**** (-0,07)	0,92	0,27*** (-0,05)	0,99*** *	2,19**** (-0,18)	0,23* (-0,17)	0,99
<i>E. coli</i> + cóctel <i>E. coli</i>	3,40**** (-0,12)	1,90**** (-0,08)	1,11**** (-0,18)	12,01**** (-3,12)	0,99	0,78*** (-0,13)	0,69**** (-0,07)	0,95	0,21**** (-0,19)	0,99*** *	1,44** (-0,16)	0,34**** (-0,05)	0,99
<i>E. coli</i> + cóctel levaduras	3,71* (-0,09)	1,56**** (-0,13)	1,33**** (-0,52)	11,58**** (-1,39)	0,93	1,14**** (-0,2)	0,61**** (-0,07)	0,88	0,26**** (-0,05)	0,99*** *	2,29** (-0,19)	0,46**** (-0,16)	0,99
<i>E. coli</i> + microbiota aislada	2,74**** (-0,09)	1,32**** (-0,13)	1,14**** (-0,13)	6,87 <sup>NS</sup> (-1,60)	0,99	1,24**** (-0,14)	0,55**** (-0,06)	0,95	0,43**** (-0,02)	0,99*** *	2,24 <sup>NS</sup> (-0,27)	0,26**** (-0,19)	0,99
<i>A. acidoterrestris</i> (esporas)	3,24 <sup>NS</sup> (-78)	3,86**** (-0,93)	0,87**** (-0,3)	17,55* (++)	0,98	0,38**** (-0,05)	0,80**** (-0,05)	0,98	-1,23 <sup>NS</sup> (-0,74)	0,99*** *	0,54**** (-0,14)	0,0**** (-1,00)	0,98

Los valores entre paréntesis representan el error estándar de cada parámetro. Los asteriscos representan la significancia: <sup>NS</sup> No-significativo; \*\*\* Significativo a nivel de 0,1% ; \*\* significativo a nivel de 1% \* significativo a nivel de 5%.



**Tabla 4.4.** Parámetros estadísticos característicos de las distribuciones de frecuencias de resistencia Weibullianas: moda ( $t_{cm}$ ), media ( $t_c$ ), varianza ( $\sigma_{t_c}^2$ ) y coeficiente de sesgo ( $v_1$ ) para la inactivación de inóculos simples y compuestos de *E. coli*, *S. cerevisiae* y esporas de *A. acidoterrestris* en jugo naranja-mandarina tratado por luz UV-C (1271 mJ/cm<sup>2</sup>).

Inóculo	$t_{cm}$ (min)	$t_c$ (min)	$\sigma_{t_c}^2$ (min <sup>2</sup> )	$v_1$ (-)
<i>S. cerevisiae</i>	-	2,7	10,4	2,6
<i>S. cerevisiae</i> + cóctel <i>E. coli</i>	-	3,5	15,1	2
<i>S. cerevisiae</i> + cóctel levaduras	-	3,5	11,1	2
<i>S. cerevisiae</i> + microbiota nativa	0,1	3,4	10,9	2
Single <i>E. coli</i>	-	0,8	2,7	5,8
<i>E. coli</i> + cóctel <i>E. coli</i>	-	1,5	5,2	3,6
<i>E. coli</i> + cóctel levaduras	-	0,9	2,6	4,6
<i>E. coli</i> + microbiota nativa	-	0,8	2,8	5,8
Esporas de <i>A. acidoterrestris</i>	-	3,8	22,9	2,7

**Tabla 4.5.** Valores de RMSE, AIC y BIC de los modelos de Coroller, Weibull y Bifásico con hombre correspondientes a las curvas de supervivencia de los inóculos simples y compuestos de *E. coli*, *S. cerevisiae* y esporas de *A. acidoterrestris* en jugo naranja-mandarina tratado por UV-C (1271 mJ/cm<sup>2</sup>).

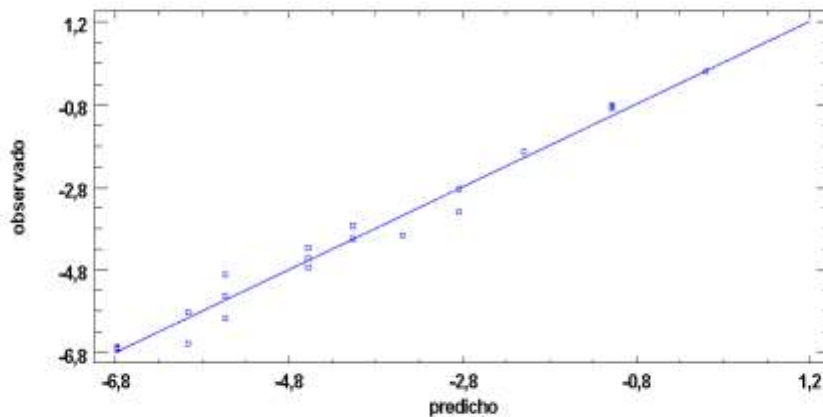
Inóculo	RMSE			AIC			BIC		
	Weibull	Coroller	Bifásico con hombre	Weibull	Coroller	Bifásico con hombre	Weibull	Coroller	Bifásico con hombre
<i>S. cerevisiae</i>	0,36	<b>0,10</b>	0,40	12,4	<b>-10,2</b>	16,3	13,59	<b>-8,3</b>	18,3
<i>S. cerevisiae</i> + cóctel <i>E. coli</i>	0,17	<b>0,06</b>	0,10	-3,2	<b>-24,4</b>	-11,1	-2,0	<b>-22,4</b>	-9,1
<i>S. cerevisiae</i> + cóctel levaduras	0,24	<b>0,10</b>	1,85	3,3	<b>-12,1</b>	54,0	4,7	<b>-9,7</b>	56,4
<i>S. cerevisiae</i> + microbiota aislada	0,22	<b>0,10</b>	1,87	1,2	<b>-16,1</b>	54,2	2,7	<b>-13,7</b>	56,7
<i>E. coli</i>	0,53	<b>0,14</b>	<b>0,14</b>	22,68	<b>-7,49</b>	-6,29	24,13	<b>-5,06</b>	-3,86
<i>E. coli</i> + cóctel <i>E. coli</i>	0,39	<b>0,10</b>	0,10	15,19	<b>-20,51</b>	-20,27	16,64	<b>-18,08</b>	-17,84
<i>E. coli</i> + cóctel levaduras	0,52	0,14	<b>0,14</b>	22,16	-5,83	<b>-6,39</b>	23,62	-3,41	<b>-3,96</b>
<i>E. coli</i> + microbiota aislada	0,37	0,14	<b>0,14</b>	13,31	-4,96	<b>-6,02</b>	14,50	-2,97	<b>-4,03</b>
<i>A. acidoterrestris</i> (esporas)	<b>0,14</b>		0,17	<b>-6,75</b>		-4,21	<b>-5,29</b>		-1,79

Los valores de RMSE, AIC o BIC en negrita representan los menores valores de la fila para la comparación entre modelos.

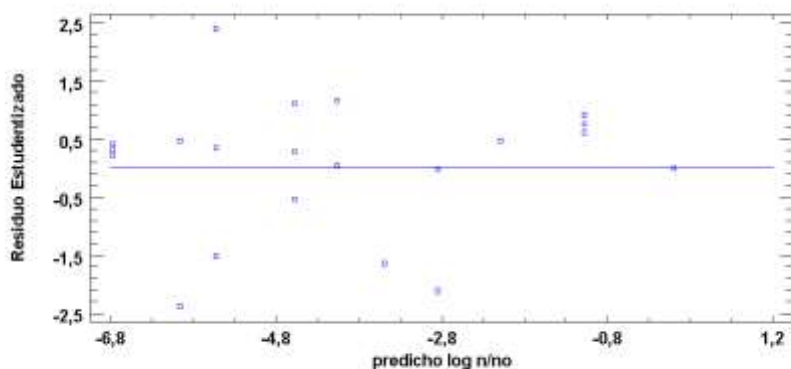
La **Figura 4.14** presenta distintos instrumentos gráficos de validación interna de los modelos elegidos, los cuales permiten verificar la adecuación de los mismos. A modo de ilustración se muestran sólo algunas de las condiciones evaluadas. El análisis de la gráfica de los valores observados en función de los valores predichos por el modelo de Weibull mostró en todos los casos una distribución cercana a la línea diagonal, lo cual indica que los valores predichos resultaron muy parecidos a aquellos obtenidos experimentalmente (**Figura 4.14 a**). En los gráficos de los residuales en función de los valores predichos se observa, en general para todas las condiciones, una distribución de los residuales uniforme y horizontal en torno de los valores predichos, hecho que indica homocedasticidad (**Figura 4.14 b**). En ningún caso se observó forma de cono o herradura.

**Figura 4.14.** Ejemplos de validación interna para el modelo de Weibull que representa las reducciones logarítmicas de *E. coli* en jugo de naranja-mandarina tratado por UV-C/T. a) Valores observados vs valores predichos por el modelo propuesto. b) Residuales vs valores predichos por el modelo propuesto.

a)



b)



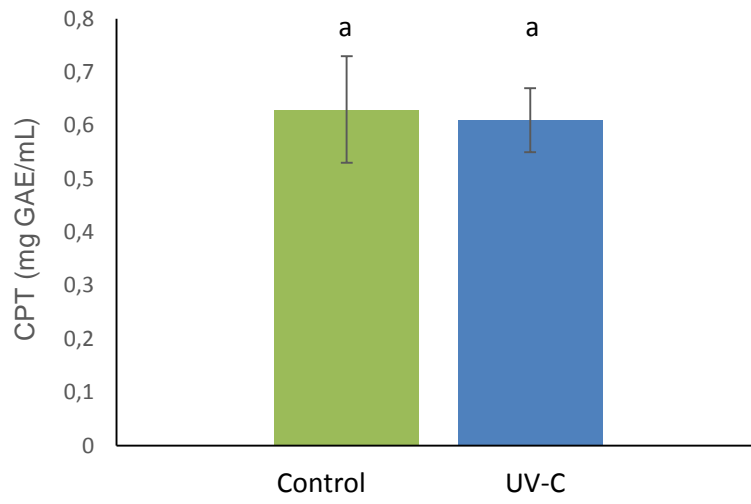
#### 4.8 Estudios de calidad fisicoquímica

Se realizaron estudios de calidad fisicoquímica en el jugo exprimido de naranja-mandarina sin tratar (control) e inmediatamente luego del tratamiento por luz UV-C.

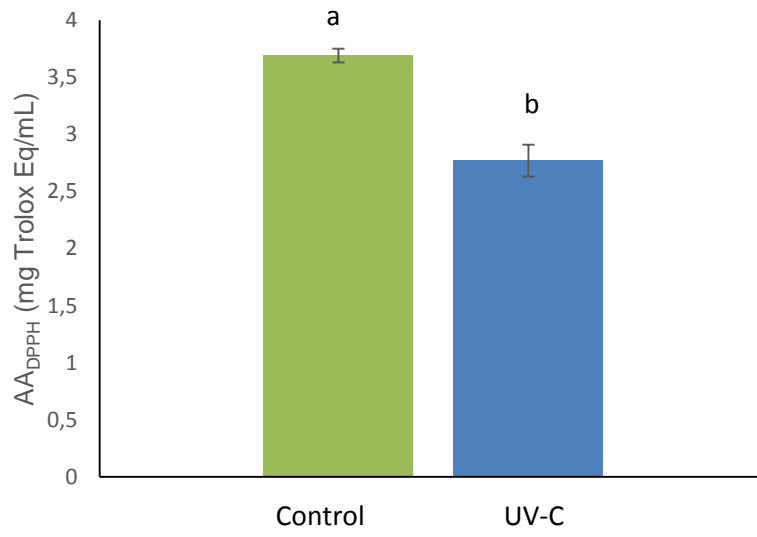
En la **Figura 4.15** se puede observar el contenido de polifenoles totales (**Figura 4.15 a**) y la actividad antirradicalaria determinada por los métodos de DPPH y de ABTS (**Figura 4.15 b,c**), de las muestra de jugo tratado por UV-C y del control sin tratar. La muestra tratada mostró valores similares de polifenoles totales ( $0,61 \pm 0,06$  mg GAE/mL) y de actividad antirradicalaria por el método de ABTS ( $0,72 \pm 0,14$  mg Trolox Eq/mL) al control ( $0,63 \pm 0,10$  mg GAE/mL y  $0,58 \pm 0,40$ , respectivamente). Por otro lado, una leve caída en el valor de actividad antirradicalaria determinada por el método de DPPH fue registrada para la muestra tratada en comparación con el control ( $2,77 \pm 0,06$  mg Trolox Eq/mL y  $3,69 \pm 0,14$  mg Trolox Eq/mL, respectivamente). A partir de un análisis MANOVA de dos factores, pudimos inferir que el tratamiento UV-C prácticamente no afectó los compuestos bioactivos presentes en el jugo de fruta.

**Figura 4.15.** (a) Contenido de polifenoles totales (mg GAE/ mL); (b) actividad antirradicalaria (mg Trolox Eq/mL) por DPPH y (c) actividad antirradicalaria (mg Trolox Eq/mL) por ABTS del jugo exprimido de naranja-mandarina procesado o no (control) por UV-C. Las letras distintas sobre las barras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ).

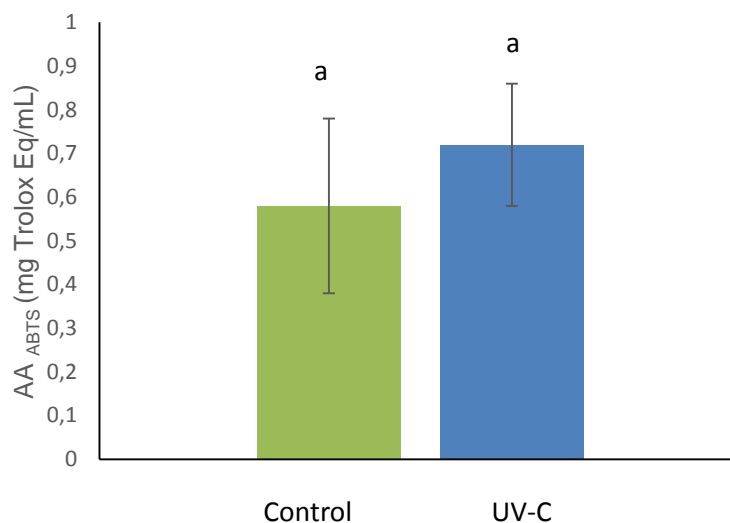
a)



b)



c)



Vale la pena mencionar que existió una diferencia en los valores de actividad antioxidante obtenidos por los dos métodos (**Figura 4.15**). Ambos métodos presentan algunas desventajas. Por un lado el método de ABTS es una herramienta muy útil para estimar actividad antioxidante tanto en matrices hidrofílicas como lipofílicas, como por ejemplo fluidos corporales y extractos de alimentos (Martysiak-Żurowska y Wenta, 2012). De todos modos, la reacción se ve limitada a altas concentraciones de compuestos antioxidantes debido a que la complejidad y tamaño de la estructura de los polifenoles aumenta por los aductos con un anillo extra que impide o dificulta que el fenol se una al compuesto ABTS (Schaich y col., 2015). De manera similar, la interacción entre los antioxidantes y el DPPH está determinada por la conformación estructural de ambos. Algunos compuestos reaccionan de manera rápida, pero el acceso de otras estructuras más complejas al DPPH se ve impedido a bajas concentraciones o bien bloqueado a altas concentraciones (Martysiak-Żurowska y Wenta, 2012).

En cuanto al color, los valores CIELAB L\*, a\*, b\* de la muestra tratada (L\* = 35,0 ± 0,6; a\* = -0,2 ± 0,2; b\* = 19,8 ± 1,1) y del control (L\* = 35,5 ± 0,6; a\* = 0,1 ± 0,5; b\* = 19,8 ± 0,9) no presentaron diferencias significativas (p < 0,05), por lo cual el tratamiento UV-C no afectó el color del jugo. A la vez, se determinaron valores similares de pH, acidez y turbidez entre la muestra sin tratar (pH = 4,10 ± 0,05; acidez = 0,63 ± 0,02 g ác. cítrico/100 mL jugo; turbidez = 2095 ± 217 NTU) y la tratada (pH = 4,20 ± 0,05; acidez = 0,59 ± 0,02 g ac. cítrico/100 mL jugo; turbidez = 1909 ± 202 NTU). De todos modos, se encontró un aumento del 15% en los grados Brix del jugo tratado por UV-C (10,1 ± 0,1 °Brix) comparado con el control (8,7 ± 0,3 °Brix).

En concordancia con los resultados obtenidos en la tesis, Ferrario y col. (2018) estudiaron el efecto de la luz UV-C (10,6 kJ/m<sup>2</sup>) sobre el color, pH, °Brix y turbidez de un jugo combinado de zanahoria-naranja (1:1, pH: 3,8, 10,6 °Brix) y reportaron que no hubo cambios significativos en ninguno de estos parámetros antes y después del tratamiento.

#### 4.9 CONCLUSIONES PARCIALES: Primera parte - escala laboratorio

- En esta etapa se demostró que la efectividad del tratamiento por luz ultravioleta de onda corta dependió de manera significativa de características de la matriz a tratar a saber, turbidez, índices de absortividad UV y sólidos solubles. Los jugos blend exprimido natural de naranja-mandarina y mix demostraron ser matrices complejas, turbias, con altos valores de índice de absortividad UV y sólidos solubles, y diferente viscosidad. El tamaño de partícula del blend naranja-mandarina fue multimodal.
- El tiempo medio de residencia experimental determinado con un pulso de sal fue muy similar al tiempo de residencia teórico, por lo que se comprobó una elevada eficiencia del reactor con un valor del cociente  $t_m/t_t$  cercano a 1.
- Las técnicas de radiometría, actinometría y biosimetría demostraron ser adecuadas para la determinación de las distintas dosis características del reactor (incidente, entregada y germicida). En particular, la determinación de una fluencia germicida requerida (fluencia biosimétrica) medida utilizando pulsos de dos microorganismos indicadores relevantes permitió alcanzar la caracterización de dosis de un reactor UV-C más precisa que se pudiera obtener en la actualidad y que muy pocas veces se reporta en la literatura.
- La luz UV-C fue muy efectiva para inactivar esporas de *A. acidoterrestris* en comparación al tratamiento térmico tradicional, el cual como se ha dicho, es completamente inefectivo. Se alcanzaron más de 3 ciclos logarítmicos de inactivación de las mismas en un jugo turbio (naranja-mandarina), lo que significa un valor significativo de decontaminación para el nivel que comúnmente se determina en estas bebidas (2-3 ciclos logarítmicos) para el caso de estas esporas, demostrando el potencial de esta tecnología para solucionar el gran problema que genera la presencia de este microorganismo en la industria juguera.

- Tal como se esperaba, la efectividad del tratamiento UV-C para inactivar esporas de *A. acidoterrestris* no se vio mejorada por la asistencia de calor moderado debido a la alta resistencia térmica de las mismas. El bajo pH del jugo de limón no aumentó la inactivación de las esporas ya que se trata de una bacteria acidófila. Sin embargo, resultó un reaseguro significativo considerando la posible contaminación de otras cepas deteriorativas y/o patógenas, tal como se demostró en los estudios de reto microbiano realizados en esta etapa.
- Los estudios de reto microbiano con inóculos mixtos permitió tener una visión más cercana a la situación real de una contaminación natural en un jugo frutal y evaluar si la presencia de una microbiota de fondo tuvo efecto sobre la susceptibilidad de cada tipo de microorganismo estudiado. Exceptuando el caso de *S. cerevisiae* en presencia de un cóctel de levaduras, en general se observó una inactivación final similar entre los inóculos simples y compuestos. Por lo tanto, se puede inferir que los primeros son buenos indicadores de estudio y que fue válido trabajar con inóculos simples.
- Los modelos matemáticos aplicados describieron adecuadamente las curvas de inactivación microbiana obtenidas. De todos modos, los modelos de Coroller y bifásico con hombro fueron los más adecuados para describir las curvas sigmoideas, mientras que el modelo de Weibull ajustó muy bien a las curvas más lineales como la de inactivación de esporas de *A. acidoterrestris*. El modelo de Coroller en particular, fue el más preciso y menos parsimonioso, de acuerdo a los criterios de RMSE, AIC y BIC.
- En particular, el modelo de Weibull, cuyo abordaje se basa en considerar que cada célula microbiana en la población es inactivada a un determinado tiempo de tratamiento, describiéndose así distribuciones de tiempos de muerte, evidenció que los sistemas simples y compuestos por *E coli* fueron los más susceptibles al tratamiento. De todos modos, ningún sistema, exceptuando el de *S cerevisiae* acompañado por el cóctel de microbiota nativa asilada, presentó moda por lo cual todas las poblaciones fueron inactivadas a cortos tiempos de tratamiento. Este modelo también puso en evidencia la mayor resistencia de las esporas de *A. acidoterrestris*, lo cual es esperable debido a que son estructuras de resistencia a situaciones adversas o de estrés microbiano.



- El modelo de Coroller o doble Weibull, permitió evidenciar diferencias en la cinética de inactivación de los inóculos simples y compuestos al considerar distribuciones de resistencia en cada una de las dos subpoblaciones.
- . El modelo bifásico con hombro fue menos efectivo en describir las diferencias entre los inóculos simples y compuestos de un mismo microorganismo que el modelo de Coroller pero al igual que éste, evidenció la mayor susceptibilidad de los inóculos de *E. coli*, en todos los casos comparados con *S. cerevisiae* simple o compuesta y con las esporas de *A. acidoterrestris*. Este modelo contribuyó a determinar la existencia o no de un hombro al inicio del tratamiento, lo cual indicaría la necesidad de que varios fotones de luz UV-C alcancen a las células para lograr inactivarlas. Se concluyó que los sistemas de *S. cerevisiae* presentaron los mayores hombros, seguidos por *E. coli* y por último las esporas de *A. acidoterrestris* que no tuvieron hombro.
- El tratamiento por luz UV-C en capa delgada no afectó significativamente los compuestos bioactivos presentes en el jugo de naranja-mandarina ya que el mismo presentó valores similares de polifenoles totales y de actividad antioxidante que el control sin tratar. El tratamiento UV-C tampoco modificó el color, pH, acidez y turbidez del jugo de naranja-mandarina.
- La detección y caracterización de colas marcadas en la inactivación de los diferentes inóculos ensayados y la falta del establecimiento de un régimen turbulento llevaron a los experimentos realizados en la ETAPA II.

## PARTE 2: PLANTA PILOTO

En esta etapa, las investigaciones se focalizaron en diseñar un reactor UV-C más eficiente que pudiera operar en régimen turbulento y en un modo de operación por pasadas de modo de superar los obstáculos y deficiencias observadas en el reactor a escala laboratorio y también de acercar el procesamiento propuesto a una escala más próxima a la escala Industrial. En esta etapa se trabajó con inóculos simples en base a los resultados de la primera etapa que demostraron que los mismos son buenos indicadores del tratamiento por luz UV-C. Por otro lado, en la segunda etapa se hizo énfasis en estudiar las diferencias en el tratamiento de matrices simples (claras) y complejas (turbias) con el objetivo de superar las limitaciones generadas por la absorción de luz por parte de las mismas.

### 4.10 Caracterización de las matrices

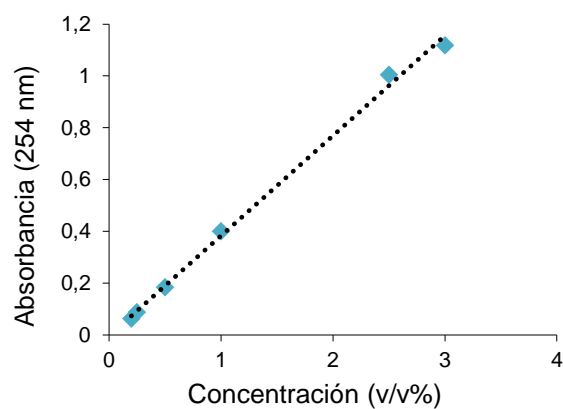
La **Figura 4.16** presenta la variación de la concentración (% v/v) versus la absorbancia a 254 nm para todas las matrices evaluadas en esta etapa a saber, agua peptonada, solución modelo de tartrazina, jugo exprimido de naranja-mandarina, jugos comerciales diluidos de naranja-mandarina, pera, limón claro, limón turbio y mix, preparadas de acuerdo al procedimiento descrito en las *Secciones 3.1.1 y 3.9.1*. A partir de la pendiente de la recta obtenida en el gráfico, se determinó el coeficiente de absorptividad ( $\alpha_{254\text{nm}}$ ) de cada matriz (**Tabla 4.6**) y el valor de transmitancia UV (UVT%) mediante la **Ecuación 3.2 (Tabla 4.6)**.

La **Figura 4.17** muestra la distribución de tamaño de partícula de los jugos comerciales diluidos de naranja-mandarina y de limón turbio, que fueron medidos de acuerdo a lo descrito en la *Sección 3.2.4*. Por otro lado, los gráficos de distribución de tamaño de partícula de los jugos exprimidos de naranja-mandarina y jugo comercial diluido mix, se presentaron previamente en la Parte I, *Apartado 4.1*. Las distribuciones fueron multimodales presentando el jugo comercial de naranja-mandarina un pico pronunciado en el valor de 0,478  $\mu\text{m}$  y otro a 138  $\mu\text{m}$ , lo cual fue similar a los resultados obtenidos para el jugo Mix, implicando que ambas matrices son similares (**Tabla 4.6**). En cuanto al limón turbio también presentó dos picos cuyos valores máximos fueron 0,209 a 166  $\mu\text{m}$ . Las matrices cuyos tamaños de partículas no pudieron ser determinados en el equipo Mastersizer debido a que son menores a los detectables por el mismo, fueron analizadas con el equipo Zetasizer como se detalla en el *Apartado 3.2.4*. Como fue esperable, todos

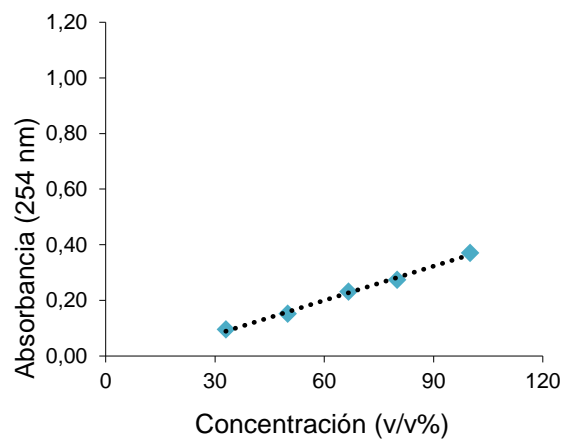
los valores de tamaño de estas matrices fueron menores a 1  $\mu\text{m}$ . En particular, el agua peptonada, la solución modelo, el jugo comercial de pera y el de limón claro presentaron tamaño de partícula promedio de 0,39; 0,436; 0,001-0,438 y 0,532  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Tabla 4.6).

**Figura 4.16.** Concentración (v/v%) versus absorbancia (a 254 nm) de las diferentes matrices evaluadas: a) Jugo de naranja-mandarina exprimido, b) agua peptonada, c) solución modelo, d) jugo de pera, e) jugo de naranja-mandarina comercial, f) jugo mix, g) jugo de limón claro, h) jugo de limón turbio.

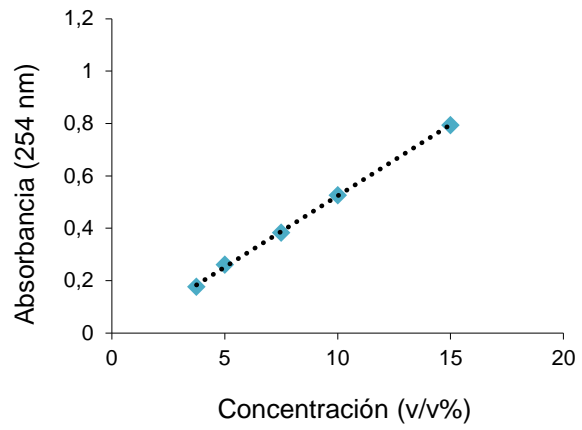
a)



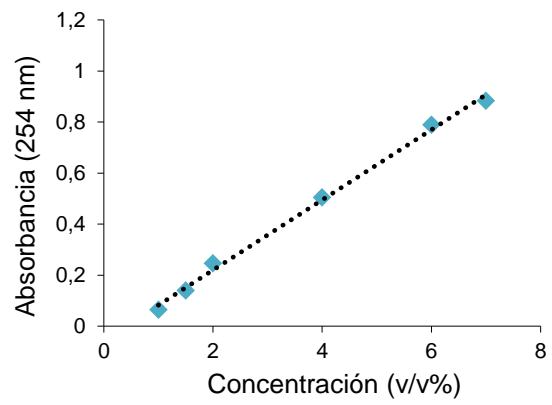
b)



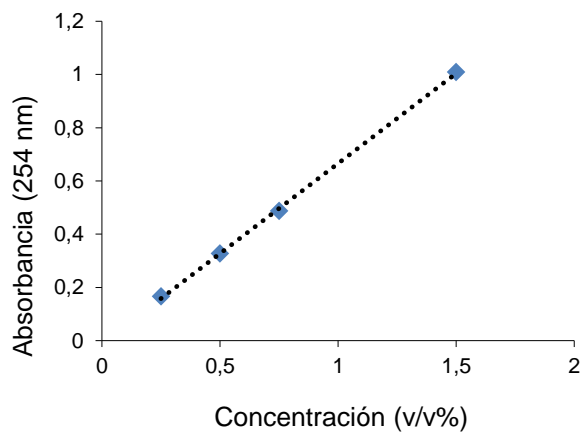
c)



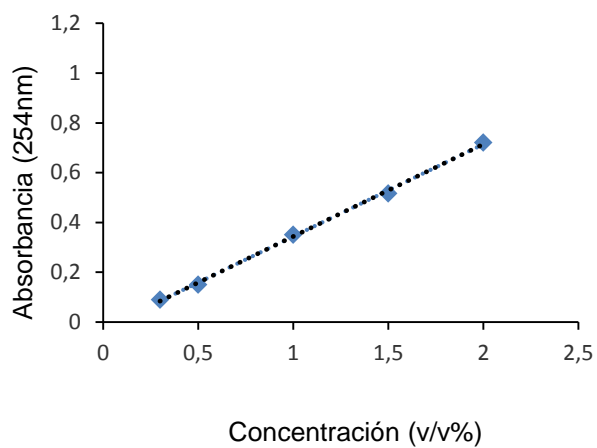
d)



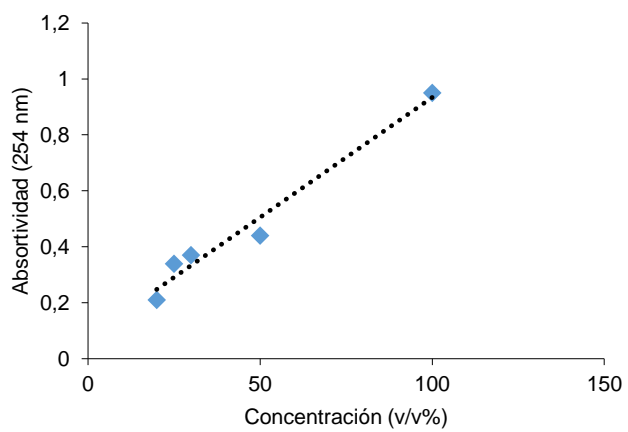
e)



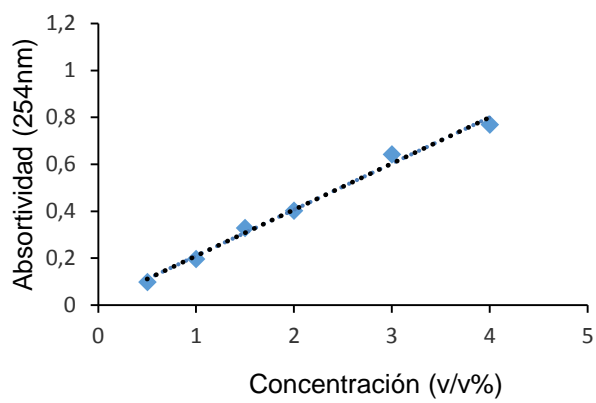
f)



g)

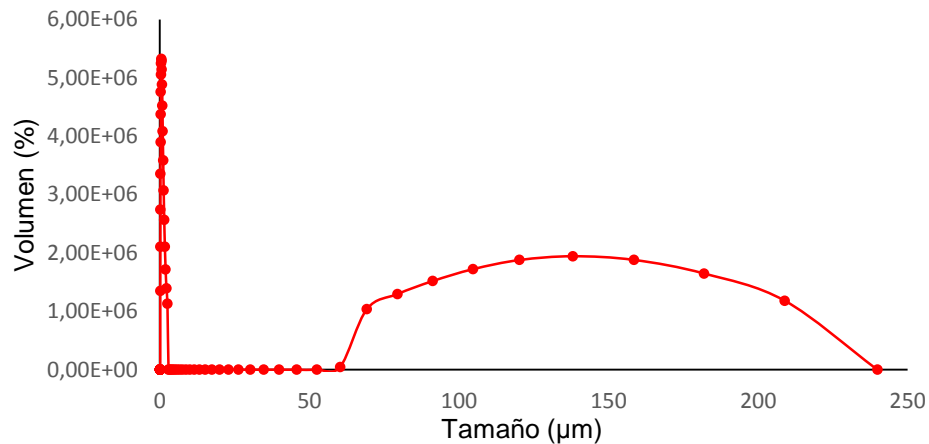


h)

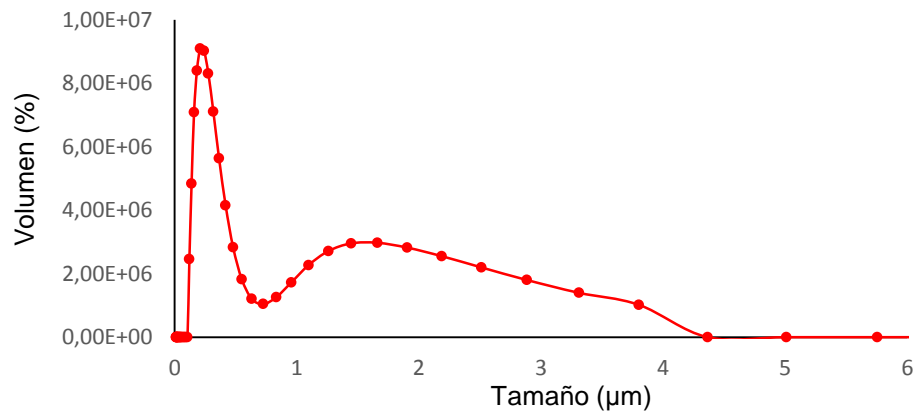


**Figura 4.17.** Volumen (%) versus tamaño ( $\mu\text{m}$ ) de partículas de jugos comerciales diluidos de a) naranja-mandarina, b) limón turbio.

a)



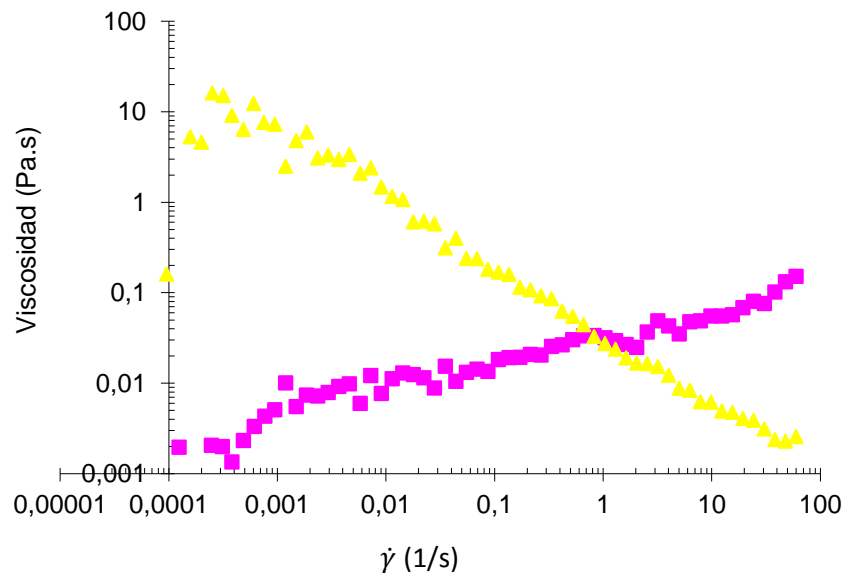
b)



Por otro lado, la **Tabla 4.6**, presenta también los valores de los parámetros: pH, turbidez, %UVT, °Brix, color y viscosidad de las matrices. En términos generales, el jugo exprimido de naranja-mandarina presentó la mayor viscosidad de todas con un valor de 12,4 mPa.s a 20°C, seguida por los jugos comerciales de naranja-mandarina y mix (4,0 y 3,6 mPa.s, respectivamente) (**Figura 4.18**). Las matrices de menor complejidad óptica fueron: agua peptonada, solución modelo, jugo de limón claro y pera ya que presentaron bajos valores de  $\alpha_{254\text{nm}}$  ( $0,004 \pm 0,000$  y  $0,6 \pm 0,1$  NTU;  $0,054 \pm 0,001$  y  $2,4 \pm 0,1$  NTU;

0,218 ± 0,010) y turbidez y (2,22 ± 0,1 NTU; 0,137 ± 0,000 y 21,9 ± 1,0 NTU). Por el contrario el jugo de naranja-mandarina ya sea exprimido natural o comercial diluido, presentó elevados valores de turbidez (1811± 10 y 3100±10, respectivamente) y de  $A_{254nm}$ , pero bajo valor de %UVT (menor a 1%, en ambos casos), siendo el último de los dos el de características ópticas más desfavorables. Una bebida que presenta menos de un 30% de UVT es considerada una matriz compleja, mientras que aquellas cuyos valores de UVT son mayores a 90% se lo puede considerar matrices simples desde el punto de vista óptico. La absorbancia,  $A_{254nm}$ , se ve aumentada por los pigmentos, sólidos solubles (como azúcares y ácidos orgánicos) y compuestos en suspensión de la matrices, pero en particular en los jugos compuestos por naranja y mandarina el alto contenido de vitamina C tiene alta absorbancia de la luz UV en el rango germicida (254 nm) aunque no a mayores longitudes de onda (> 300 nm) (Usaga y col., 2017).

**Figura 4.18.** Curvas de viscosidad ( $\Delta$ ) versus velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) ( $\blacksquare$ ) de un jugo exprimido natural de naranja-mandarina a 50°C.



**Tabla 4.6.** Valores promedio con su desviación estándar de: pH, grados Brix, turbidez (T), coeficiente de absortividad ( $\alpha_{254nm}$ ), transmitancia UV-C (TUV), color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), densidad ( $d$ ), viscosidad ( $\mu$ ) y tamaño de partícula (TP) del jugo de naranja-mandarina exprimido (NM exprimido); agua peptonada (AP); solución modelo (SM), jugo de pera (P), jugo comercial de naranja-mandarina (NM comercial); jugo de limón claro (LC); jugo de limón turbio (LT) y jugo mix de naranja-banana-mango-kiwi-frutilla (MIX).

Matriz	pH	°Brix	T (NTU)	$\alpha_{254nm}$ (cm <sup>-1</sup> )	UVT (%)	L*	a*	b*	TP ( $\mu$ m)	$d$ (kg/m <sup>3</sup> )	$\mu$ 20°C (mPa.s)	$\mu$ 50°C (mPa.s)
NM exprimido	3,9±0,1	13,1±0,1	1811±10	0,387±0,010	< 1	35,5±0,1	0,0±0,2	19,8±0,0	630	1098±1	4,49 ± 0,0	3,46 ± 0,0
AP	7,0±0,1		0,6±0,1	0,004±0,000	> 99	-	-	-	0,396	1000±1	1,4 ± 0,0	-
SM	5,8±0,1	8,9±0,1	2,4±0,1	0,054±0,001	< 1	33,95 ± 0,26	-5,76 ± 0,04	52,64 ± 1,13	0,436	1081±1	2,3 ± 0,0	1,2 ± 0,0
P	3,8±0,1	15,1±0,1	21,9±1,0	0,137±0,000	< 1	35,04 ± 0,34	-5,24±0,02	30,83±0,43	0,001 a 0,483	1106±1	1,7 ± 0,0	1,4 ± 0,0
NM comercial	3,5±0,1	12,4±0,1	3100±10	0,677±0,010	< 1	34,67±0,06	-1,71±0,03	26,16±0,13	0,478 a 138	1096±1	4,0 ± 0,0	2,4 ± 0,0
LC	2,9±0,1	8,4±0,1	2,22±0,1	0,007±0,001	10	35,48±0,51	-0,99±0,03	7,51±0,37	0,532	1080±1	1,4 ± 0,0	-
MIX	3,7±0,1	13,9±0,1	1767,33±10	0,371±0,010	< 1	28,72±0,25	0,45±0,14	45,52±0,22	0,478 a 120	1108±1	3,6 ± 0,0	2,2 ± 0,0
LT	2,5±0,1	7,4±0,1	2097±10	0,196±0,010	< 1	27,15±0,84	-1,02±0,02	12,34±0,46	0,209 a 166	1063±1	1,9 ± 0,0	-

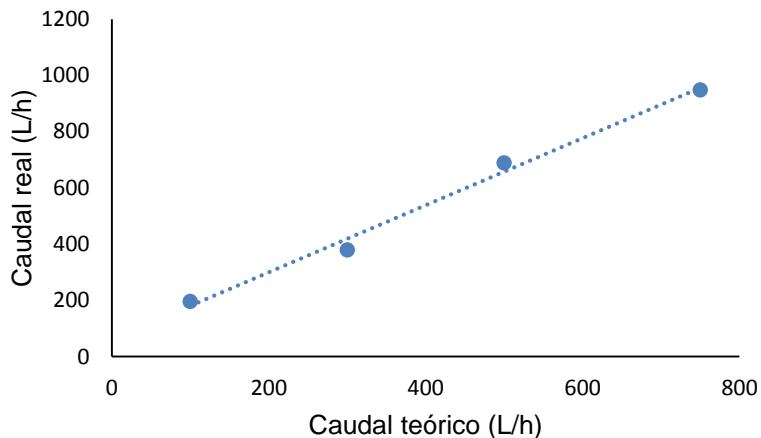


#### 4.11 Determinación y selección de las condiciones de operación

Teniendo en cuenta que el equipo a escala piloto utilizado en esta tesis fue diseñado y desarrollado al inicio de esta investigación, se debieron determinar y estudiar las condiciones óptimas de trabajo del equipo como se describió en la *Sección 3.10.2*. En primer lugar se evaluó el caudal real otorgado por la bomba centrífuga sanitaria cuando se seleccionaban diferentes caudales en el caudalímetro (**Figura 4.19**) y a partir de ello se evaluó qué caudal otorgaba el mayor tiempo de residencia dentro del equipo y permitía el establecimiento de un régimen turbulento. A raíz de estas experiencias se seleccionó un caudal de trabajo de 380 L/h, el cual permitió una velocidad de circulación de 1670 m/h y un tiempo de residencia de 36,6 s.

Por otro lado se determinó la pérdida de calor por parte del sistema durante el funcionamiento del equipo a fin de determinar con mayor precisión la temperatura real de trabajo y la diferencia de temperatura entre la entrada y la salida del sistema. Se determinó que la pérdida de calor fue mayor al trabajar con las lámparas apagadas en comparación a las lámparas encendidas. Luego de 50 s de circulación a un caudal de 380 L/h, la caída de temperatura fue de 8,0 °C en el caso de las lámparas apagadas y de sólo 1,5 °C al mantener las lámparas UV-C encendidas. Por otro lado, cuando se trabajó al caudal máximo de 750 L/h la caída de temperatura fue nula, lo cual indica que a mayor velocidad de circulación, menor es el intercambio de calor entre el sistema y el ambiente.

**Figura 4.19.** Caudal real entregado por el equipo de procesamiento UV-C a escala piloto versus caudal teórico seleccionado en el caudalímetro de la bomba centrífuga del equipo.



#### 4.12 Determinación del tipo de flujo dentro del reactor mediante el número de Reynolds ( $Re$ ) y del número Dean ( $De$ )

Se calcularon los números de Reynolds ( $Re$ ) mediante la **Ecuación 3.29** para cada matriz ensayada en el equipo a escala piloto. Para ello se utilizaron los valores de densidad y viscosidad de cada jugo, esta última medida a la temperatura de tratamiento ( $20\text{ °C} \pm 1$  o  $50\text{ °C} \pm 1$ ) según correspondiera (**Tabla 4.7**) y de velocidad media obtenida mediante el caudal real de trabajo (380 L/h) dividido por el área transversal del reactor ( $2,27 \times 10^{-4}\text{ m}^2$ ). Por otro lado, mediante la Ecuación 3.30, se determinaron los valores del número de Dean ( $De$ ) a partir de los cuales se puede establecer si existen vórtices secundarios que optimicen el mezclado dentro del reactor y la interacción de la luz con el fluido. Todos los valores de  $Re$  y  $De$  obtenidos están presentados en la **Tabla 4.7**.

En cuanto a la relación entre el diámetro interno del tubo y el diámetro del coil que se conformó con dicho tubo ( $D/D_c$ ) en este equipo, tuvo un valor de 0,05. De acuerdo a Koutchma (2009), los vórtices secundarios se promueven para un flujo Dean cuando la relación  $D/D_c$  se encuentra entre los valores de 0,03 y 0,10; por lo tanto, podemos inferir la existencia de tales vórtices en el equipo utilizado en esta tesis. A la vez, en un trabajo previo en el que los autores validaron un reactor coil similar al presente equipo, Koutchma y col. (2007) establecieron que a partir de valores de  $Re$  mayores a 2000 y en presencia de vórtices secundarios (confirmados por la relación  $D/D_c$  y los valores de alcanzados en todos los sistemas previamente descritos) se alcanza un régimen de flujo turbulento. Por lo tanto, de acuerdo a los parámetros de flujo obtenidos para todos los sistemas en el equipo de

escala piloto de esta tesis, se trabajó bajo flujo turbulento, favoreciendo el mezclado y la interacción del fluido con la luz UV-C.

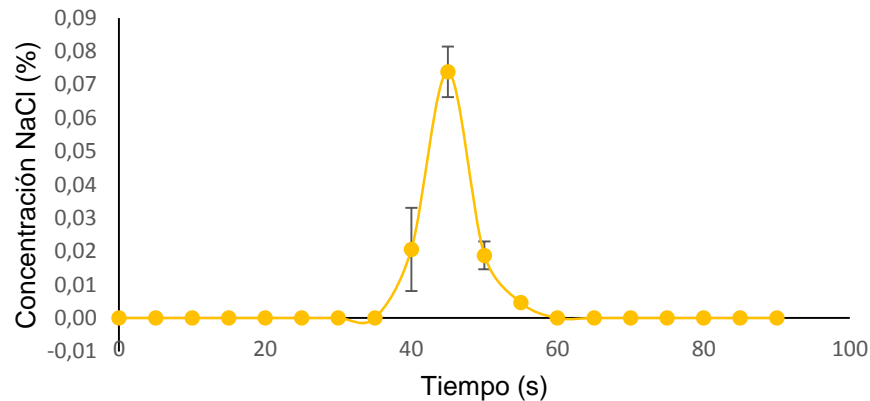
**Tabla 4.7.** Valores de los números de Reynolds y de Dean, para todos las matrices utilizadas en los ensayos a escala piloto: jugo de naranja-mandarina exprimido (NM exprimido); agua peptonada (AP); solución modelo (SM), jugo de pera (P), jugo comercial de naranja-mandarina (NM comercial); jugo de limón claro (LC); jugo de limón turbio (LT) y jugo mix de naranja-banana-mango-kiwi-frutilla (MIX); a la temperatura de trabajo correspondiente para cada caso (20 y 50°C)

Matriz	Re	De
NM exprimido 20°C	2161	471
NM exprimido 50°C	2808	612
AP 20°C	7043	1535
SM 20°C	5540	1207
SM 50°C	8006	1745
P 20°C	5740	1251
P 50°C	6971	1519
NM comercial 20°C	2418	527
NM comercial 50°C	4029	878
MIX 20°C	2793	609
MIX 50°C	4444	969
LC 20°C	6964	1518
LT 20°C	4856	1058

Se determinó la distribución de los tiempos de residencia (DTR) dentro del reactor mediante la inyección de un pulso de 5 mL de una solución de cloruro de sodio al 10% como se describió en el *Apartado 3.11.4*. La Figura 4.20 presenta el gráfico de la concentración de sal en el caudal de salida del reactor en función del tiempo. En ella se puede observar una DTR unimodal y el tiempo medio de residencia ( $t_m$ ) calculado para un caudal de 380 L/h fue de 45,5 segundos. Por otro lado se calculó el tiempo de residencia teórico ( $t_t$ ) del reactor que fue de 36,6 segundos. A partir de estos datos se pudo obtener el ratio  $t_m/t_t$  el cual tuvo un valor de 1,2 indicando que el volumen efectivo del reactor es total ya que el valor de esta relación fue mayor y cercano a 1 (Mollah y col., 2018). Koutchma y col. (2007) determinaron la DTR en un reactor UV-C de tubo coil, escala piloto de 27,96 L. Los autores determinaron que para un caudal de 22,7 L/min el  $t_m$  fue de 90,3 segundos, mientras que el

$t_i$  fue de 88,7 segundos, por lo que el ratio  $t_m/t_i$  fue de 1,01. Esto último implicó que todo el volumen del reactor fue usado de forma efectiva.

**Figura 4.20.** Distribución de los tiempos de residencia (DTR) utilizando una solución de cloruro de sodio al 10% como rastreador, en el equipo UV-C de flujo Dean, a escala piloto, en un caudal estable de 380 L/h, (●) puntos experimentales, (I) desviación standard.



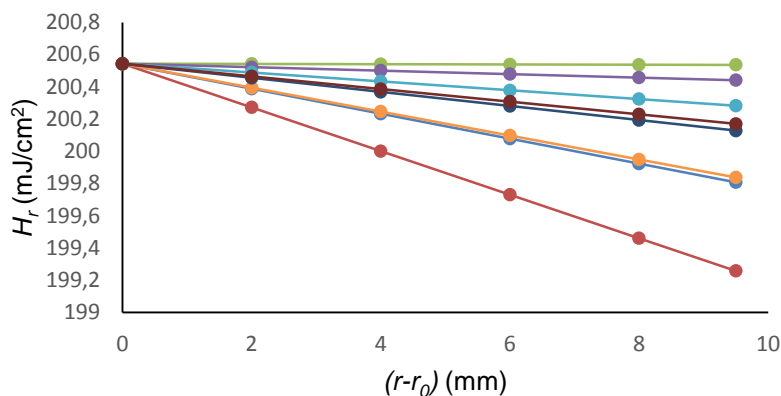
#### 4.13 Caracterización del procesamiento UV-C en el reactor

La potencia total de entrada ( $PTE$ ) por el equipo de procesamiento UV-C a escala piloto calculada a partir de la **Ecuación 3.34** (*Sección 3.11.5*) tuvo un valor de 432 W mientras que la potencia UV-C total de entrada ( $PTE_{UV-C}$ , **Ecuación 3.36**) fue de 176,41 W. Adicionalmente, se calculó la energía UV-C entregada por volumen ( $E_{UV-C}$ ) mediante la **Ecuación 3.37**, la cual resultó en un valor de 1,67 kJ/L.

La fluencia UV-C incidente ( $H_i$ ), definida previamente en la *Sección 3.3.4*, para el equipo escala piloto tuvo un valor de 200 mJ/cm<sup>2</sup>. La fluencia absorbida ( $H_r$ ) dentro del reactor depende del coeficiente de absortividad de cada matriz y de la distancia del punto evaluado dentro tubo coil a la superficie del mismo donde incide la luz UV-C. Por lo tanto se pudo determinar el perfil de  $H_r$  dentro del reactor para cada matriz (**Figura 4.21**). A pesar de ellos, el valor de  $H_r$  fue prácticamente de 200 mJ/cm<sup>2</sup> ya que en todos los casos fue de entre 197,85 y 200,54 mJ/cm<sup>2</sup>.

La fluencia entregada ( $H_d$ ), que representa la energía disponible para la inactivación de los microorganismos y que se entrega efectivamente al sistema, ya que no es absorbida ni dispersada por los componentes del fluido se determinó para el equipo piloto mediante actinometría ( $H_{d\ act}$ ) y tuvo un valor 892 mJ/cm<sup>2</sup>.

**Figura 4.21.** Perfil de fluencia absorbida ( $H_r$ ) en función del radio, dentro del tubo coil del reactor, para jugo natural exprimido de naranja-mandarina (—●—), jugo comercial diluido de naranja-mandarina (—●—), agua peptonada (—●—), solución modelo (—●—), jugo de pera (—●—), jugo mix (—●—), jugos de limón claro (—●—) y jugo de limón turbio (—●—).

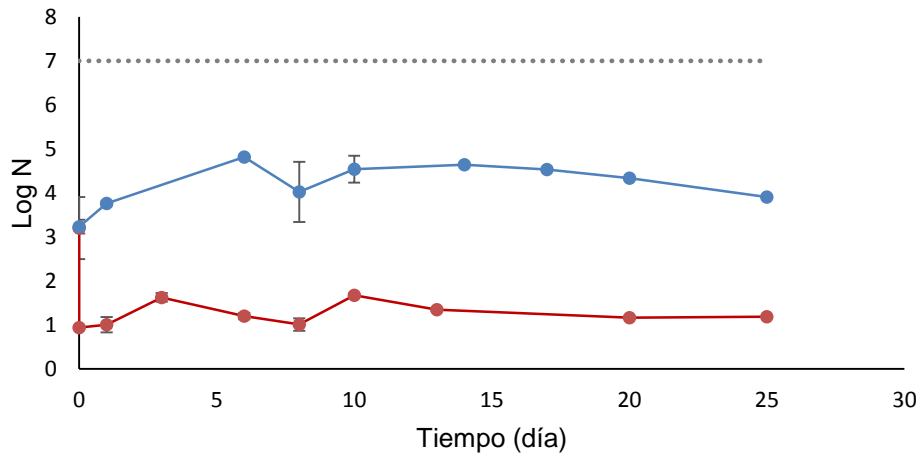


#### 4.14 Efectividad del tratamiento UV-C/T para inactivar la microbiota nativa

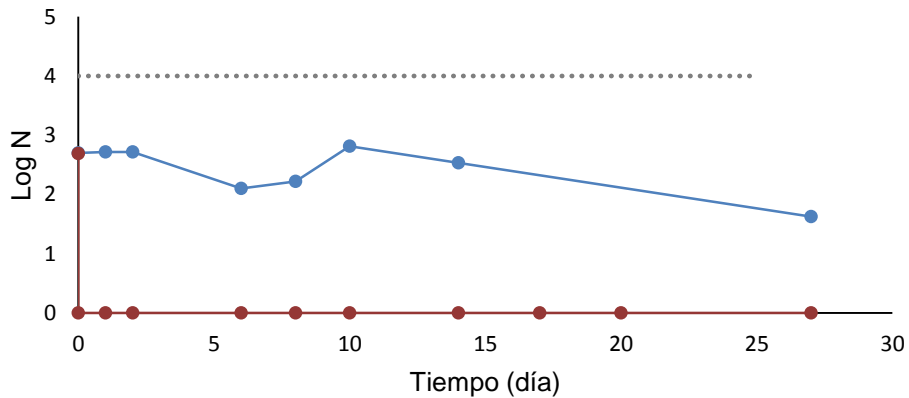
La **Figura 4.22** representa las curvas de supervivencia para el recuento de aerobios mesófilos totales (AMT), hongos y levaduras (HyL) y coliformes totales en jugo de naranja-mandarina exprimido tratado por luz UV-C asistida, durante 25 días de almacenamiento refrigerado (5°C). El tratamiento UV-C/T provocó una reducción de AMT y de HyL de  $3,2 \pm 0,2$  y  $2,7 \pm 0,4$  ciclos logarítmicos, respectivamente (**Figura 4.22**). Asimismo, se eliminó completamente la población de bacterias coliformes ( $2,7 \pm 0,7$  reducciones logarítmicas). Ninguna de las poblaciones tratadas logró recuperarse, manteniéndose constantes durante los 25 días de almacenamiento refrigerado. Por el contrario, en la muestra control, se evidenció un aumento de AMT (1,6 ciclos logarítmicos) al sexto día de almacenamiento para luego mantenerse constante mientras que, la población de HyL aumentó constantemente durante el almacenamiento (2,1 ciclos logarítmicos).

**Figura 4.22.** Curvas de supervivencia de la microbiota remanente durante el almacenamiento refrigerado de jugo de naranja-mandarina exprimido tratado por luz UV-C asistida por calor moderado (50°C) a escala piloto (—●—) y del jugo control sin tratar (—●—), a) aerobios mesófilos totales, b) coliformes totales, c) hongos y levaduras en Se representan también los límites máximos admitidos por la *Health Protection Agency* para las poblaciones de aerobios mesófilos totales y de coliformes totales (.....).

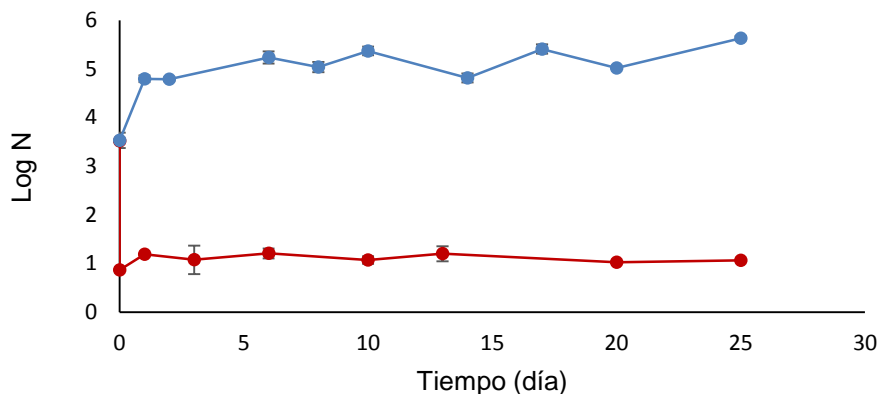
a)



b)



c)



## 4.15 Estudios de reto microbiano

### 4.15.1 Efectividad del tratamiento UV-C individual

La **Figura 4.23** muestra las curvas de inactivación obtenidas luego del tratamiento UV-C simple a escala piloto de los inóculos simples de *E. coli* y *L. plantarum* en agua peptonada, solución modelo, jugo mix, jugo comercial de naranja-mandarina, jugo de pera; de *S. cerevisiae* en las mismas matrices excepto en jugo de pera; y de esporas de *A. acidoterrestris* en jugo mix, limón claro y de limón turbio.

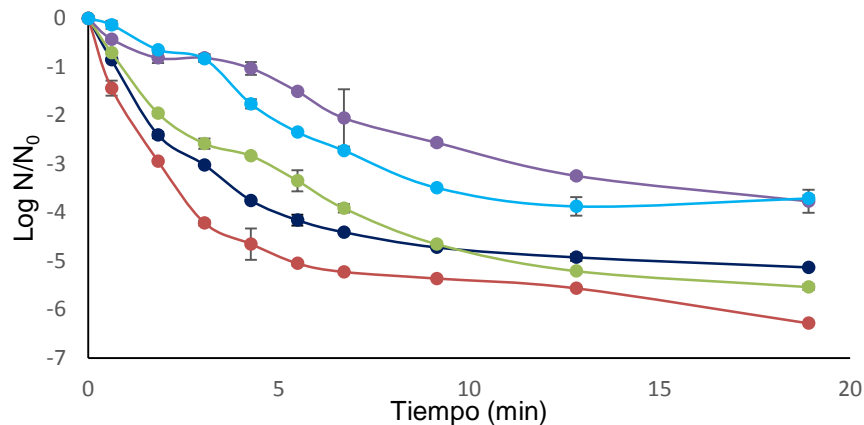
*E. coli* fue el más susceptible al tratamiento UV-C en todas las matrices en comparación con los demás inóculos, alcanzando  $6,28 \pm 0,04$ ,  $5,13 \pm 0,041$ ,  $5,54 \pm 0,41$ ,  $3,77 \pm 0,65$  y  $3,71 \pm 0,72$  reducciones logarítmicas en agua peptonada, solución modelo, jugo de pera, jugo de naranja-mandarina y jugo mix, respectivamente. Para el lactobacilo también se alcanzaron inactivaciones altas en las matrices menos turbias como el agua peptonada, la solución modelo y el jugo de pera ( $5,51 \pm 0,08$ ,  $4,82 \pm 0,50$  y  $4,39 \pm 0,08$  reducciones logarítmicas, respectivamente) a moderadas en los jugos complejos ( $3,60 \pm 0,46$  y  $2,37 \pm 0,71$  reducciones logarítmicas en los jugos mix y naranja-mandarina, respectivamente). La levadura si bien fue la más resistente, fue significativamente inactivada ( $4,70 \pm 0,08$ ,  $4,55 \pm 0,09$ ,  $1,58 \pm 0,04$  y  $1,48 \pm 0,27$  reducciones logarítmicas) en agua peptonada, solución modelo, jugo de naranja-mandarina y jugo mix, respectivamente.

Para las esporas de *A. acidoterrestris* se alcanzó una alta inactivación de  $3,41 \pm 0,08$  reducciones logarítmicas en el jugo de limón claro, moderada en el jugo mix  $1,18 \pm 0,09$  reducciones logarítmicas) y menor en el jugo de limón turbio ( $0,67 \pm 0,00$ ). Estos niveles de inactivación son importantes en el caso de las esporas de *A. acidoterrestris*, ya

que los métodos de pasteurización térmica tradicionales no logran inactivarlas en ningún nivel. Por otro lado, debe tenerse en cuenta que los niveles de contaminación utilizados en los ensayos de reto microbianos son significativamente más altos que aquellos presentes en la contaminación natural de un jugo frutal. Es por ellos, que el descenso de la población microbiana alcanzada mediante el tratamiento UV-C demostró su efectividad para inactivar esporas de *A. acidoterrestris* y su potencial aplicación en la industria. A pesar de ellos, los resultados podrían indicar la necesidad de asistir a esta tecnología con otro factor de estrés a fin de aumentar más su efectividad (Kozono y col., 2023).

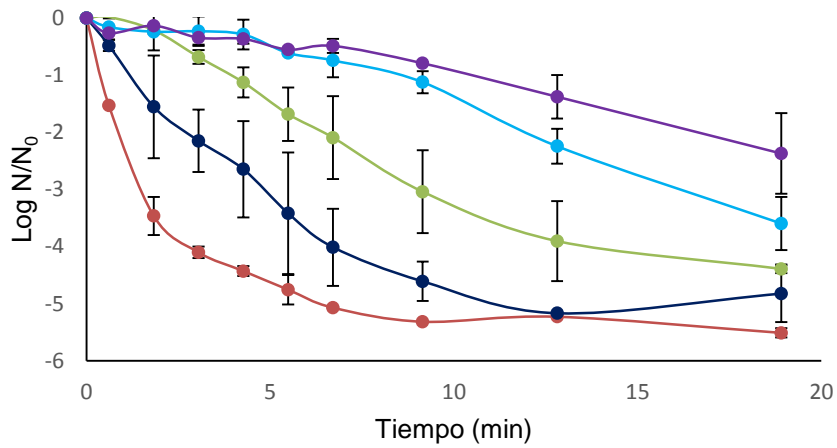
**Figura 4.23.** Curvas de inactivación por luz UV-C simple en reactor a escala piloto de a) *E. coli* ATCC 25922; b) *L. plantarum* ATCC 8014, c) *S.cerevisiae* KE 162 y d) esporas de *A. acidoterrestris* ATCC 49025 en solución modelo (—●—), agua peptonada (—●—), jugo comercial de pera (—●—), jugo comercial mix (—●—), jugo comercial de naranja-mandarina (—●—), jugo comercial de limón claro (—●—) y jugo comercial de limón turbio (—●—).

a)

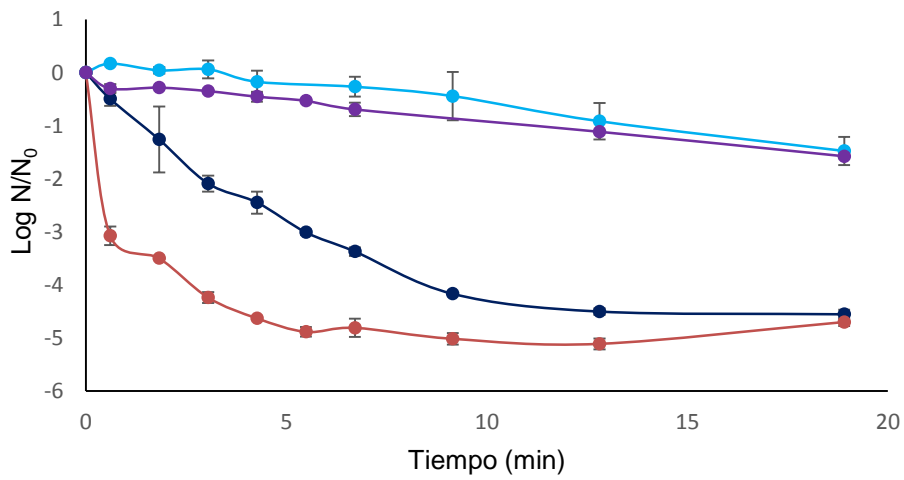


b)

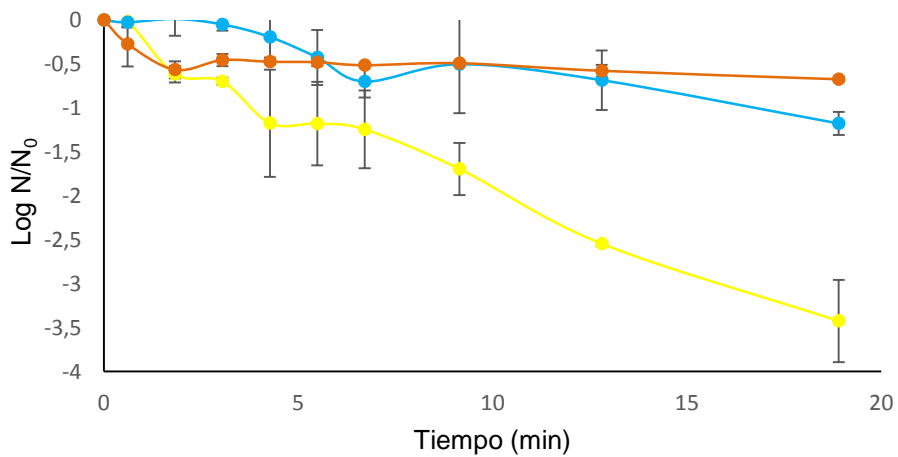




c)



d)



En términos generales, todas las curvas de inactivación presentaron concavidad hacia arriba, con algunas excepciones como *L. plantarum* y *S. cerevisiae* en jugo mix y

naranja-mandarina, y las esporas en jugo mix, las cuales mostraron concavidad hacia abajo con hombro. La presencia de hombro se asocia a la existencia de una interacción de daño-reparación de las células, la cual, según la teoría de golpes-múltiples, implica la necesidad de que varios fotones de luz UV-C alcancen a las células hasta lograr un daño que supere los mecanismos de recuperación del ADN. Es común ver este tipo de comportamiento en matrices líquidas complejas debido a la atenuación de la luz generada por la matriz, lo cual ralentiza el alcance de los fotones a las células, permitiendo la recuperación de las mismas (Gouma y col., 2015). Por otro lado, las colas observadas en las curvas de inactivación en las matrices menos complejas (agua peptonada y solución modelo) podrían atribuirse a la existencia de individuos más resistentes en la población microbiana, así como a la existencia de sólidos en suspensión que absorben la luz UV-C. García Carrillo y col. (2017) estudiaron la inactivación de *E. coli* ATCC 35218, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 49838 y *S. cerevisiae* KE 162 en jugo de naranja-zanahoria (pH: 3,8; 10,6 ° Brix) procesado en un reactor UV-C de capa delgada (1060 mJ/cm<sup>2</sup>), asistido o no por calor. En el caso de las experiencias a 20°C las autoras reportaron la presencia de hombro y la ausencia de cola, al igual que los resultados obtenidos para las matrices turbias en esta tesis. Pendyala y col. (2021) estudiaron la inactivación de inóculos de *E. coli* ATCC 25922, *S. Typhimurium* ATCC 13311, *L. monocytogenes* ATCC 19115 y de esporas de *B. cereus* ATCC 14579 en una solución modelo tratada por luz UV-C a escala piloto en un reactor de capa delgada (8,4 mJ/cm<sup>2</sup>). Estos autores encontraron que en flujo turbulento de trabajo ( $Re > 3960$ ) se alcanzaron más de 4 y 5 reducciones logarítmicas para las esporas y para las células vegetativas, respectivamente.

#### 4.15.2 Efectividad del tratamiento por luz UV-C asistida

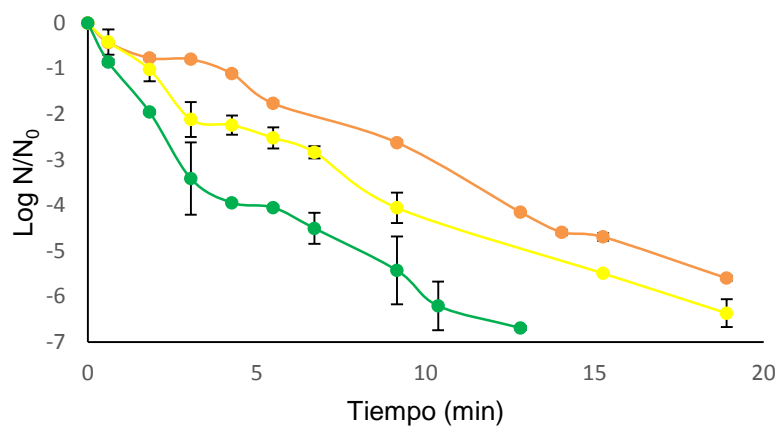
El procesamiento por luz UV-C asistida por calor moderado (UV-C/T, 50°C) aumentó la inactivación total de las poblaciones microbianas en todos los casos y además modificó notablemente el perfil de las curvas de inactivación. Para *S. cerevisiae* en jugo mix y de naranja-mandarina, se alcanzaron  $4,46 \pm 0,02$  y  $4,88 \pm 0,01$  reducciones logarítmicas, respectivamente (**Figura 4.24 c**). Esto implicó un aumento en la reducción de la población de 2,98 y 3,30 ciclos logarítmicos en cada caso, por lo que el efecto del tratamiento asistido fue sinérgico en comparación a los tratamientos simples. Vale la pena destacar que se evaluó el tratamiento térmico simple a 50°C para todos los inóculos, resultando en todos los casos en inactivaciones menores a un ciclo logarítmico (no se muestran datos).

En cuanto a las bacterias, se trabajó con jugo de naranja-mandarina y jugo mix, alcanzando  $5,59 \pm 0,46$  y  $6,37 \pm 0,31$  reducciones logarítmicas de *E. coli*, respectivamente, y  $5,20 \pm 0,12$  y  $6,27 \pm 0,58$ , de *L. plantarum*, respectivamente (**Figura 4.24 a y b**). Es decir que en estos casos se lograron inactivaciones altas y efectos sinérgicos al asistir el tratamiento UV-C con temperatura moderada en las matrices más complejas. En el jugo de pera se alcanzaron las mayores reducciones logarítmicas tanto para para el lactobacilo como para *E. coli*, ( $5,46 \pm 0,26$  y  $6,70 \pm 0,04$ , respectivamente) a pesar del menor tiempo de tratamiento aplicado (12 min) (**Figura 4.24 a y b**). En el caso del jugo de pera se redujo el tiempo de tratamiento cuando el mismo fue asistido para evitar el sobre tratamiento ya que, el tratamiento UV-C simple había logrado altas inactivaciones de ambas bacterias en esta matriz. De todos modos, el tratamiento asistido por calor tuvo un efecto aditivo y aumentó la inactivación en 1,1 y 1,2 ciclos logarítmicos para *L. plantarum* y *E.coli*, respectivamente.

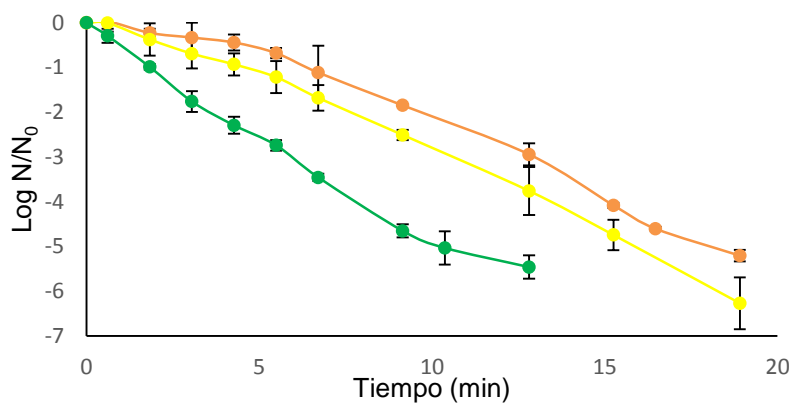
En cuanto a la forma de las curvas, se observó que en el caso de *L. plantarum* y *S. cerevisiae* en jugos turbios se presentó concavidad hacia abajo con presencia de hombro y desaparición de la cola observada en el caso del tratamiento por UV-C simple, reafirmando la eficacia del tratamiento propuesto. Mientras que las curvas de inactivación de *E. coli* y *L. plantarum* en jugo de pera, no presentaron hombro ni cola, asimilándose más a un comportamiento lineal. En todos los casos, la aplicación de calor moderado asistiendo al procesamiento UV-C, generó la desaparición de las colas en las curvas a tiempos mayores de tratamiento (**Figura 4.24**). Del mismo modo, otros autores, como García Carrillo y col. (2017) reportaron efectos aditivos en la inactivación de *S. cerevisiae* KE 162, *E. coli* ATCC 35218 y *P. fluorescens* ATCC 49838 en jugo de naranja-zanahoria procesado por luz UV-C ( $1060 \text{ mJ/cm}^2$ ) asistida por calor moderado ( $40\text{-}50^\circ\text{C}$ ), a escala laboratorio bajo régimen laminar.

**Figura 4.24.** Curvas de inactivación microbiana por luz UV-C asistida por calor moderado (UV-C/T) de a) *E. coli* ATCC 25922; b) *L. plantarum* ATCC 8014 y c) *S.cerevisiae* KE 162 jugo comercial de pera (—●—), jugo comercial mix (—●—) y jugo comercial de naranja-mandarina (—●—)

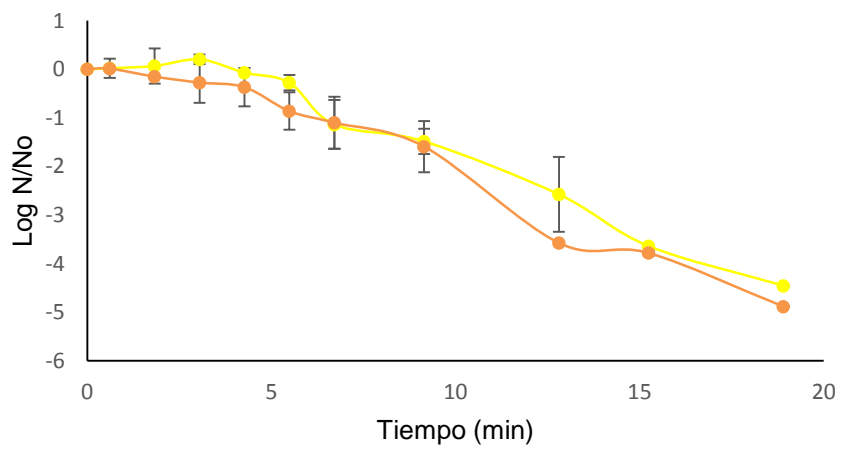
a)



b)



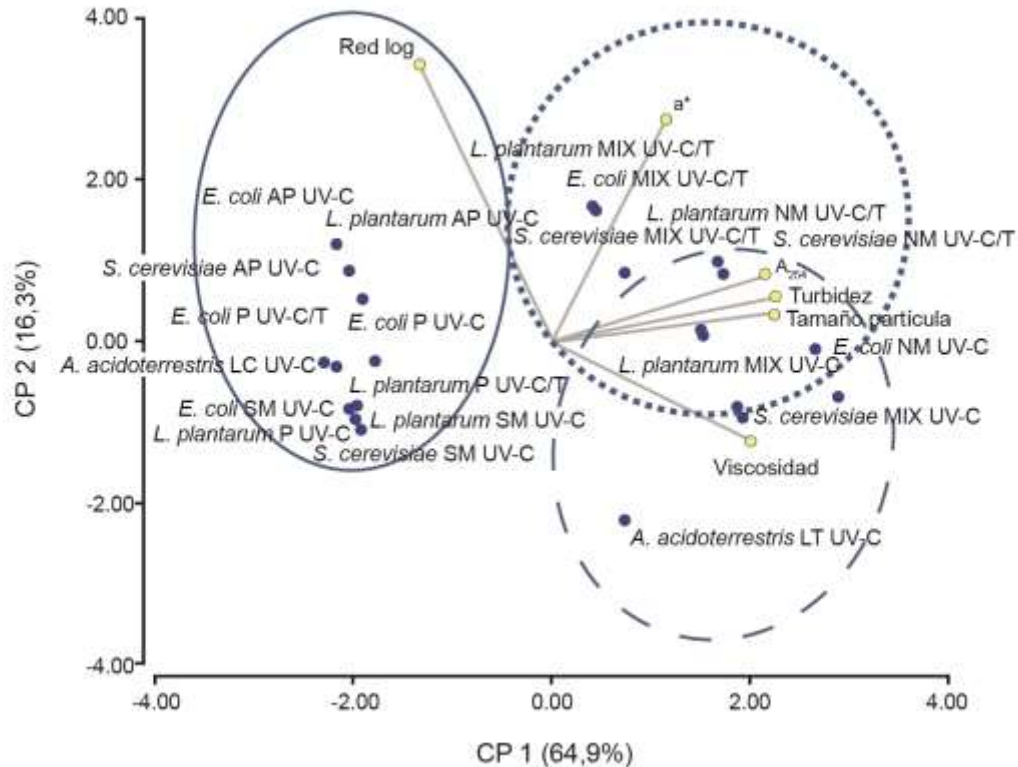
c)



#### 4.15.3 Influencia de las características físico químicas de la matriz en la inactivación microbiana

La **Figura 4.25** muestra el bi-plot obtenido del análisis de correspondencias asociando las reducciones logarítmicas obtenidas para cada microorganismo mediante el tratamiento UV-C simple y el combinado con temperatura (UV-C/T) en las distintas matrices, con determinadas características fisicoquímicas de interés de cada una de ellas. Las dos primeras componentes principales ( $CP_1$  y  $CP_2$ ) lograron explicar el 64,9% y el 16,3% de la varianza, respectivamente. El Coeficiente de Correlación Cofenética obtenido para el análisis fue de 0,961, indicando que se obtuvo una adecuada reducción de las variables empleadas para el análisis. La  $CP_1$  separó turbidez,  $A_{254nm}$ , tamaño de partícula, viscosidad y el parámetro  $a^*$  (asociadas positivamente), de las reducciones logarítmicas (asociadas negativamente). Los sistemas de jugos y matrices menos complejas (como el agua peptonada, solución modelo, jugo de limón claro y jugo de pera) se asociaron a mayores reducciones logarítmicas, mientras que aquellos en jugos complejos (naranja-mandarina, limón turbio y mix) por el contrario se encontraron menos asociados a este término. A la vez la  $CP_2$  separó los sistemas tratados por UV-C asistido por calor (UV-C/T), asociados positivamente, de aquellos tratados por UV-C simple, siendo los primeros los más asociados a las mayores reducciones logarítmicas. El inóculo de esporas de *A. acidoterrestis* en jugo de limón turbio fue el menos asociado a las reducciones logarítmicas, implicando que se trató del sistema de mayor complejidad.

**Figura 4.25.** Bi-plot de las dos primeras componentes principales ( $CP_1$  y  $CP_2$ ) obtenido del análisis de correspondencias asociando la turbidez, tamaño de partícula, viscosidad,  $A_{254nm}$ ,  $a^*$  y las reducciones logarítmicas, con cada sistema ensayado.



#### 4.16 Modelado matemático

La **Tabla 4.8** presenta los valores de los parámetros obtenidos a partir de los modelos matemáticos predictivos de Weibull, Coroller y bifásico con hombro, de las curvas de inactivación de *E.coli*, *L. plantarum* y *S. cerevisiae* en todas las matrices, tratados por UV-C simple y por UV-C/T. En todos los casos, el tratamiento simple de temperatura moderada (50°C) provocó una escasa inactivación (< 1 reducción logarítmica), por lo que las curvas correspondientes no se modelaron. Además la **Tabla 4.9** enumera los estadísticos relacionados a la distribución Weibulliana. Por último, la **Tabla 4.10** presenta los valores de RECM, AIC y BIC (ver *Sección 3.7*) a partir de los cuales se pudo comparar la adecuación de los tres modelos para predecir las respuestas de inactivación de los distintos tratamientos en cada matriz.

El modelo de Weibull fue apropiado para representar los datos, ya que exhibió altos valores de  $R^2_{adj}$  en todos los casos (0,91 a 0,99) indicando que entre el 91% y el 99% de las

variaciones en las respuestas de inactivación pudieron ser explicadas por el modelo (**Tabla 4.8**). En términos generales, las curvas de inactivación presentaron valores de  $n < 1$  (**Tabla 4.8**), lo cual era esperable al considerar la notoria concavidad hacia arriba de la mayoría de las curvas (**Figura 4.25**). Excepcionalmente, las curvas correspondientes a *L. plantarum* tratado tanto por UV-C simple como por UV-C/T en los jugos turbios (naranja-mandarina y mix) presentaron concavidad hacia abajo (**Figura 4.25 c, d**). Por lo tanto, los valores de  $n$  en estos últimos casos, resultaron  $> 1$  (**Tabla 4.8**), lo que indicó que una baja proporción de la población microbiana fue dañada a bajas dosis, mientras que una alta proporción resistente requirió mayores dosis para ser inactivada. Nicolau-Lapeña y col. (2022) modelaron las curvas de inactivación obtenidas al tratar inóculos de *E. coli*, *S. enterica* y *L. monocytogenes* en jugo y cáscara de manzana tratados por UV-C (10,7 kJ/cm<sup>2</sup>), y comprobaron su adecuación mediante los valores de  $R^2_{adj}$  y RECM. Los autores encontraron que el modelo ajustó adecuadamente a todos los casos ya que los valores de  $R^2_{adj}$  y de RECM variaron entre 0,87-0,99 y 0,13-0,39, respectivamente.

Adicionalmente, se utilizaron los valores de los parámetros  $b$  y  $n$  para calcular los estadísticos asociados a las distribuciones: moda, media, varianza y sesgo, mediante los cuales se pudo explicar en mayor medida el efecto de ambos tratamientos (UV-C y UV-C/T) en las distintas matrices (**Tabla 4.9**). Los valores de  $b$  y  $n$  también se utilizaron para obtener las distribuciones de frecuencia de resistencia (**Figura 4.26**). Todas las frecuencias correspondientes a inóculos de *E. coli* en todas las matrices, de *L. plantarum* en los sistemas claros, tratados por luz UV-C simple o asistida, y de *S. cerevisiae* en sistemas claros y en el jugo de naranja-mandarina tratado por UV-C/T, fueron sesgadas hacia la derecha y no presentaron moda (**Figura 4.26 a y b, Tabla 4.9**), sugiriendo que la mayor parte de la población fue inactivada a tiempos cortos de tratamiento. Las frecuencias correspondientes a *L. plantarum* en los jugos turbios (naranja-mandarina y mix) procesados por UV-C simple y UV-C/T, y *S. cerevisiae* en los mismos casos, excepto en jugo de naranja-mandarina tratado por UV-C/T, presentaron distribuciones muy anchas, con alta dispersión de tiempos de muerte, cola marcada, moda y altas medias y varianzas, indicando que una importante parte de población fue resistente al tratamiento y un proceso menos eficaz debido a una gran distribución de tiempos de muerte (**Figura 4.26 b y c, Tabla 4.9**).

El tratamiento simple de UV-C fue el más efectivo en inactivar los tres microorganismos en agua peptonada y solución modelo ya presentaron las menores medias ( $t_{cm} = 0,32-1,36$  min) y varianzas ( $\sigma_{tc}^2 = 2,64-349,9$  min<sup>2</sup>) y el mayor sesgo  $v_1 = 6,4-531,8$ ).

Valores intermedios de los estadísticos se determinaron para el jugo de pera ( $t_c=0,95-3,26$  min,  $\sigma_{t_c}^2= 1,8-14,14$  min<sup>2</sup>,  $v_1= 2,5-7,1$ ). Mientras que los mayores valores medias y varianza y menores de sesgo ( $t_c=2,41-16,55$  min,  $\sigma_{t_c}^2= 17,3-245,7$  min<sup>2</sup>,  $v_1=1,5-4,1$ ) se encontraron para las mezclas turbias (naranja-mandarina y mix) procesados por UV-C simple. La combinación del UV-C con calor moderado (UV-C/T), redujo la media y la varianza en las muestras turbias ( $t_c=1,74-6,29$ ,  $\sigma_{t_c}^2= 6,3-15,3$  min<sup>2</sup>) en comparación al tratamiento UV-C. *E. coli* fue la más sensible en todos los sistemas evaluados, ya que exhibieron menores medias ( $t_c= 0,32$  a  $3,53$  min), varianzas ( $\sigma_{t_c}^2=1,80-24,22$  min<sup>2</sup>) y mayores sesgos ( $v_1= 2,14-24,3$ ) que los de *L. plantarum* ( $t_c=0,35-9,08$  min,  $\sigma_{t_c}^2= 4,30 - 48,87$  min<sup>2</sup>,  $v_1= 1,53-59,16$  min<sup>2</sup>), siendo la *S. cerevisiae* el microorganismo más resistente ( $t_c= 0,66-16,55$  min,  $\sigma_{t_c}^2= 9,8-349,97$  min<sup>2</sup>,  $v_1= 1,5-531,8$  min<sup>2</sup>).

En cuanto al modelo de Coroller, el mismo caracterizó de forma adecuada los datos, alcanzando altos valores de  $R^2_{adj}$  0,94-0,99 (**Tabla 4.8**). En términos generales, el parámetro  $\alpha$  (la proporción logarítmica entre las subpoblaciones sensible y resistente) fue mayor a 1, indicando que la mayoría de la población fue sensible a tratamiento (**Tabla 4.8**). Los valores de  $\delta_1$  fueron de entre 0,59 y 7,41 min y 0,42 y 12,73 min para *E. coli* y *L. plantarum*, respectivamente. En el caso de *S. cerevisiae*, los valores de  $\delta_1$  variaron entre 0,16 y 15,26 min. Teniendo en cuenta las matrices, los menores valores de  $\delta_1$  correspondieron al agua peptonada (0,16-0,59 min), seguido por la solución modelo (1,38-3,62 min), el jugo de pera (2,48-8,05 min), y por último los jugos turbios (5,17-15,26 min). Por otro lado, el  $\delta_2$  varió mucho entre los sistemas y microorganismos evaluados ( $\delta_2=6,60 - 999,9$  min) (Tabla 4.9). Los altos valores de  $\delta_2$  (mayores al tiempo de tratamiento aplicado de 19 min) ( $p>0,05$ ) coincidieron con aquellas curvas de colas marcadas, enfatizando que la presencia de las mismas está relacionada a la presencia de miembros resistentes en la población microbiana.

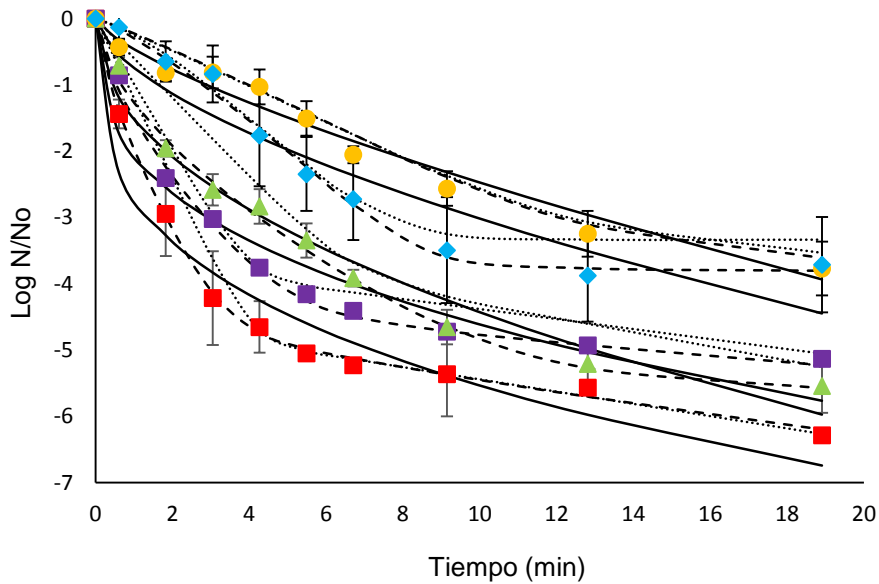
Por último, el modelo bifásico con hombro pudo describir adecuadamente todas las curvas, obteniendo valores de  $R^2_{adj}$  de entre 0,83 y 0,99 (**Tabla 4.8**). Aquellas curvas correspondientes a *L. plantarum* en los jugos turbios tratados por UV-C simple, presentaron un importante hombro ( $SL= 6,26$  a  $7,95$  min), indicando que las células microbianas debieron ser alcanzados por varios fotones de luz UV-C para ser inactivadas. El agua peptonada presentó los mayores valores de  $k_{sens}$  ( $1,01-11,75$  min<sup>-1</sup>), seguida por la solución modelos ( $0,44-0,77$  min<sup>-1</sup>), el jugo de pera ( $0,23-0,35$  min<sup>-1</sup>), y por último los jugos turbios ( $0,00-1,59$  min<sup>-1</sup>). La asistencia con calor moderado (UV-C/T) aumentó los valores de  $k_{sens}$



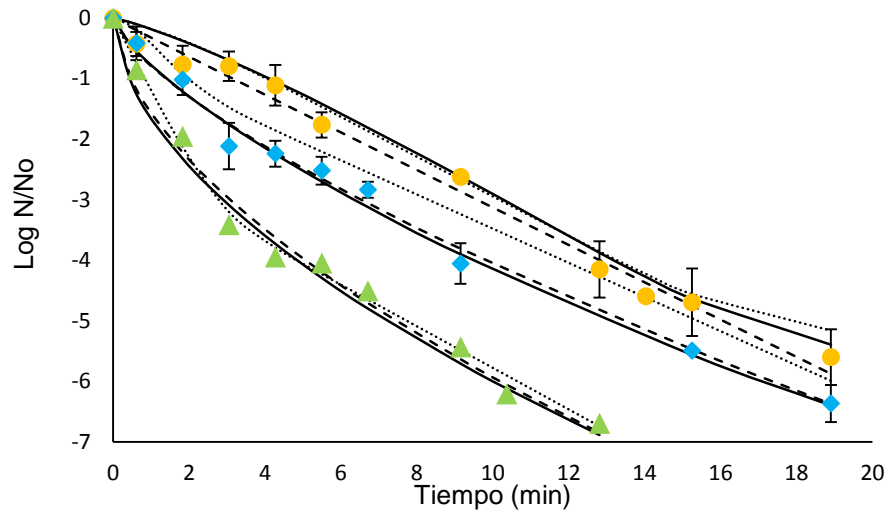
(0,31-1,97 min<sup>-1</sup>) en comparación a los del UV-C simple, por lo cual se pudo inferir que el tratamiento combinado fue más efectivo en inactivar los microorganismos.

**Figura 4.25.** Curvas de inactivación de *E. coli* ATCC 25922 (a,b), *L. plantarum* ATCC 8014 (c,d) y *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 (e,f) en agua peptonada (■), solución modelo (■), jugo de pera (▲), jugo de naranja-mandarina (●) y jugo mix (◆) procesados por luz UV-C simple (892 mJ/cm<sup>2</sup>) (a,c,e) o asistida por calor moderado (UV-C/T, 892 mJ/cm<sup>2</sup> 50 °C) (b,d,f). Datos experimentales (símbolo) y valores ajustados derivados de los modelos de Weibull (- - -), Coroller (—) y bifásico con hombro (.....).

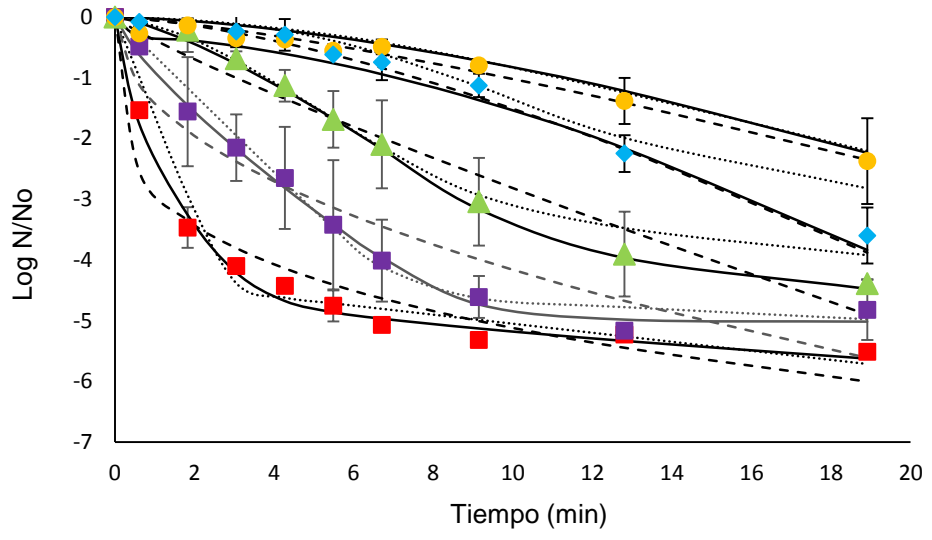
a)



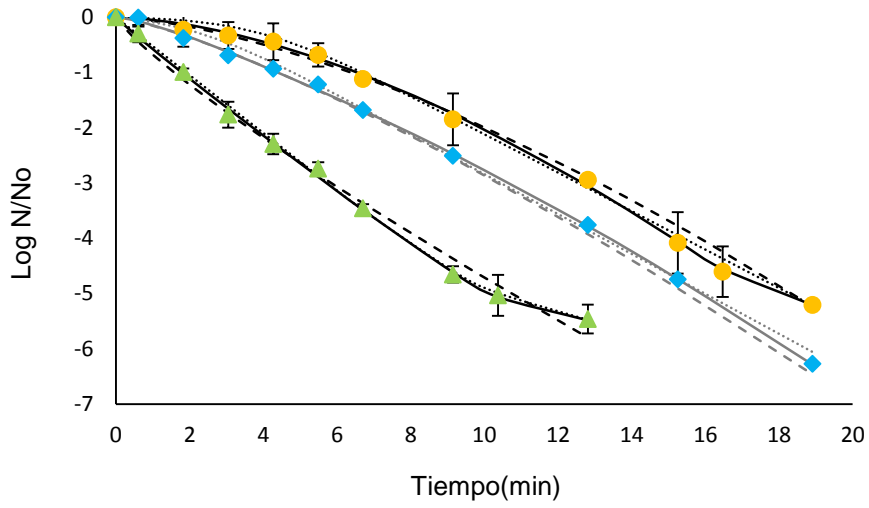
b)



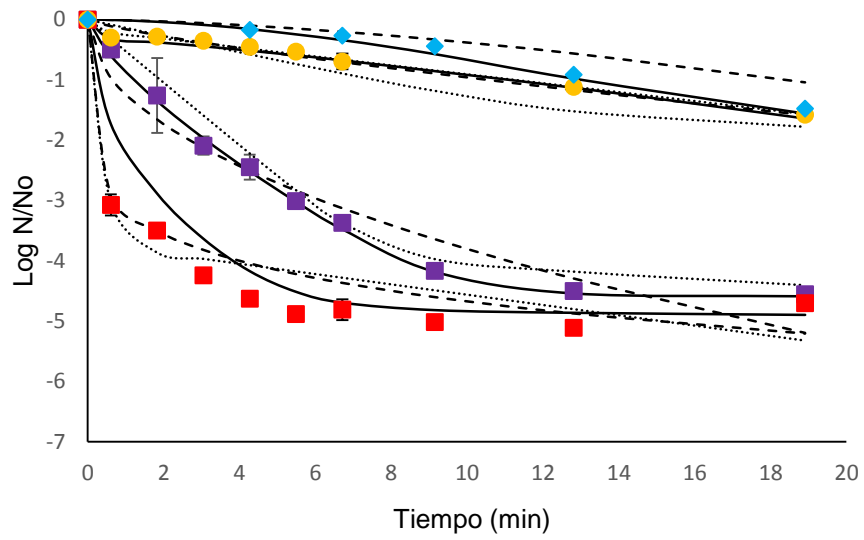
c)



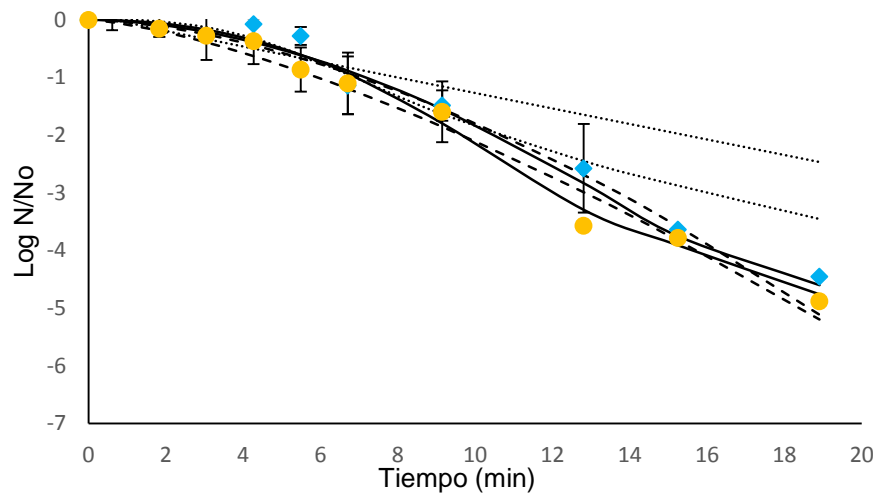
d)



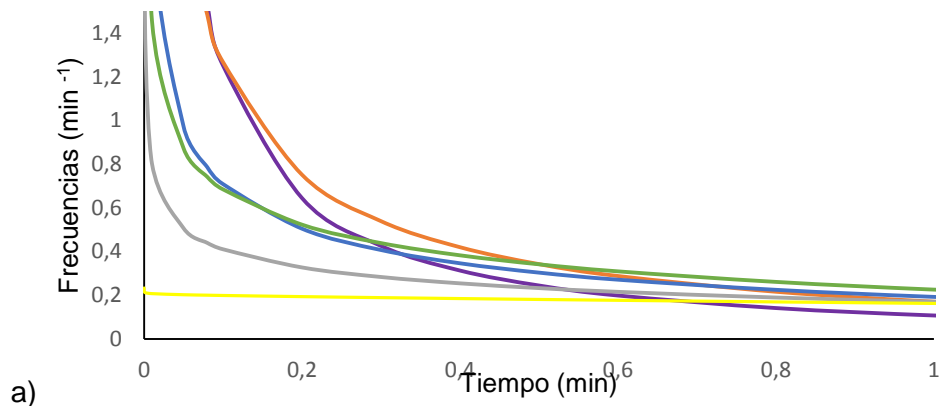
e)



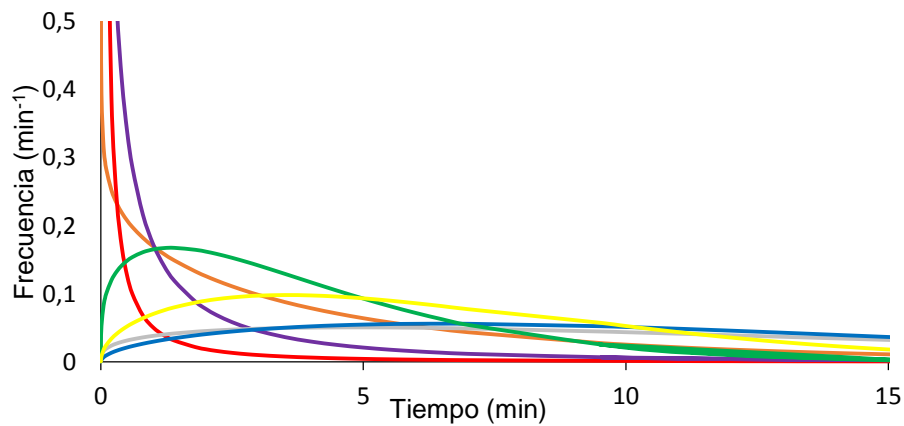
f)



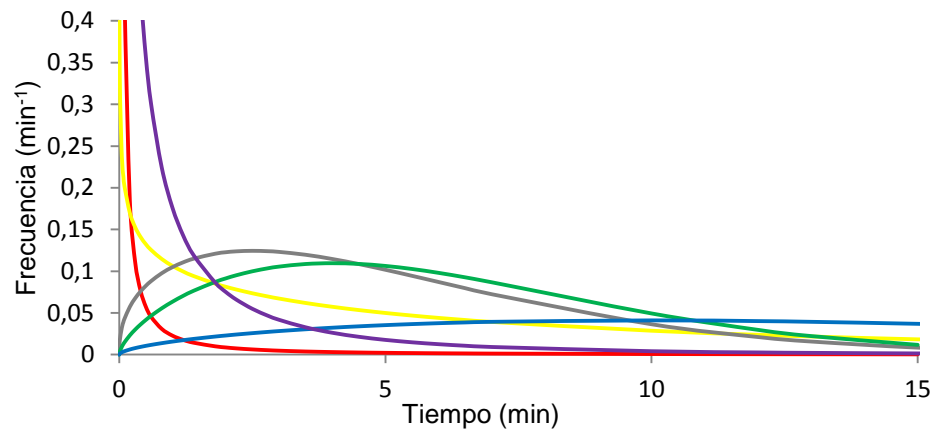
**Figura 4.26.** Distribución de las frecuencias de resistencias de Weibull correspondientes a la inactivación de a) *E. coli* ATCC 25922 (a), *L. plantarum* ATCC 8014 (b) y *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 (c) en agua peptonada (—), solución modelo (—), jugo de pera (—), jugo de naranja-mandarina (—) y jugo mix (—) procesados por luz UV-C simple (892 mJ/cm<sup>2</sup>) y jugo de naranja-mandarina (—) y jugo Mix (—) procesados por luz UV-C asistida (UV-C/T, 892 mJ/cm<sup>2</sup> 50 °C).



b)



c)



**Tabla 4.8.** Parámetros estimados por los modelos de Weibull, Coroller y bifásico con hombro para las curvas de inactivación de *E. coli* ATCC 25922, *L. plantarum* ATCC 8014 y *Saccharomyces cerevisiae* KE162 en agua peptonada (AP), solución modelo (SM), jugo de pera (P), jugo de naranja-mandarina (NM) y jugo mix, tratados por UV-C simple (892 mJ/cm<sup>2</sup>, 20°C) y UV-C/T (892 mJ/cm<sup>2</sup>, 50°C).

Matriz	Tratamiento	Inóculo	Weibull			Coroller				Bifásico con hombro					
			<i>b</i>	<i>n</i>	R <sup>2</sup> <sub>ad</sub> j	<i>α</i>	<i>δ</i> 1	<i>p</i>	<i>δ</i> 2	R <sup>2</sup> <sub>ad</sub> j	<i>f</i>	<i>kmax</i> <sub>1</sub>	<i>kmax</i> <sub>2</sub>	<i>SL</i>	R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>
AP	UV-C	<i>E. coli</i>	2,71 <sup>***</sup> (0,26)	0,31 <sup>***</sup> (0,04)	0,93	4,14 <sup>NS</sup> (++)	0,59 <sup>NS</sup> (2,72)	0,31 <sup>NS</sup> (0,44)	6,66 <sup>NS</sup> (++)	0,99	1,12 <sup>NS</sup> (NS)	2,67 <sup>NS</sup> (NS)	- 0,09 <sup>NS</sup> (NS)	0,43 <sup>NS</sup> (NS)	0,93
		<i>L. plantarum</i>	2,88 <sup>***</sup> (0,27)	0,25 <sup>***</sup> (0,04)	0,92	4,22 <sup>NS</sup> (++)	0,42 <sup>NS</sup> (3,89)	0,25 <sup>NS</sup> (0,58)	9,76 <sup>NS</sup> (++)	0,99	0,95 <sup>****</sup> (0,02)	1,01 <sup>**</sup> (0,23)	0,04 <sup>*</sup> (0,02)	-1,66 <sup>*</sup> (0,82)	0,95
		<i>S. cerevisiae</i>	3,16 <sup>***</sup> (0,27)	0,17 <sup>**</sup> (0,04)	0,96	4,83 <sup>NS</sup> (++)	0,16 <sup>NS</sup> (+)	0,17 <sup>NS</sup> (2,94)	6,60 <sup>NS</sup> (++)	0,98	0,99 <sup>NS</sup> (++)	11,75 <sup>NS</sup> (++)	0,09 <sup>*</sup> (0,04)	0,10 <sup>NS</sup> (++)	0,83
SM	UV-C	<i>E. coli</i>	2,06 <sup>****</sup> (0,24)	0,35 <sup>***</sup> (0,05)	0,92	4,43 <sup>NS</sup> (++)	1,38 <sup>NS</sup> (+)	0,35 <sup>NS</sup> (0,52)	11,5 <sup>SN</sup> (++)	0,99	0,96 <sup>****</sup> (0,01)	0,77 <sup>***</sup> (0,1)	0,04 <sup>*</sup> (0,01)	-1,36 (0,5)	0,98
		<i>L. plantarum</i>	1,41 <sup>***</sup> (0,24)	0,47 <sup>***</sup> (0,07)	0,91	5,56 <sup>NS</sup> (++)	2,82 <sup>NS</sup> (3,14)	0,47 <sup>NS</sup> (0,37)	421,95 <sup>NS</sup> (++)	0,99	1,00 <sup>****</sup> (0,002)	0,49 <sup>****</sup> (0,04)	-0,07 (0,03)	-1,69 (0,56)	0,98
		<i>S. cerevisiae</i>	1,23 <sup>***</sup> (0,17)	0,49 <sup>***</sup> (0,06)	0,94	5,56 <sup>NS</sup> (++)	3,6 <sup>NS</sup> (3,91)	0,49 <sup>NS</sup> (0,29)	997,6 <sup>NS</sup> (++)	0,99	0,98 <sup>***</sup> (0,01)	0,44 <sup>***</sup> (0,04)	-0,02 (0,03)	-1,86 <sup>*</sup> (1,85)	0,99
P	UV-C	<i>E. coli</i>	1,50 <sup>****</sup> (0,14)	0,47 <sup>****</sup> (0,04)	0,97	4,98 <sup>NS</sup> (++)	2,48 <sup>NS</sup> (2,93)	0,47 <sup>*</sup> (0,24)	25,47 <sup>NS</sup> (++)	0,99	0,99 <sup>****</sup> (0,02)	0,35 <sup>***</sup> (0,07)	- 0,02 <sup>NS</sup> (0,08)	- 4,95 <sup>**</sup> (2,01)	0,96
		<i>L. plantarum</i>	0,38 <sup>**</sup> (0,09)	0,87 <sup>****</sup> (0,1)	0,95	4,88 <sup>NS</sup> (++)	8,05 <sup>NS</sup> (6,85)	0,87 <sup>NS</sup> (0,50)	999,9 <sup>NS</sup> (++)	0,99	0,99 <sup>+</sup> (0,34)	0,23 <sup>***</sup> (0,04)	1,32 <sup>NS</sup> (+)	- 2,33 <sup>NS</sup> (3,02)	0,99
	UV-C/T	<i>E. coli</i>	1,56 <sup>****</sup> (0,13)	0,58 <sup>****</sup> (0,04)	0,98	2,48 <sup>NS</sup> (0,6)	0,95 <sup>NS</sup> (0,32)	1,11 <sup>NS</sup> (0,32)	3,42 <sup>NS</sup> (1,68)	0,98	0,93 <sup>****</sup> (0,05)	1,61 <sup>**</sup> (0,57)	0,34 <sup>***</sup> (0,04)	0,17 <sup>NS</sup> (0,44)	0,99
		<i>L. plantarum</i>	0,68 <sup>****</sup> (0,07)	0,84 <sup>****</sup> (0,04)	0,99	4,57 <sup>NS</sup> (++)	4,26 <sup>**</sup> (1,02)	0,84 <sup>**</sup> (0,19)	35,13 <sup>NS</sup> (++)	0,99	1,17 <sup>SN</sup> (++)	1,5 <sup>SN</sup> (++)	- 0,45 <sup>SN</sup> (++)	0,88 <sup>SN</sup> (++)	0,99
NM	UV-C	<i>E. coli</i>	0,46 <sup>***</sup> (0,07)	0,73 <sup>****</sup> (0,06)	0,97	0,84 <sup>NS</sup> (1,17)	6,42 <sup>NS</sup> (3,32)	1,01 <sup>*</sup> (0,34)	23,26 <sup>NS</sup> (+)	0,97	0,004 <sup>NS</sup> (0,01)	-0,8 <sup>NS</sup> (0,09)	0,26 <sup>**</sup> (0,01)	0,37 <sup>NS</sup> (0,35)	0,99
		<i>L. plantarum</i>	0,05 <sup>***</sup> (0,01)	1,31 <sup>****</sup> (0,1)	0,99	0,00 <sup>NS</sup> (0,40)	3,86 <sup>NS</sup> (1,97)	1,76 <sup>NS</sup> (0,55)	14,54 <sup>NS</sup> (2,14)	0,97	0,89 <sup>*</sup> (0,30)	0,20 <sup>**</sup> (0,04)	1,18 <sup>NS</sup> (++)	7,95 <sup>NS</sup> (4,10)	0,97
		<i>S. cerevisiae</i>	0,16 <sup>***</sup> (0,02)	0,78 <sup>***</sup> (0,06)	0,98	0,30 <sup>NS</sup> (0,05)	0,76 <sup>NS</sup> (0,04)	4,78 <sup>NS</sup> (0,51)	18,62 <sup>NS</sup> (0,13)	0,99	0,09 <sup>NS</sup> (0,08)	1,59 <sup>NS</sup> (3,37)	0,07 <sup>***</sup> (0,01)	0,01 <sup>NS</sup> (0,12)	0,98

UV-C/T	<i>E. coli</i>	0,32 *** (0,05)	0,99**** (0,05)	0,99	7,20 <sup>NS</sup> (++)	7,41 <sup>NS</sup> (+)	0,99 *** (0,22)	7,25 <sup>NS</sup> (++)	0,87	0,87 <sup>NS</sup> (0,5)	0,31 <sup>NS</sup> (0,03)	2,26 <sup>NS</sup> (+)	0,72 <sup>NS</sup> (3,08)	0,99
	<i>L. plantarum</i>	0,06 *** (0,01)	1,52 <sup>NS</sup> (0,06)	0,99	5,35 <sup>NS</sup> (++)	10,76 <sup>NS</sup> (1,08)	1,52 *** (0,20)	70,70 <sup>NS</sup> (++)	0,99	0,98 *** (0,04)	0,51 *** (0,06)	0,24 ** (0,12)	5,7 *** (0,67)	0,99
	<i>S. cerevisiae</i>	0,08 ** (0,02)	1,42 *** (0,11)	0,98	1,19 *** (0,43)	9,51 *** (0,89)	2,05 ** (0,38)	20 ** (5,34)	0,99	0,99 *** (0,01)	0,44 ** (0,09)	0,35 ** (0,07)	5,07 ** (0,56)	0,98
UV-C	<i>E. coli</i>	0,74 ** (0,19)	0,61 *** (0,11)	0,88	1,58 **** (0,15)	5,17 **** (0,21)	1,39 *** (0,15)	136,39 <sup>NS</sup> (++)	0,99	0,01 <sup>NS</sup> (0,03)	-0,09 <sup>NS</sup> (0,39)	0,46 <sup>NS</sup> (0,10)	-0,60 <sup>NS</sup> (0,64)	0,99
	<i>L. plantarum</i>	0,05 ** (0,01)	1,48 **** (0,07)	0,99	1,68 <sup>NS</sup> (9,22)	12,73 <sup>NS</sup> (5,56)	1,70 * (0,46)	78,08 <sup>NS</sup> (++)	0,98	0,92 *** (0,2)	0,28 <sup>NS</sup> (0,02)	1,71 <sup>NS</sup> (++)	6,26 <sup>NS</sup> (1,58)	0,99
	<i>S. cerevisiae</i>	0,01 ** (0,00)	1,58 *** (0,1)	0,98	0,42 <sup>NS</sup> (2,82)	15,26 <sup>NS</sup> (14,89)	1,08 * (2,16)	48,47 <sup>NS</sup> (++)	0,99	1,76 <sup>NS</sup> (0,06)	0,11 ** (0,02)	0,21 <sup>NS</sup> (0,19)	0,30 <sup>NS</sup> (0,16)	0,99
MIX	<i>E. coli</i>	0,79 <sup>NS</sup> (0,06)	0,71 **** (0,03)	0,99	1,78 <sup>NS</sup> (++)	4,46 <sup>NS</sup> (+)	0,72 * (0,26)	7,49 <sup>NS</sup> (++)	0,99	0,95 **** (0,08)	1,97 <sup>NS</sup> (1,08)	0,28 <sup>NS</sup> (0,02)	0,94 * (0,44)	0,99
	<i>L. plantarum</i>	0,15 **** (0,01)	1,28 **** (0,02)	0,99	1,43 <sup>NS</sup> (1,69)	8,77 **** (0,46)	1,29 **** (0,07)	2,40 <sup>NS</sup> (8,42)	0,99	0,25 <sup>NS</sup> (++)	1,56 <sup>NS</sup> (++)	1,93 <sup>NS</sup> (++)	0,46 <sup>NS</sup> (++)	0,99
	<i>S. cerevisiae</i>	0,04 * (0,02)	1,65 **** (0,19)	0,96	1,86 <sup>NS</sup> (2,02)	11,30 **** (1,19)	2,24 ** (0,53)	50,13 <sup>NS</sup> (++)	0,94	0,96 *** (0,08)	0,51 ** (0,1)	0,26 ** (0,06)	5,49 ** (1,02)	0,99

Los valores entre paréntesis representan el error estándar de cada parámetro. Los asteriscos representan la significancia: <sup>NS</sup> No-significativo; \*\*\* Significativo a nivel de 0,1% ; \*\* significativo a nivel de 1% \* significativo a nivel de 5%

**Tabla 4.9.** Estadísticos relacionados a las distribuciones de frecuencias de resistencias Weibullianas (moda,  $t_{cm}$ ; media,  $t_c$ ; varianza,  $\sigma_{tc2}$ ; y coeficiente de sesgo,  $v_1$ ) correspondientes a la inactivación de *E. coli* ATCC 25922, *L. plantarum* ATCC 8014 y *Saccharomyces cerevisiae* KE162 agua peptonada (AP), solución modelo (SM), jugo de pera (P), jugo de naranja mandarina (NM) y jugo mix (MIX) tratados por UV-C simple (UV-C) y por UV-C asistido por calor moderado de 50°C (UV-C/T).

Matriz	Tratamiento	Inóculo	$t_{cm}$ (min)	$\bar{t}_c$ (min)	$\sigma_{tc2}$ (min <sup>2</sup> )	$v_1$ (-)
AP	UV-C	<i>E. coli</i>	-	0,32	2,6	24,3
		<i>L. plantarum</i>	1,18	0,35	8,4	59,2
		<i>S. cerevisiae</i>	-	0,66	349,9	531,8
SM	UV-C	<i>E. coli</i>	-	0,64	6,4	15,9
		<i>L. plantarum</i>	-	1,09	7,1	7,1
		<i>S. cerevisiae</i>	-	1,36	9,8	6,4
P	UV-C	<i>E. coli</i>	-	0,95	5,4	7,1
		<i>L. plantarum</i>	-	3,26	14,1	2,5
	UV-C/T	<i>E. coli</i>	-	0,73	1,8	4,5
		<i>L. plantarum</i>	-	1,73	4,3	2,6
NM	UV-C	<i>E. coli</i>	-	3,53	24,2	3,1
		<i>L. plantarum</i>	3,28	9,08	48,9	1,7
		<i>S. cerevisiae</i>	-	12,07	245,7	2,8
	UV-C/T	<i>E. coli</i>	-	3,17	10,3	2,1
		<i>L. plantarum</i>	3,14	5,74	14,8	1,5
		<i>S. cerevisiae</i>	2,51	5,38	14,8	1,6
MIX	UV-C	<i>E. coli</i>	-	2,41	17,3	4,1
		<i>L. plantarum</i>	3,54	6,84	22,1	1,6
		<i>S. cerevisiae</i>	9,78	16,55	114,8	1,5
	UV-C/T	<i>E. coli</i>	-	1,74	6,3	3,2
		<i>L. plantarum</i>	1,34	4,08	10,3	1,7
		<i>S. cerevisiae</i>	3,99	6,29	15,3	1,5



**Tabla 4.10.** Mínimos valores de RCME, AIC y BIC para los modelos de Weibull, Coroller y bifásico con hombro para la inactivación de *E. coli* ATCC 25922, *L. plantarum* ATCC 8014 y *Saccharomyces cerevisiae* KE162 en agua peptonada (AP), solución modelo (SM), jugo de pera (P), jugo de naranja-mandarina (NM) y jugo mix (MIX) tratados por UV-C simple (UV-C) y por UV-C asistido por calor moderado, 50°C (UV-C/T).

Matriz	Tratamiento	Inóculo	RCME			AIC			BIC		
			Weibull	Coroller	Bifásico con hombro	Weibull	Coroller	Bifásico con hombro	Weibull	Coroller	Bifásico con hombro
AP	UV-C	<i>E. coli</i>	<b>0,49</b>	0,56	2,46	<b>17,69</b>	21,69	51,25	<b>18,60</b>	23,20	52,77
		<i>L. plantarum</i>	0,49	0,57	<b>0,17</b>	17,82	21,82	<b>-0,49</b>	18,73	23,33	<b>1,03</b>
		<i>S.cerevisiae</i>	<b>0,36</b>	0,42	0,57	<b>12,08</b>	16,08	22,24	<b>12,98</b>	17,59	23,75
SM	UV-C	<i>E. coli</i>	0,46	0,54	<b>0,10</b>	16,69	20,74	<b>-11,38</b>	17,60	22,25	<b>-9,87</b>
		<i>L. plantarum</i>	0,53	0,61	<b>0,10</b>	19,33	23,33	<b>-11,34</b>	20,24	24,84	<b>-9,82</b>
		<i>S.cerevisiae</i>	0,39	0,45	<b>0,10</b>	13,20	17,19	<b>-17,53</b>	14,10	18,71	<b>-16,02</b>
P	UV-C	<i>E. coli</i>	0,30	0,35	<b>0,14</b>	8,00	11,99	<b>-7,00</b>	8,90	13,25	<b>-5,48</b>
		<i>L. plantarum</i>	<b>0,36</b>	0,41	0,41	<b>11,59</b>	15,58	15,73	<b>12,50</b>	17,09	17,24
	UV-C/T	<i>E. coli</i>	0,26	<b>0,13</b>	0,22	6,23	12,79	<b>3,63</b>	7,13	14,30	<b>5,14</b>
		<i>L. plantarum</i>	<b>0,20</b>	0,22	2,40	<b>1,07</b>	2,89	50,77	<b>-0,17</b>	4,41	52,28

<b>NM</b>	UV-C	<i>E. coli</i>	0,22	0,22	<b>0,17</b>	1,58	2,26	<b>-1,80</b>	2,49	3,77	<b>-0,29</b>
		<i>L. plantarum</i>	0,10	0,10	<b>0,10</b>	-10,31	2,23	<b>-13,09</b>	-9,40	4,41	<b>-11,58</b>
		<i>S.cerevisiae</i>	0,10	<b>0,03</b>	0,10	-16,18	12,69	<b>-17,13</b>	-15,59	14,29	<b>-16,14</b>
	UV-C/T	<i>E. coli</i>	<b>0,20</b>	0,22	0,22	<b>-0,09</b>	3,91	3,19	<b>1,11</b>	5,90	5,18
		<i>L. plantarum</i>	<b>0,14</b>	0,14	2,26	<b>-11,01</b>	-7,02	58,74	<b>-9,59</b>	-4,60	61,16
		<i>S.cerevisiae</i>	0,30	<b>0,20</b>	0,20	5,01	<b>0,37</b>	1,24	6,21	<b>2,36</b>	3,23
<b>MIX</b>	UV-C	<i>E. coli</i>	0,50	<b>0,14</b>	0,32	18,39	<b>-5,90</b>	10,22	19,29	<b>-4,38</b>	11,73
		<i>L. plantarum</i>	0,30	0,30	<b>0,30</b>	-11,13	-9,67	<b>-21,34</b>	-10,23	-8,16	<b>-18,14</b>
		<i>S. cerevisiae</i>	<b>0,07</b>	0,26	0,05	<b>-22,29</b>	-18,29	-22,25	<b>-21,70</b>	-17,30	-21,26
	UV-C/T	<i>E. coli</i>	<b>0,20</b>	0,22	0,26	<b>-0,07</b>	3,86	6,39	<b>0,84</b>	5,37	7,90
		<i>L. plantarum</i>	0,05	<b>0,01</b>	2,49	<b>-30,23</b>	-27,92	56,29	<b>-29,04</b>	-25,93	58,28
		<i>S.cerevisiae</i>	0,33	0,26	<b>0,22</b>	11,01	6,62	<b>3,00</b>	12,20	8,61	<b>4,99</b>

Los valores de RMSE, AIC o BIC en negrita representan los menores valores de la fila para la comparación entre modelos.

## 4.17 Estudios de calidad fisicoquímica

### 4.17.1 Jugo comercial diluido de naranja-mandarina

Se midieron diversos parámetros de calidad fisicoquímica (contenido de polifenoles totales, capacidad antirradicalaria por los métodos de ABTS y DPPH, contenido de flavonoides, color, turbidez y °Brix) del jugo comercial diluido tratado por luz UV-C asistida, UV-C/T y al jugo comercial control sin tratamiento, según lo detallado previamente en la *Sección 3.16*. De este modo, se pudo conocer la calidad del jugo propuesto y además determinar si el tratamiento por UV-C/T generó algún perjuicio a la calidad del mismo. Una vez realizadas estas mediciones en el jugo industrial para corroborar que el tratamiento propuesto no perjudicó la calidad del jugo, se procedió a realizarlos en el jugo natural exprimido tratado por UV-C/T y su control sin tratamiento. Todos los parámetros de calidad se midieron a lo largo de 20 días de almacenamiento en frío ( $5 \pm 1$  °C).

En cuanto al color, no hubo cambios significativos ( $p < 0.05$ ) entre la muestra tratada ( $L^*: 42,9 \pm 0,5$ ;  $a^*:-2,4 \pm 0,3$ ;  $b^*: 39,9 \pm 3,8$ ) y el control sin tratamiento ( $L^*: 43,2 \pm 0,25$ ;  $a^*:-2,5 \pm 0,1$ ;  $b^*: 40,8 \pm 0,6$ ), por lo tanto el tratamiento UV-C/T no afectó el color del jugo (**Figura 4.27 g,h,i**). De todos modos, al graficar las coordenadas obtenidas sobre el diagrama de cromaticidades CIE x-y (**Figura 4.28**) se pudo observar que la muestra de jugo industrial tratado difiere levemente del mismo jugo sin tratar ya que los puntos no se solapan. En la lengua de color también se pudo ver que no hubo prácticamente cambios de color a lo largo del almacenamiento ya que la mayoría de los puntos de cada muestra se solaparon (**Figura 4.28**).

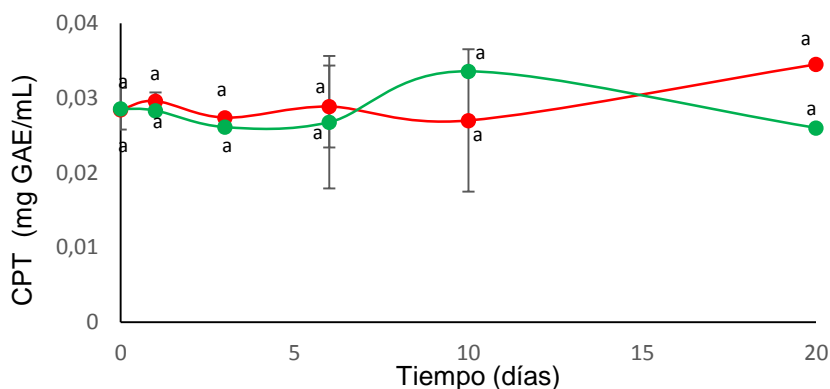
No se observaron cambios en los °Brix y turbidez luego del tratamiento aplicado, siendo los valores para el control de  $12,3 \pm 0,3$ °Brix y 3533 NTU, y para UV-C/T de  $13,3 \pm 0,1$ °Brix y 3967 NTU, respectivamente (**Figura 4.27 d,e**). No se observaron cambios significativos en ninguno de los parámetros previamente mencionados, a lo largo de 20 días de almacenamiento en frío. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre el contenido de polifenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante medida por el método de DPPH, entre las muestras siendo los valores de  $0,028 \pm 0,000$  y  $0,029 \pm 0,002$ ;  $0,099 \pm 0,000$  y  $0,109 \pm 0,005$ ;  $3,9 \pm 0,2$  y  $3,5 \pm 0,6$ , para C y UV-C/T, respectivamente (**Figura 4.28 a,b,c,d**). Todas las determinaciones se mantuvieron sin cambios significativos a lo largo de los 20 días de almacenamiento en frío. En el caso de la actividad

antirradicalaria mediada por el método de ABTS, la misma no presentó diferencias significativas entre las muestras inmediatamente después del tratamiento, pero la muestra UV-C/T presentó una capacidad antioxidante menor que el control a lo largo del almacenamiento,

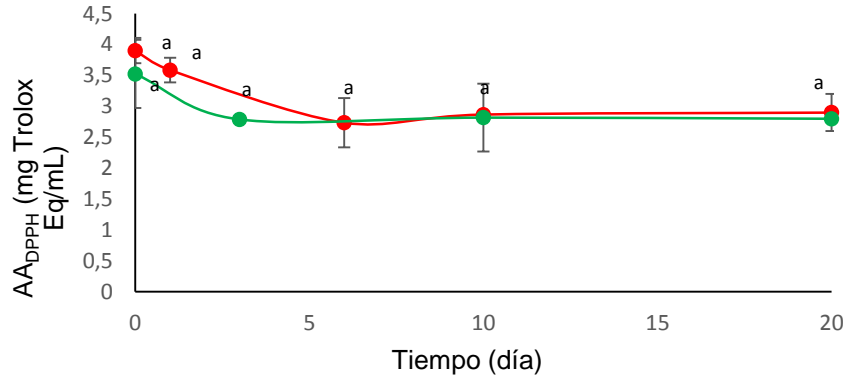
La Cava y Sgroppo (2019) evaluaron la calidad de un jugo de uva (pH= 3,12; °Brix= 9,6; 2500 NTU, Coeficiente de absorción= 42,9 cm<sup>-1</sup>) tratado por UV-C (39,6 J/L) asistido por calor moderado (65 ± 3 °C) a lo largo de 28 días de almacenamiento en frío (4°C). Los autores determinaron una reducción en el contenido de ácido ascórbico (74%) y de polifenoles totales (14%), lo cual generó una pérdida significativa de la capacidad antioxidante (DPPH• = 19% y ABTS•+ = 16%). A la vez, tanto los niveles de ácido ascórbico como la actividad antioxidante, disminuyeron gradualmente a lo largo del almacenamiento.

**Figura 4.27.** Contenido de polifenoles totales (a), actividad antioxidante por los métodos de DPPH (b) y ABTS (c), contenido de flavonoides (d), turbidez (e), °Brix (f) y parámetros de color del espacio CIELAB L\* a\* b\* (g,h,i) a lo largo de 20 días de almacenamiento en frío (5°C) del jugo comercial control si tratar (—●—) y el jugo comercial tratado por UV-C/T (—●—)

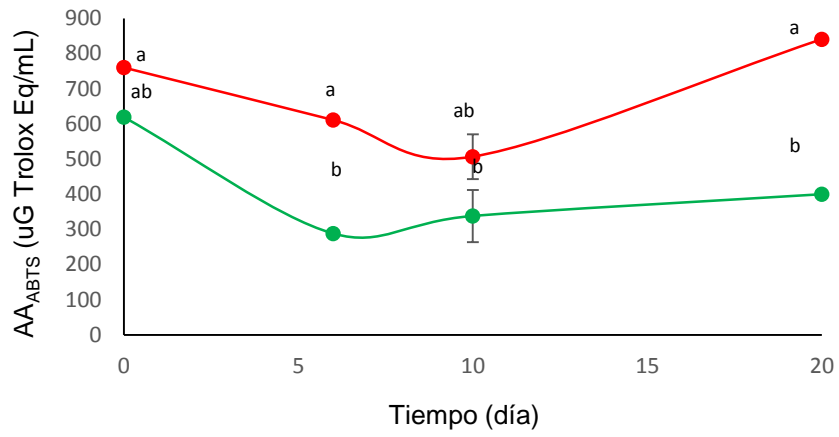
a)



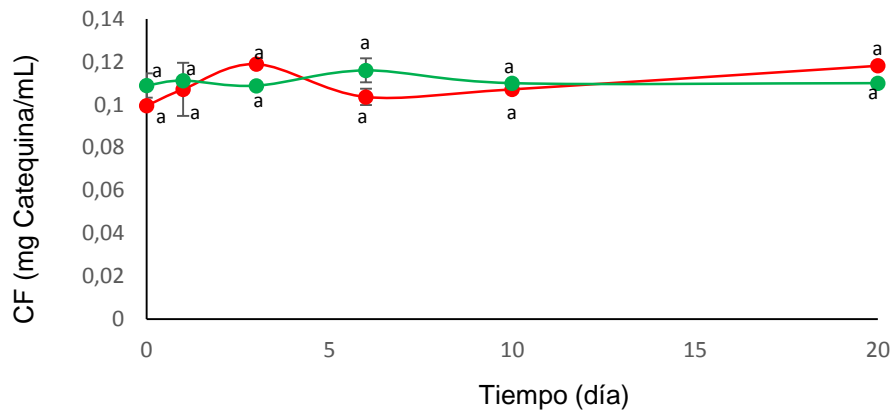
b)



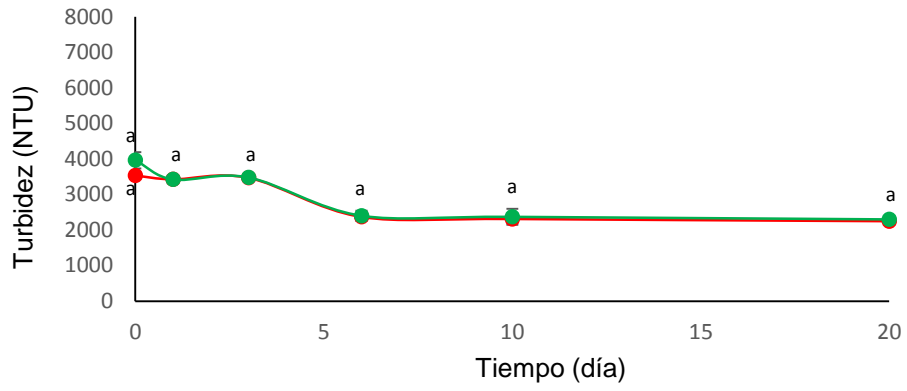
c)



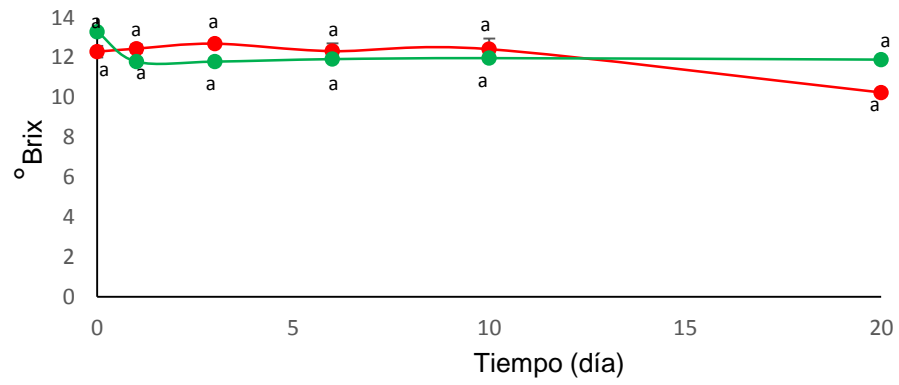
d)



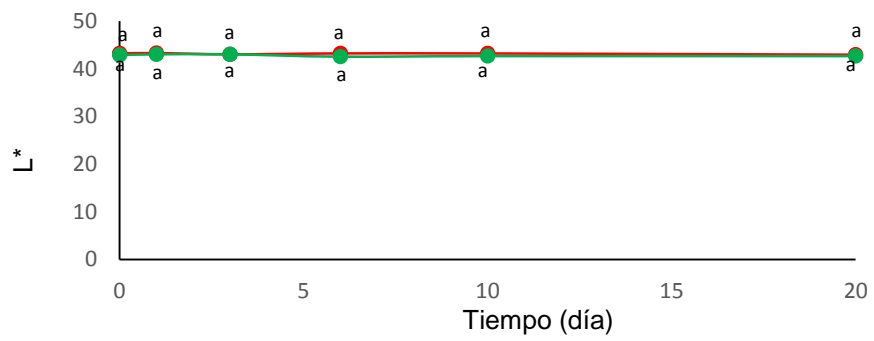
e)



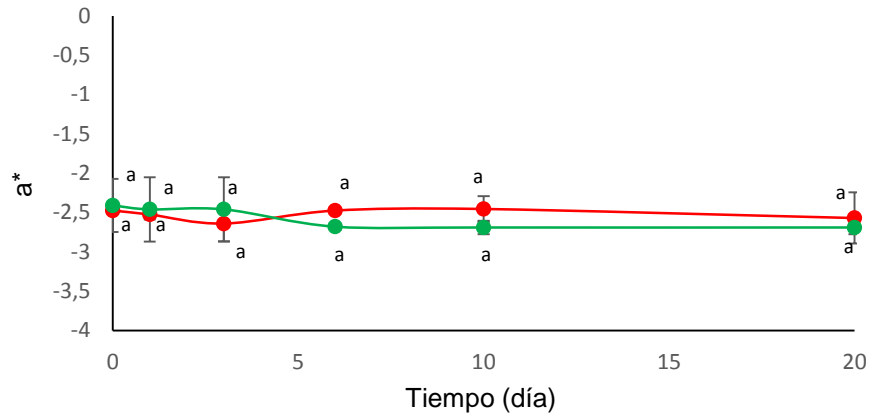
f)



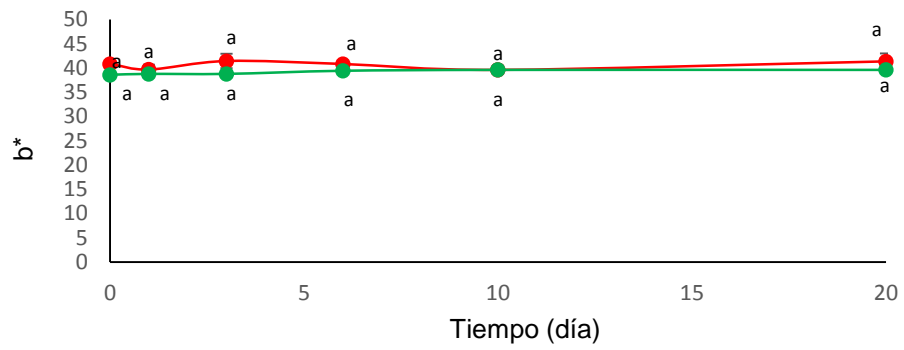
g)



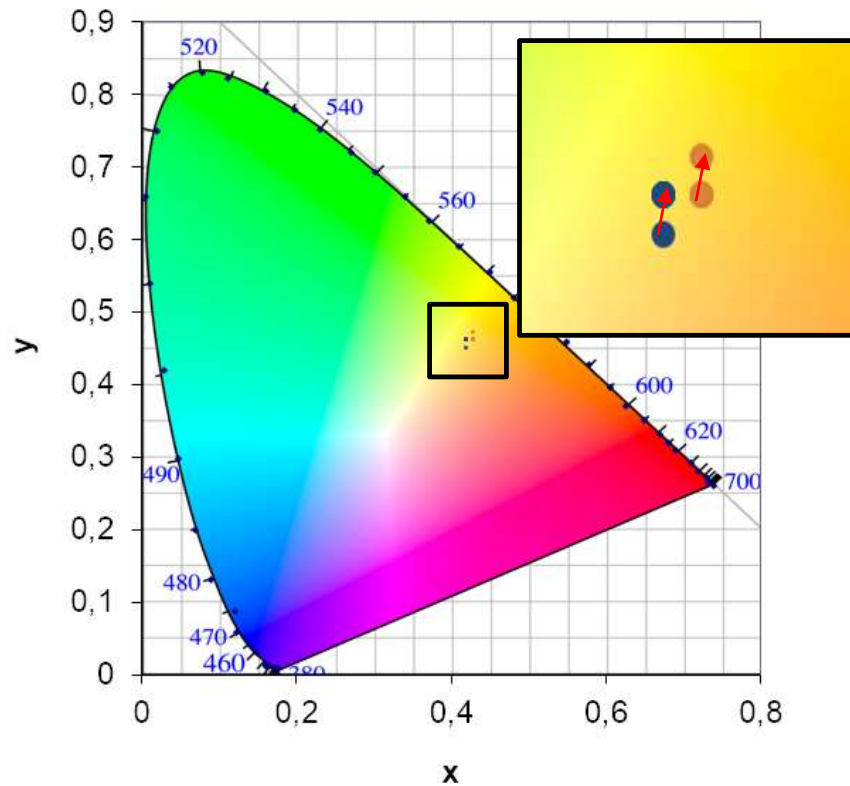
h)



i)



**Figura 4.28.** Evolución del color del jugo comercial control (●) y el jugo comercial tratado por UV-C/50 (●) sobre el diagrama de cromaticidades CIE x-y.



#### 4.17.2 Jugo natural exprimido

Una vez que se comprobó mediante los estudios de calidad preliminares realizados sobre jugo comercial de naranja-mandarina que los parámetros de calidad no se veían afectados por el tratamiento propuesto, se procedió a realizar los mismos sobre jugo natural exprimido.

La **Figura 4.29** presenta los valores de los distintos parámetros de calidad medidos en el jugo exprimido natural control sin procesar (C-natural), el jugo natural tratado por UV-C/T (UV-C/T-natural) y con fines comparativos se incluyó el jugo comercial tratado térmicamente en un sistema coil tal como se describe en la *Sección 3.16* (T-comercial, 80 °C-6 min).

En cuanto al contenido de polifenoles totales y flavonoides, el jugo T-comercial fue la muestra que menores valores presentó. Por otro lado, existió una disminución significativa en el contenido de polifenoles y flavonoides luego del tratamiento UV-C/T en el jugo natural siendo el CPT=  $1,61 \pm 0,01$  mg GAE/mL y CF= $0,16 \pm 0,00$  mg Catequina/mL para C-natural y CPT= $0,74 \pm 0,05$  mg GAE/mL y CF= $0,13 \pm 0,00$  mg Catequina/mL,



respectivamente. Estos resultados implicaron una pérdida del 55% del CPT y del 18,8% de CF del jugo natural exprimido luego del tratamiento UV-C/T (**Figura 4.29 a, d**).

La actividad antirradicalaria tanto por el método de DPPH como el de ABTS, fue significativamente diferente entre las 3 muestras. El jugo UV-C/T-natural fue el que menor actividad antirradicalaria presentó ( $AA_{DPPH} = 1,34 \pm 0,13$  mg/mL,  $AA_{ABTS} = 4,19 \pm 0,50$  mg/mL), implicando que el tratamiento por UV-C asistido disminuyó este parámetro ya que el C-natural presentó mayores valores del mismo ( $AA_{DPPH} = 7,90 \pm 0,02$  mg/mL,  $AA_{ABTS} = 17,88 \pm 0,08$  mg/mL). Por su parte, se obtuvieron valores intermedios de actividad antioxidante por el método de DPPH ( $3,26 \pm 0,25$  mg/mL) y de ABTS ( $7,09 \pm 0,13$  mg/mL) para el jugo T-industrial (**Figura 4.29 b,c**).

El jugo C-natural presentó el mayor contenido de vitamina C ( $90,42 \pm 4,12$  mg ac. ascórbico/100 mL), sin diferir significativamente del jugo T-comercial ( $84,92 \pm 3,64$  mg Ac. Ascórbico/100 mL). Por último, el jugo UV-C/T-natural presentó un contenido menor de vitamina C ( $71,84 \pm 2,60$  mg ac. ascórbico/100 mL), siendo esta diferencia significativa respecto a los otros dos jugos y representando la pérdida de un 20% de su contenido, por lo que se infiere que el tratamiento UV-C/T degradó a la vitamina C (**Figura 4.29 e**). Otros autores han evaluado los efectos de la luz UV-C asistida por calor moderado en la calidad de jugos frutales. Por ejemplo, Pagal y Gabriel (2020) estudiaron el contenido de ácido ascórbico en una muestra de jugo de naranja tratada por luz UV-C asistida por calor moderado (1,44 mW/cm; 53°C: 10,3 min) en modo estanco. Los autores concluyeron que el tratamiento evaluado disminuyó de manera significativa el contenido de ácido ascórbico en la muestra, representando un 7% de caída respecto del contenido inicial. Gayán y col. (2012) estudiaron el efecto de un tratamiento de luz UV-C asistida por calor (27,1 mJ/L, 55°C) en un reactor continuo de capa delgada, y también hallaron que el tratamiento disminuyó el contenido de ácido ascórbico en la muestra en un 17% respecto del control sin tratar. Por otro lado, Pala y Toklucu (2013) estudiaron el efecto de un tratamiento UV-C simple realizado en un reactor de tubo coil, rodeado por 9 lámparas (0,02 L/s; 48.12 kJ/L) sobre la calidad de un jugo de naranja, y determinaron una pérdida significativa en el contenido de ácido ascórbico de 9,25% luego del tratamiento UV-C.

Adicionalmente, se determinó la formación de hidroximetilfurfural (HMF) ya que es un compuesto definido como posible precursor carcinogénico que esta naturalmente en muchos alimentos en bajísima proporción, pero puede generarse al exponer a altas temperaturas ciertos azúcares (por ejemplo, fructosa) encontrándose, en general, en los productos tratados térmicamente en baja proporción (hasta 100 ppb). En este caso el jugo

T-comercial presentó significativamente mayores valores de HMF ( $21,52 \pm 0,00$  mg/L) que UV-C/T-natural ( $19,98 \pm 0,03$  mg/L) y C-natural ( $19,22 \pm 0,22$  mg/L) (**Figura 4.29 f**). Este resultado está en concordancia con aquellos obtenidos por Gök (2021), quien estudió la formación de HMF en un jugo de naranja tratado por luz UV-C ( $68,75$  mJ/cm<sup>2</sup>) en un reactor de flujo Dean. La autora encontró que antes del tratamiento UV-C el jugo contenía  $196 \pm 1,5$  mg/L de HMF, mientras que luego de ser tratado este contenido no sólo no aumentó sino que disminuyó significativamente a  $175 \pm 1,5$  mg/L, por lo cual concluyó que el tratamiento por luz UV-C no fue responsable de formar HMF en el producto.

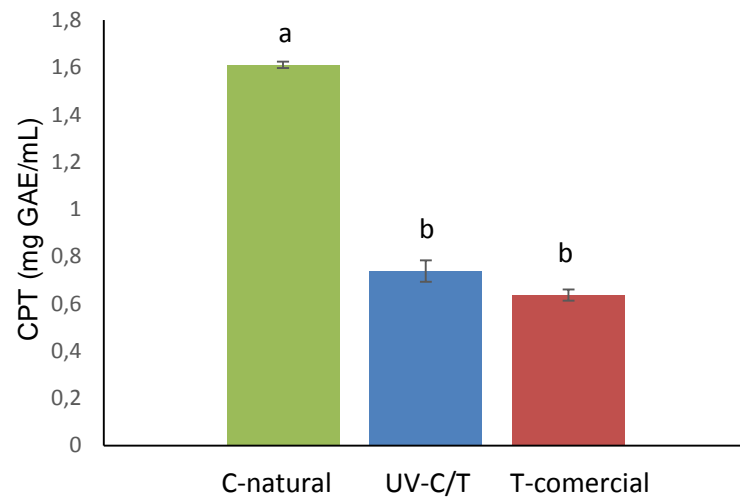
Respecto a la actividad enzimática, el jugo T-comercial presentó prácticamente actividad nula de las tres enzimas estudiadas (**Figura 4.29 g,h,i**). Para este jugo, sólo la actividad de la enzima PME fue detectable con un valor de  $0,50 \pm 0,03$  U/mL. El jugo C-natural presentó los mayores valores de actividad enzimática para las tres enzimas siendo de  $1,46 \pm 0,08$  U/mL,  $0,40 \pm 0,00$  U/mL y  $0,25 \pm 0,07$  U/mL para la PME, PPO y POD, respectivamente. El tratamiento UV-C/T logró un 16,44% de inactivación de la PME, 80% de la PPO y 100% de la POD ya que la muestra UV-C/T-natural presentó valores de  $1,22 \pm 0,08$  U/mL,  $0,08 \pm 0,00$  U/mL y  $0,00 \pm 0,00$  U/mL, para cada una de las enzimas, respectivamente. Gouma y col. (2020) evaluaron la inactivación de las enzimas PME y PPO en un jugo natural de zanahoria tratado por luz UV-C asistida por calor moderado ( $3,92$  J/mL;  $3,6$  min,  $60$  °C) en un reactor continuo de capa delgada. Los autores encontraron que el tratamiento propuesto redujo en un 69,3 % y 51,3 % la actividad de la enzima PME y PPO, respectivamente. De modo similar, Gayán y col. (2012) determinaron la inactivación en 63,96% de la actividad la enzima PME en un jugo de naranja tratado por luz UV-C asistida por calor ( $27,1$  mJ/L,  $55$ °C) en un reactor continuo de capa delgada. Por último, Sampedro y Fan (2014), estudiaron a cinética de inactivación de las enzimas POD y PPO, en soluciones de enzimas expuestas a un tratamiento estanco, con agitación, de luz UV-C asistida por calor ( $58,2$  mJ/cm<sup>2</sup>,  $65$ °C). Los autores lograron inactivar completamente a las enzimas POD y PPO luego de 2,5 min y 7,5 min de tratamiento; respectivamente.

Por último, el diagrama de cromaticidades evidenció que no hubo cambios importantes del color del jugo a lo largo del almacenamiento ya que la mayoría de los puntos de cada muestra se superpusieron indicando que se mantuvo prácticamente igual a luego del tratamiento y a lo largo del almacenamiento (**Figura 4.30**). En concordancia con este resultado, Ferrario y col. (2018) no observaron un cambio significativo en el color de un jugo blend de zanahoria-naranja inmediatamente después del tratamiento por luz UV-C

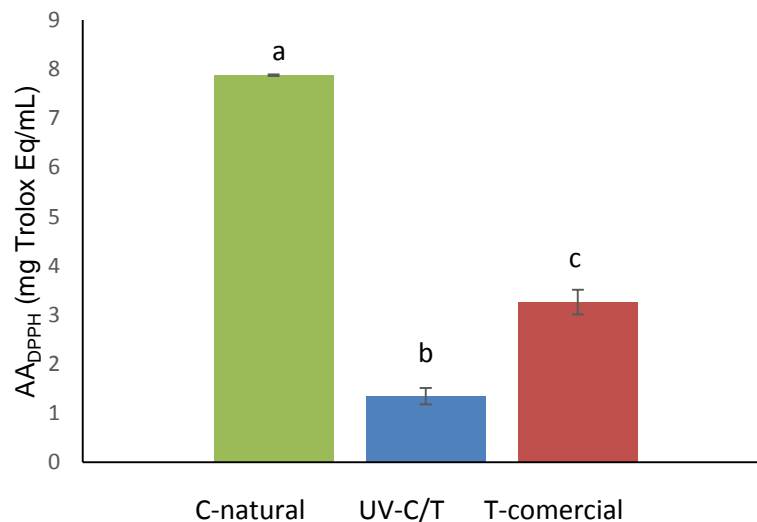
asistida por calor (10,6 mJ/cm<sup>2</sup>, 15 min, 50 °C) en un reactor continuo de capa delgada, ni durante 24 días de almacenamiento en frío (4 °C).

**Figura 4.29.** Contenido de polifenoles totales (a), actividad antioxidante por los métodos de DPPH (b) y ABTS (c), contenido de flavonoides (d), contenido de vitamina C (e), contenido de HMF (f) y actividad de las enzimas PME (g), PPO (h) y POD (i) del jugo exprimido natural sin tratar (C-natural) (■) o tratado por UV-C/T (UV-C/T-natural) (■) , y del jugo comercial tratado por T-coil (T-comercial) (■).

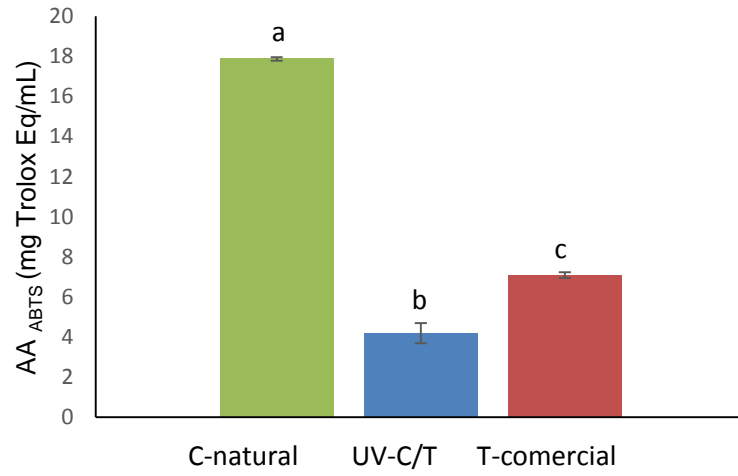
a)



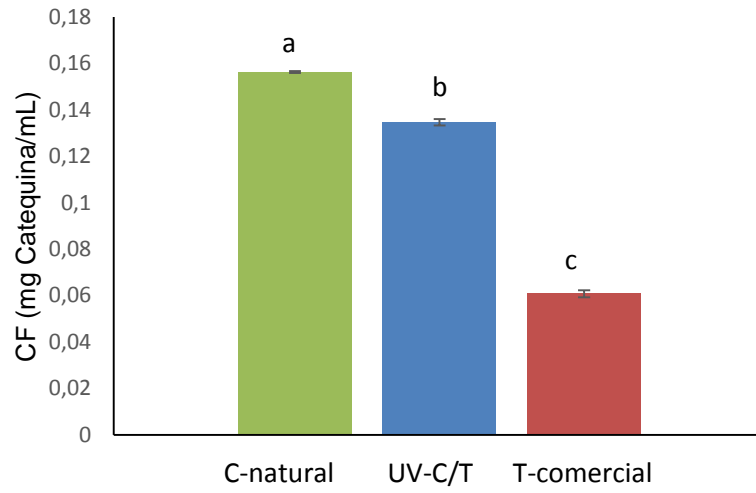
b)



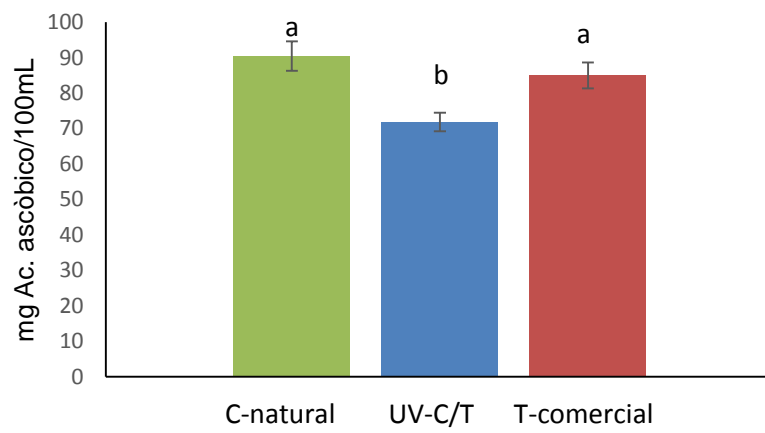
c)



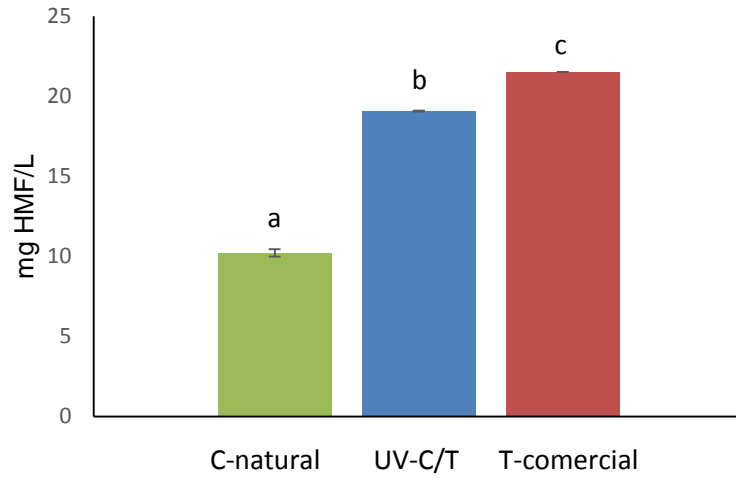
d)



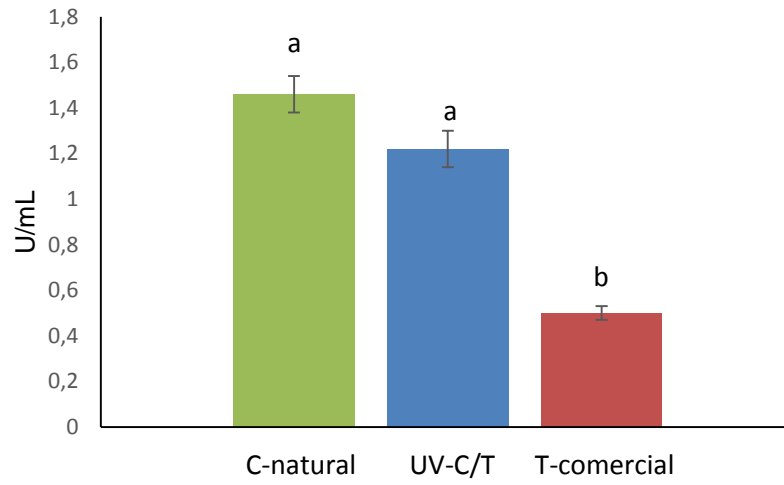
e)



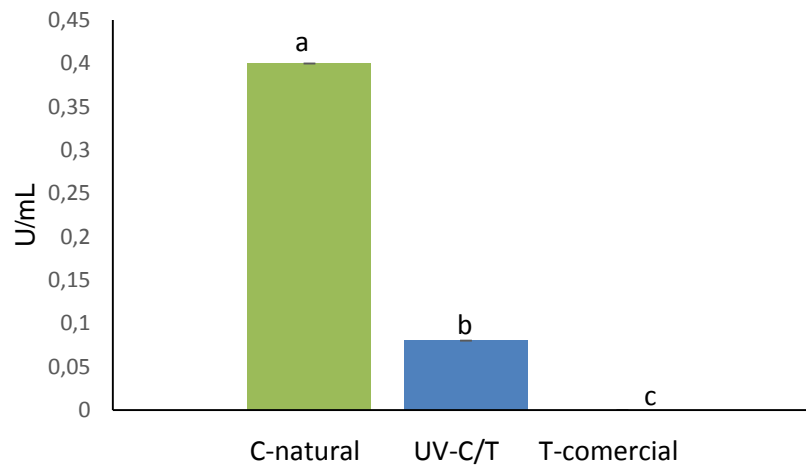
f)



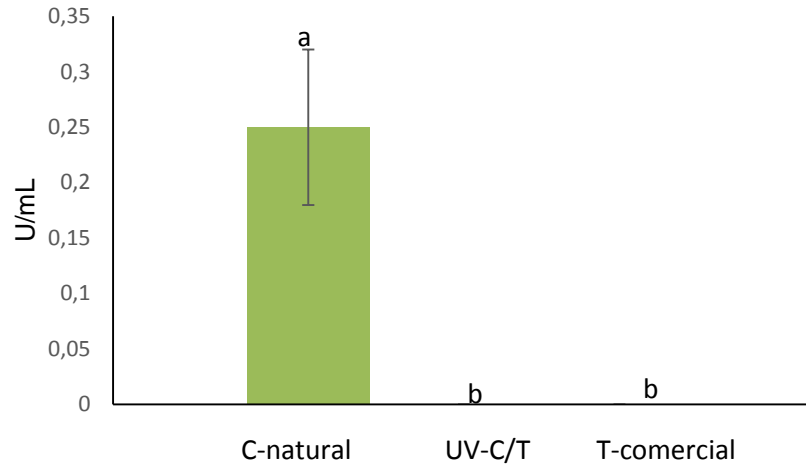
g)



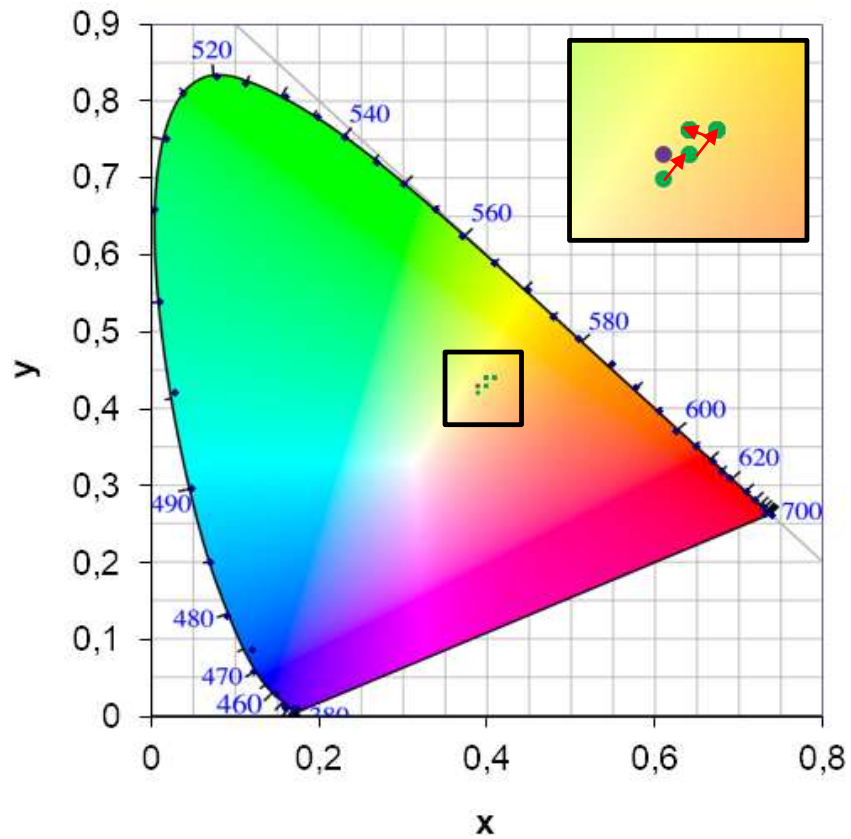
h)



i)



**Figura 4.30.** Evolución del color del jugo natural exprimido control sin tratar (●) y el jugo natural exprimido tratado por UV-C/50 (●) sobre el diagrama de cromaticidades CIE x-y.



## 4.18 Estudios de calidad sensorial

### 4.18.1 Jugo Comercial de Naranja-Mandarina

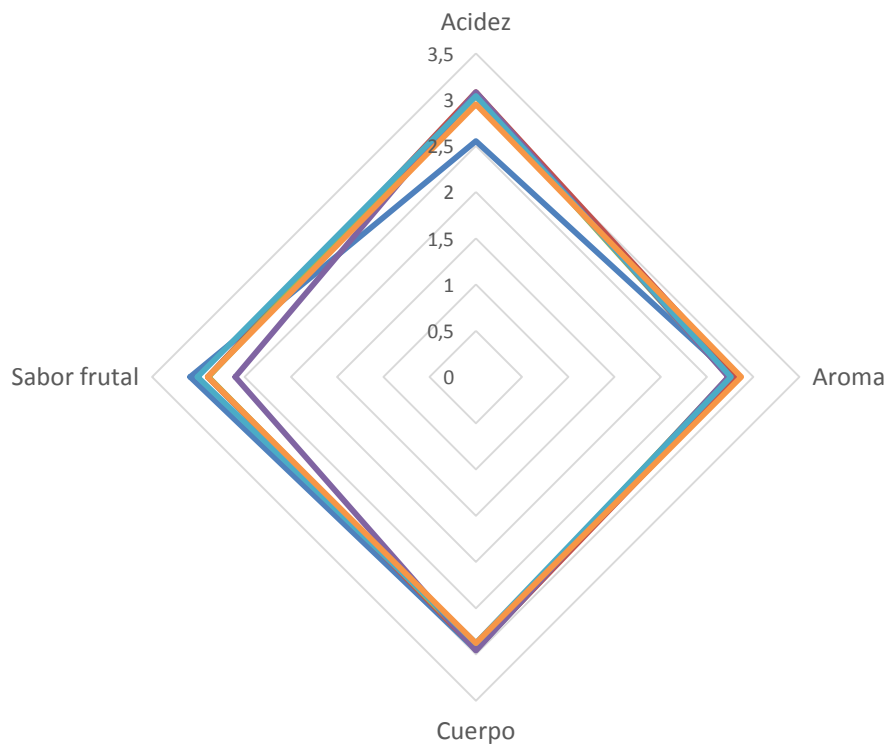
En la primera etapa del estudio sensorial se trabajó sobre el jugo comercial como prueba preliminar previa a su realización sobre jugo natural exprimido, la cual se llevó a cabo en la etapa posterior. Esta decisión se tomó para optimizar recursos ya que es una gran cantidad de fruta la que se precisa para cada experimento realizado sobre jugo natural a escala piloto. En esta instancia, se evaluó la aceptabilidad global y la valoración de ciertos atributos mediante un Test de campo, y se estudió el perfil sensorial y su evolución a lo largo del consumo mediante la prueba T-CATA, ambas descritas en detalle en las Secciones 3.17.3.1 y 3.17.3.2.

La aceptación global en escala hedónica de 9 puntos de 3 sorbos (S1, S2, S3) del jugo comercial de naranja-mandarina tratado por luz UV-C/T (UV-C/T-comercial), fue valorada en  $6,1 \pm 1,8$ ,  $6,3 \pm 1,7$  y  $6,1 \pm 1,8$  para los sorbos 1, 2 y 3, respectivamente. La muestra de jugo comercial tratado por alta temperatura (T-comercial), fue puntuada en  $6,9 \pm 1,4$ ,  $6,8 \pm 1,4$  y  $6,8 \pm 1,3$  para cada sorbo, respectivamente. Adicionalmente, un análisis de conglomerados reveló la existencia de un segmento de consumidores particularmente interesado en la acidez y sabor frutal del producto, el cual puntuó la aceptación global del jugo UV-C/T-comercial en  $6,8 \pm 1,1$ ,  $7,6 \pm 0,6$  y  $7,6 \pm 0,6$  para cada sorbo, respectivamente. Estos últimos puntajes corresponden a la categoría “*Me gusta moderadamente*” en el S1 y a “*Me gusta mucho*” en los S2 y S3; el aumento en el puntaje hedónico entre el primer sorbo y el segundo fue significativo, indicando que la aceptación aumentó a lo largo de la ingesta.

Adicionalmente, se evaluaron la acidez, el aroma, el sabor frutal y el cuerpo de las bebidas en una escala de punto justo (JAR) de modo de establecer como se posicionaban las mismas en cuanto el criterio mental de los consumidores. En todos los casos los atributos estuvieron cerca de su punto justo (3), como se puede observar en la **Figura 4.31**. Para el jugo UV-C/T-comercial la acidez promedió  $3,00 \pm 0,8$ ,  $3,0 \pm 0,8$  y  $3,1 \pm 0,7$  para los sorbos 1, 2 y 3, respectivamente, mientras que la acidez del jugo T-comercial promedió  $2,6 \pm 0,8$ ,  $3,0 \pm 0,7$  y  $3,1 \pm 0,8$ . El sorbo 1 de la muestra de jugo T-comercial fue el único que presentó diferencia significativa en la valoración de este atributo. El aroma del jugo UV-C/T-comercial se ubicó en  $3,9 \pm 0,7$ ,  $2,7 \pm 0,6$  y  $2,8 \pm 0,7$  y en el control en  $2,8 \pm 0,6$ ,  $2,8 \pm 0,7$  y  $2,7 \pm 0,6$  para los tres sorbos consecutivos, respectivamente. El cuerpo del jugo UV-C/T-comercial recibió un puntaje de  $2,9 \pm 0,8$ ,  $2,9 \pm 0,7$  y  $2,9 \pm 0,7$  para los tres sorbos, mientras

que el cuerpo del T-comercial  $3,0 \pm 0,7$ ,  $2,9 \pm 0,6$  y  $3,0 \pm 0,8$  para los sorbos 1,2 y 3, respectivamente. Es decir que no hubo diferencias significativas en el aroma y cuerpo de las distintas muestras. Por último, el sabor frutal se puntuó por igual, en  $2,9 \pm 0,7$  para los tres sorbos de UV-C/T, mientras los sorbos 1, 2 y 3 del control se puntuaron en  $3,1 \pm 0,7$ ,  $3,0 \pm 0,6$  y  $2,6 \pm 0,7$ , respectivamente. Para este atributo sólo el sorbo 3 del T-comercial fue percibido significativamente por debajo del punto justo.

**Figura 4.31.** Gráfico de araña para los puntajes promedio de acidez, sabor frutal, aroma y cuerpo del sorbo 1 (—), sorbo 2(—) y sorbo 3 (—) del jugo comercial control; sorbo 1(—), sorbo 2 (—), sorbo 3 (—) del jugo comercial tratado por UV-C/T.



En el test de T-CATA, a partir de los atributos seleccionados por los consumidores para describir cada sorbo en cada una de las muestras, se realizó un análisis de correspondencias y se hizo el gráfico de dos dimensiones para representarlo espacialmente (Figura 4.32). Las dos primeras dimensiones explicaron el 68,10% y 16,01% de la varianza

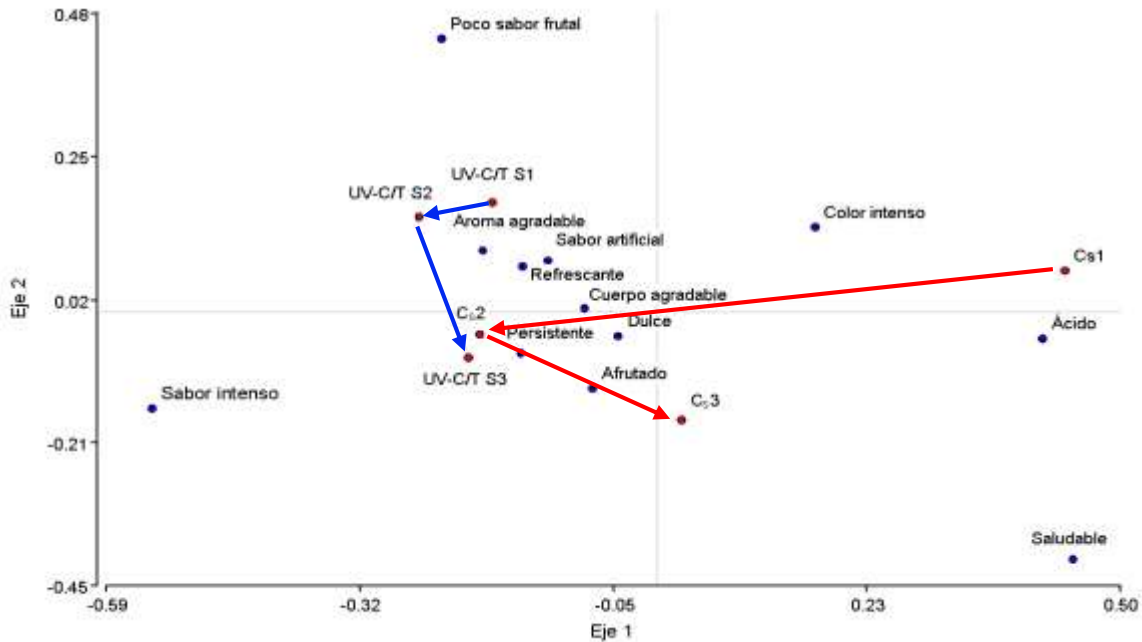


de los datos experimentales. Los sorbos S1 y S2 correspondientes a la muestra UV-C/T-comercial exhibieron valores negativos en el Eje 1 y positivos en el Eje 2, mientras que el sorbo S3 lo hizo negativamente para ambos ejes. En el caso del jugo T-comercial, S1 tuvo valores negativos para ambos ejes, mientras que S2 los tuvo positivos para ambos Ejes y S3 presentó valores positivos para el Eje 1 y negativos para el 2. En cuanto a los términos, los sorbos S1 y S2 de la muestra UV-CT comercial, se describieron como *refrescantes, con aroma agradable, poco sabor frutal y artificial*, mientras que el sorbo S3, estuvo ligado a los atributos *sabor intenso, persistente, dulce y afrutado*. El sorbo S1 de la muestra T-comercial se asoció a *color intenso*, el sorbo S2 a *sabor persistente, dulce, afrutado, sabor intenso* (al igual que el S3 de UV-C/T-comercial) y el sorbo S3 a *ácido*.

Por lo tanto, la percepción del sabor del jugo UV-C/T-comercial mejoró con la ingesta, apareciendo el sabor frutal y el dulzor luego del sorbo S1. A medida que avanzó la ingesta, la percepción de los jugos UV-C/T-comercial y T-comercial fue más similar que al inicio de la prueba (sorbo S1).

Asimismo, el hecho de que la muestra procesada por el tratamiento propuesto fue asociada a sabor artificial, justificó que en la última etapa de la tesis se evaluara el efecto del tratamiento UV-C/T en jugo natural exprimido.

**Figura 4.32.** Bi-plot obtenido a partir del Análisis de Correspondencias realizado con los resultados del T-CATA para el sorbo 1 (UV-C/T S1), sorbo 2 (UV-C/T S2) y sorbo 3 (UV-C/T S3) de la muestra de jugo comercial tratado por UV-C asistido por calor moderado (UV-C/T), y del sorbo 1 (CS1), sorbo 2 (CS2) y sorbo 3 (CS3) la muestra de jugo comercial control sin tratar .



#### 4.18.2 Jugo natural exprimido de naranja-mandarina

Posteriormente y basados en los resultados de los estudios sensoriales realizados sobre una muestra de jugo comercial y en los estudios de reto microbiano, se llevó a cabo un análisis sensorial del jugo natural exprimido de naranja-mandarina tratado por UV-C/T (UV-C/T-natural) ( $650 \text{ mJ/cm}^2\text{-}50^\circ$ ) contra un jugo comercial de naranja tratado por temperatura (T-comercial,  $80^\circ\text{C-}8 \text{ min}$ ). Como se detalló en la *Sección 3.17.4.1*, se realizó un test de campo que incluyó la aceptabilidad global mediante una escala hedónica de 9 puntos, la evaluación de 3 atributos (acidez, sabor frutal y cuerpo/viscosidad) mediante una escala de punto justo (JAR) de 5 puntos, la valoración del aroma mediante una escala hedónica de 5 puntos y una prueba CATA (*Sección 3.17.4.2*). Adicionalmente, se realizó un TDS evaluando 3 sorbos consecutivos como se detalla en la *Sección 3.17.4.4* y un perfil sensorial de una muestra *Ideal* (*Sección 3.17.4.3*).

##### 4.18.2.1 Test de campo

La **Tabla 4.11** presenta los puntajes de aceptación global y de los atributos medidos en escalas JAR. El jugo UV-C/T-natural tuvo una aceptabilidad global de  $7,2 \pm 1,1$  siendo la máxima puntuación recibida un 9 y la mínima un 5. Por otro lado, el jugo T-comercial recibió un puntaje hedónico de  $6,9 \pm 1,3$ , recibiendo como máximo un 9 y como mínimo un 3. Es decir que el jugo natural exprimido tratado por UV-C/T tuvo mayor aceptación que el

jugo comercial tratado por alta temperatura, aunque un Análisis de la varianza mostró que esta diferencia no fue significativa ( $p>0,05$ ).

**Tabla 4.11.** Puntajes medios obtenidos para la aceptación global, acidez, aroma, sabor cítrico y cuerpo/viscosidad del jugo UV-C/T natural y del jugo T-comercial.

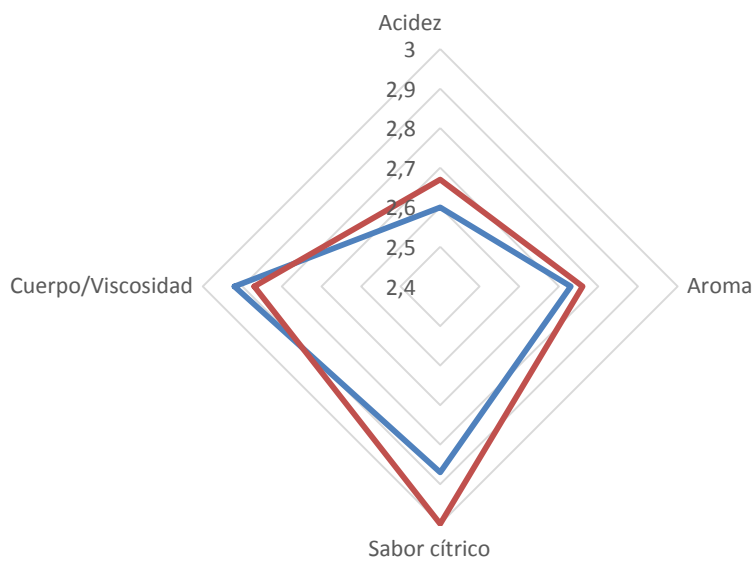
Muestra	Variable	Media	D.E.
T-comercial	Hedónico	6,9 <sup>a</sup>	1,28
T-comercial	Acidez	2,6 <sup>b</sup>	0,89
T-comercial	Aroma	2,7 <sup>b</sup>	0,88
T-comercial	Sabor cítrico	2,8 <sup>b</sup>	0,76
T-comercial	Cuerpo/Viscosidad	2,9 <sup>b</sup>	0,65
UV-C/T natural	Hedónico	7,2 <sup>a</sup>	1,09
UV-C/T natural	Acidez	2,7 <sup>b</sup>	0,79
UV-C/T natural	Aroma	2,8 <sup>b</sup>	0,75
UV-C/T natural	Sabor cítrico	3 <sup>b</sup>	0,65
UV-C/T natural	Cuerpo/Viscosidad	2,9 <sup>b</sup>	0,51

El gráfico de araña obtenido a partir de las medias para cada atributo en las escalas JAR (**Figura 4.33**) muestra gráficamente que sólo existieron leves diferencias entre los atributos medidos. El sabor cítrico se percibió en el punto justo en el caso del jugo UV-C/T-natural ( $3,0 \pm 0,6$ ), mientras que en jugo T-comercial se lo consideró levemente débil ( $2,8 \pm 0,7$ ). En cuanto a la acidez, la misma fue un poco más alta en el jugo UV-C/T-natural ( $2,7 \pm 0,8$ ) que en el T-comercial ( $2,6 \pm 0,9$ ), acercando al UVC/T-natural al punto justo. El cuerpo recibió el mismo puntaje tanto para UV-C/T-natural como para el jugo T-comercial ( $2,9 \pm 0,5$  y  $2,9 \pm 0,8$ , respectivamente). Por último, el puntaje del aroma, que se midió en una escala de intensidad (de 1 a 5), fue prácticamente el mismo para ambas muestras, siendo levemente mayor para UV-C/T-natural ( $2,8 \pm 0,8$ ) que para el jugo T-comercial ( $2,7 \pm 0,9$ ). No se encontraron diferencias significativas mediante un MANOVA ( $\alpha=0,05$ ) al evaluar los atributos y las muestras globalmente.

En la **Figura 4.34** se muestran las distribuciones de frecuencia de los puntajes asignados por los consumidores en el test hedónico y en las escalas de los atributos medidos para ambas muestras. Se analizó la frecuencia de puntuación en el punto justo (3 o 5, según el atributo) en el caso de las escalas JAR y en el puntaje “8” en el caso de la aceptación global, mediante un análisis estadístico de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) (**Figura 4.35 a,b,c,d,e**). La **Tabla 4.13** y la **Ecuación 4.1** explican el cálculo del estadístico  $\chi^2$  para la

frecuencia de puntuación 8 en la aceptación global, como ejemplo de lo que se realizó para cada atributo.

**Figura 4.33** Gráfico de araña del puntaje otorgado para la acidez, sabor cítrico, aroma y cuerpo del jugo T-comercial ( — ) y del jugo UV-C/T-natural ( — ).



**Tabla 4.13.** Tabla para el cálculo del estadístico de Chi cuadrado para el puntaje 8 en la valoración hedónica de las muestras T-comercial y UV-C/T natural.

	Recibieron UV-C/T natural	Recibieron T-comercial	Frecuencia esperada
<b>Contestaron 8</b>	42	30	$(42+30)/2=36$
<b>No contestaron 8</b>	53	65	$(53+65)/2=59$
<b>Total</b>	95	95	

$$\chi^2 = \frac{(42-36)^2}{36} + \frac{(30-36)^2}{36} + \frac{(53-59)^2}{59} + \frac{(65-59)^2}{59} = 3,22 \quad (4.1)$$

En cuanto al puntaje hedónico se determinó que de los 95 consumidores, 45 puntuaron con 8 al jugo UV-C/T-natural, mientras que 30 lo hicieron para el jugo T-comercial. El análisis demostró que esta diferencia no fue significativa al establecer la significancia en 0,05 pero sí lo fue con un  $\alpha=0,1$  (**Figura 4.34 a**) ya que en este último caso el valor de  $\chi^2$  fue de 3,22 siendo mayor que el de tabla 2,71.

Al analizar la frecuencia de puntuación 3 (“*adecuada*”) para la acidez se determinó que existieron diferencias significativas ( $\alpha=0,05$ ), siendo mayor para el jugo UV-C/T-natural que para el T-comercial (**Figura 4.34 b**) ya se obtuvo un valor de  $\chi^2$  de 6,88 el cual fue mayor que el de tabla (3,84). La acidez es un atributo característico de los jugos cítricos por lo cual es importante que se encuentre en su punto justo. En el caso del jugo comercial un alto porcentaje de consumidores (33,1%) lo encontró por debajo de la acidez adecuada.

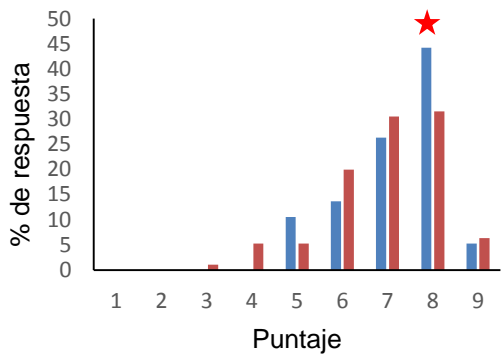
Para el aroma, la frecuencia de puntuación 5 fue baja para ambas muestras pero fue significativamente menor para UV-C/T-natural que para el jugo T-comercial ( $\alpha=0,05$ ), indicando que los consumidores encontraron al primero con aroma menos intenso (**Figura 4.34 c**). A pesar de ello, como se comentó previamente en esta Sección, la media de este atributo para ambas muestras fue prácticamente la misma (**Tabla 4.12**). De modo opuesto, la media en el puntaje del sabor cítrico fue significativamente mayor para UV-C/T-natural que para el jugo T-comercial (**Tabla 4.12**) pero la frecuencia de puntuación en el punto justo no presentó diferencias significativas en este caso ( $\alpha=0,05$ ) (**Figura 4.34 d**).

Por último, no se percibieron diferencias ( $\alpha=0,05$ ) en la valoración en 3, en la escala JAR en cuanto al cuerpo de los jugos (**Figura 4.34 e**)

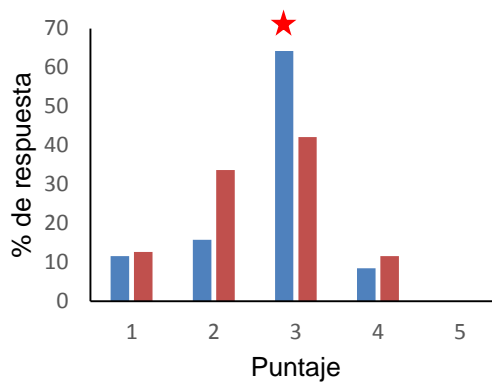
**Figura 4.34.** Representación gráfica de las distribuciones de frecuencia de los puntajes asignados por los consumidores en el test hedónico (a) y en las escalas de acidez (b), aroma (c), sabor cítrico (d) y cuerpo o viscosidad (e) medidos a la muestras UV-C/T (■) natural y el jugo T-comercial (■).

a)

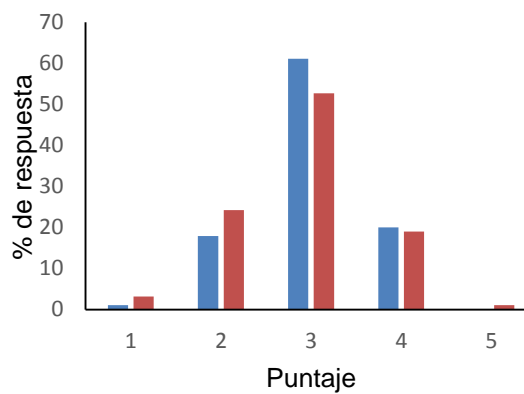
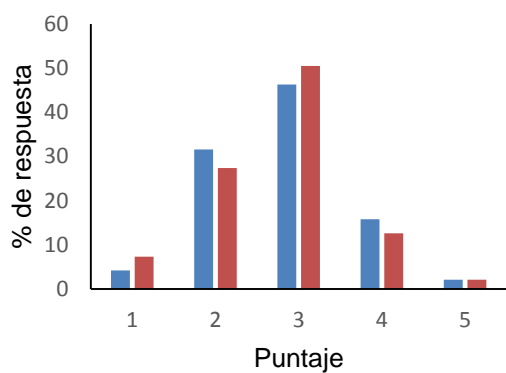
b)



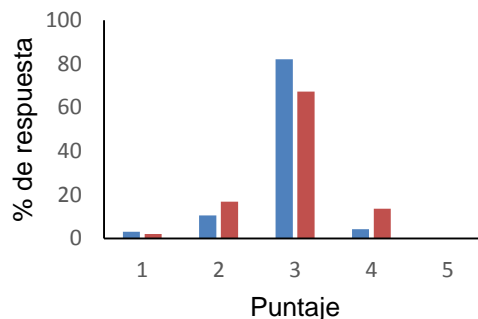
c)



d)



e)



La estrella sobre las barras indica la existencia de diferencia significativa entre los valores ( $\alpha=0,1$  para a y  $\alpha=0,05$  para b, c, d y e)

#### 4.18.2.2 Test de penalidad (“Penalty test”)

Mediante el Test de penalidad se relacionó cuáles atributos fueron los responsables de la penalización en la aceptabilidad global de los productos, por parte de los consumidores, generando una caída en el puntaje hedónico de los mismos (*mean drop*) como se detalló en la Sección 3.17.4.1.

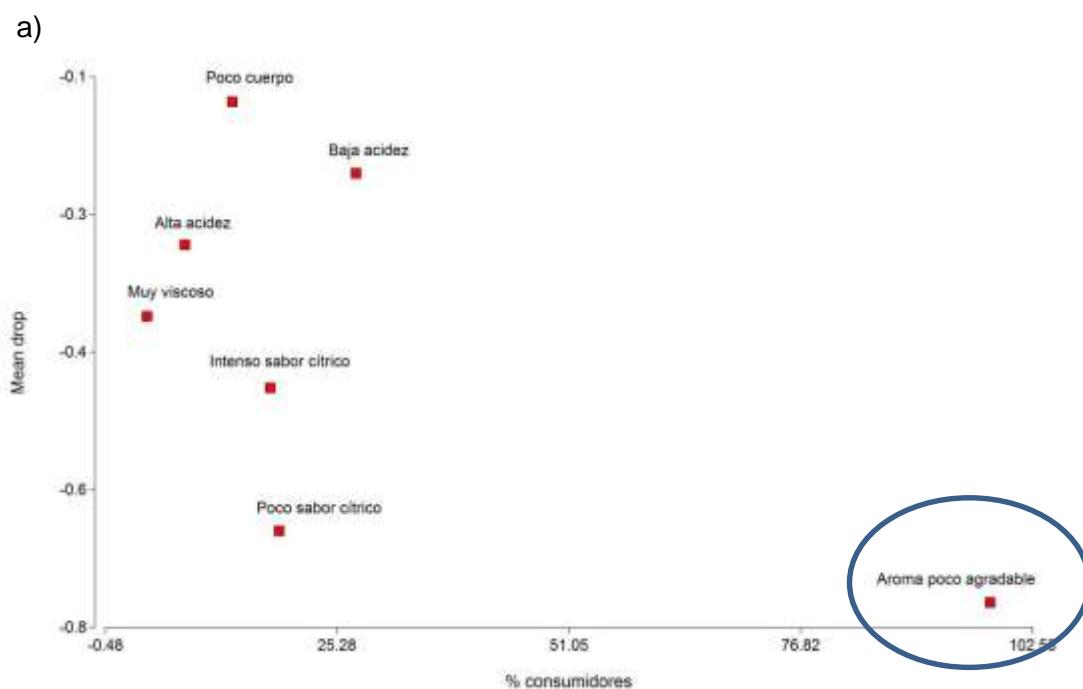
En el caso del jugo UV-C/T-natural (**Figura 4.35 a**), se encontró que un alto porcentaje de consumidores (31,6%) percibió el aroma del jugo como poco agradable, siendo el factor que más penalizó el puntaje hedónico ya que generó una caída de -0,8 puntos. El otro atributo que penalizó el puntaje total del producto es el Poco sabor cítrico o el Intenso sabor cítrico, pero esto fue percibido por sólo 18,9 % y 17,9 % de los consumidores, respectivamente, generando un *Mean drop* de -0,7 y -0,5 puntos, respectivamente. La alta acidez generó una caída levemente mayor (-0,3) que la baja acidez (-0,2), pero este atributo fue considerado alto sólo por un 8,4% de los consumidores. La alta viscosidad o cuerpo del jugo fue penalizado en -0,4 puntos pero fue muy bajo el porcentaje de consumidores (4,2%) que lo consideraron por arriba de la viscosidad adecuada. La falta de cuerpo o viscosidad prácticamente no generó una caída en el puntaje y la proporción de consumidores que lo describieron de este modo fue, también bajo, siendo específicamente un 13,7%.

El Test de penalidad llevado a cabo sobre la muestra T-comercial (**Figura 4.35 b**), mostró que tanto la alta como la baja intensidad de sabor cítrico disminuyeron el puntaje

hedónico en igual medida (-0,6 puntos), lo cual fue similar al *Mean drop* generado para el jugo UV-C/T. De todos modos, en el caso del jugo comercial, una mayor proporción de consumidores lo consideraron más intenso que en el punto justo (27,4%) que al UV-C/T (17,9%), y un 20% lo calificó como con sabor cítrico por debajo del punto justo. Un 13,7% de los consumidores consideró al jugo T-comercial como muy viscoso, disminuyendo la aceptación global en -0,6 puntos. De modo contrario, un 18,9% de los consumidores describieron el producto como con poco cuerpo, aunque este defecto no afectó la aceptación global del jugo ya que no generó perjuicio el puntaje (*Mean drop*=0).

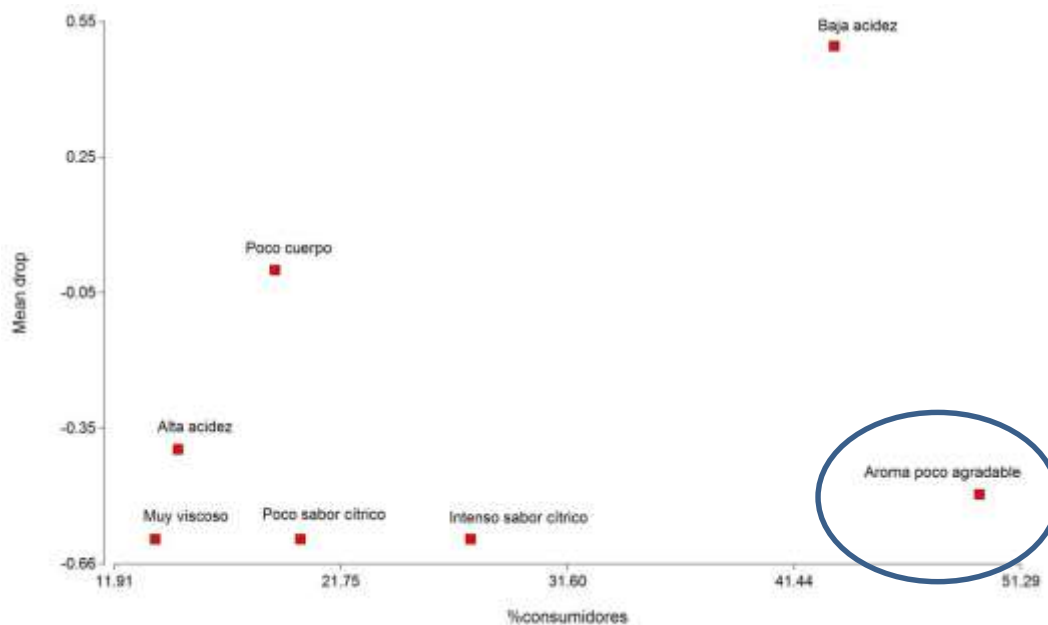
Siguiendo la tendencia del UV-C/T, en el jugo T-comercial el aroma fue el atributo que más consumidores (49,5%) percibieron como menos agradable en una escala de intensidad de 5 puntos, lo cual penalizó el puntaje global del producto en -0,5 puntos, siendo mayor la caída para el UV-C/T (-0,8). Por último, un 43,2% de los consumidores encontraron la acidez por debajo del punto justo, pero esto no penalizó el puntaje sino que lo favoreció en 0,5 puntos. Por el contrario la alta acidez fue penalizada con una caída de -0,4 puntos, pero el porcentaje de consumidores que lo encontró más ácido que el punto justo fue bajo (14,7%).

**Figura 4.35.** Gráfico del “Mean drop” en función del % de consumidores, obtenido mediante el Test de penalidad para la muestra de a) jugo exprimido de naranja-mandarina tratado por UV-C/T y b) jugo comercial de naranja tratado por temperatura alta (80°C-6 min).





b)



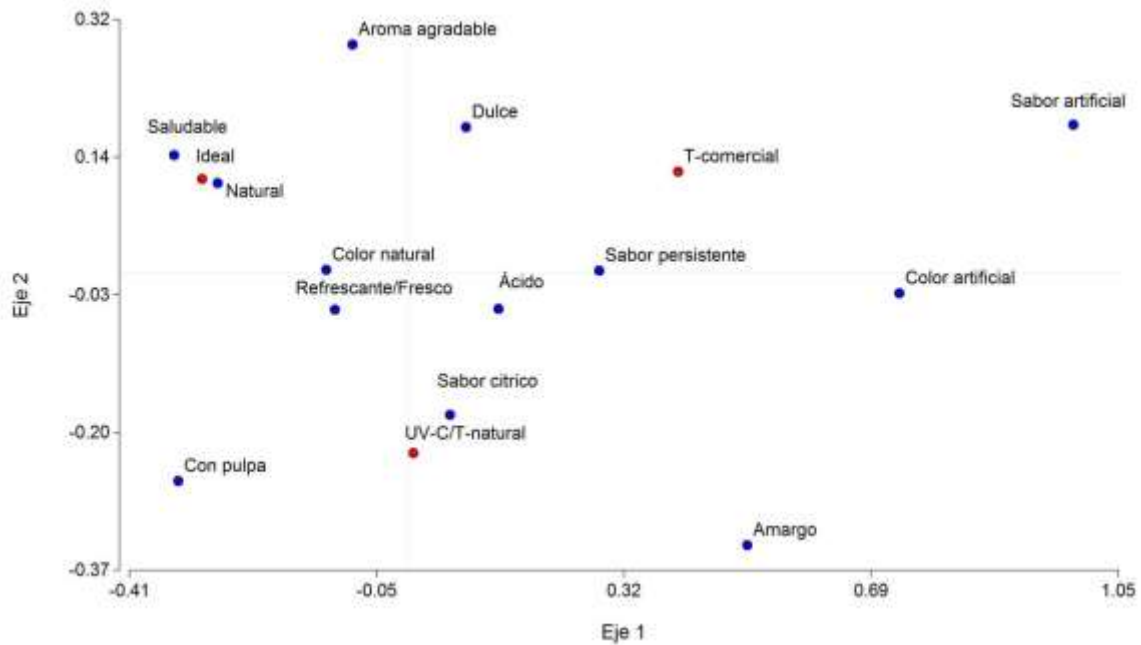
#### 4.18.2.3 CATA

A partir de las frecuencias de mención obtenidas en el test CATA tanto para el jugo UV-C/T-natural, como el T-comercial y el Ideal, se realizó un análisis de correspondencias y se representó gráficamente a fin de observar la asociación de cada muestra con los descriptores (Figura 4.36). Aquellas muestras y descriptores que se encuentran en el mismo cuadrante, están asociadas entre sí. En este caso, la muestra UV-C/T-natural se asoció a *sabor cítrico, ácido, amargo y picante*. Mientras que la jugo T-comercial se asoció a *dulce, sabor persistente/con regusto, color artificial y sabor artificial*. El jugo Ideal según los consumidores debe ser *natural, saludable y tener cuerpo agradable*. Las tres muestras se encontraron en cuadrantes separados, indicando que son descritas por diferentes términos.

García Carrillo y col. (2020) realizaron un análisis sensorial incluyendo un test CATA, sobre un jugo natural de zanahoria-naranja tratado por UV-C asistido por calor moderado (UV-C/T, 1720 mJ/cm<sup>2</sup>, 50°C) o tratado por temperatura (T-COIL, 80°C-6 min) y también pidieron a los consumidores que describieran una muestra Ideal de jugo. Las autoras reportaron que el jugo UV-C/T fue descrito por *sabor a zanahoria, poco frutal, sabor y aroma extraños*, mientras que el T-COIL se asoció a *sabor cocido, sabor artificial, muy*

*particulado, sabor persistente, color intenso, intenso sabor a fruta y verdura.* Es decir que el tratamiento a altas temperaturas (80°C) podría haber generado agregación de partículas y sabor indeseable a fruta y verdura cocidas, defectos evitados por el uso de temperatura moderada (50°C) en el tratamiento UV-C/T. En cuanto al jugo Ideal, fue definido como con *sabor natural, sabor a naranja, cuerpo agradable y color agradable.*

**Figura 4.36.** Bi-plot obtenido a partir del Análisis de correspondencias realizado sobre los datos obtenidos del Test de CATA sobre el jugo natural de naranja-mandarina tratado por UV-C/T (UV-C/T-natural), el jugo comercial de naranja tratado por temperatura (T-comercial) y el Ideal.



#### 4.18.2.4 Test de Dominancia Temporal de Sensaciones (TDS)

A partir del TDS se obtuvieron los gráficos de ratio de dominancia de cada atributo en función del tiempo y de los sorbos ingeridos para el jugo UV-C/T-natural (**Figura 4.37, a, i y ii**) y el jugo T-comercial (**Figura 4.37, b, i y ii**). En los mismos se pudo observar qué sensaciones fueron dominantes para cada producto a lo largo del consumo, siendo las significativas aquellas que cruzaron la línea de significancia marcada en los gráficos.

En el caso del jugo UV-C/T-natural, las tres sensaciones que alcanzaron valores significativos durante el consumo fueron sabor a naranja, sabor a mandarina y ácido. En particular, el jugo UV-C/T-natural fue caracterizado mayormente por su dominancia en sabor a naranja a lo largo de los 3 sorbos, ya que se mantuvo por encima del nivel de significancia desde los 16 a 28 s, 32 a 46 s y 50 a 60 s. Adicionalmente, el sabor a mandarina fue dominante en un breve período durante el segundo sorbo (28 a 32 s). Por último, en el tercer sorbo, la acidez dominó durante un breve periodo (47 a 50 s). De todos modos, la acidez se mantuvo prácticamente por encima de la línea de chance a partir de los 15 s hasta casi el final de la prueba (51 s). Por su parte el dulzor alcanzó la línea de chance y se mantuvo sobre ella entre los segundo 5 y 13, 18 y 21, 34 y 36, 38 y 49 y en el segundo 56, a pesar de que no llega expresarse ya que no alcanza la línea de significancia. El amargor superó la línea de chance el iniciar la ingesta en el sorbo 1 (segundos 9 a 12), luego por un instante en el segundo sorbo (segundo 26) y en el tercer sorbo (segundo 51), y hacia el final, a partir del segundo 58, pero en ningún momento esta sensación llegó a ser significativamente dominante.

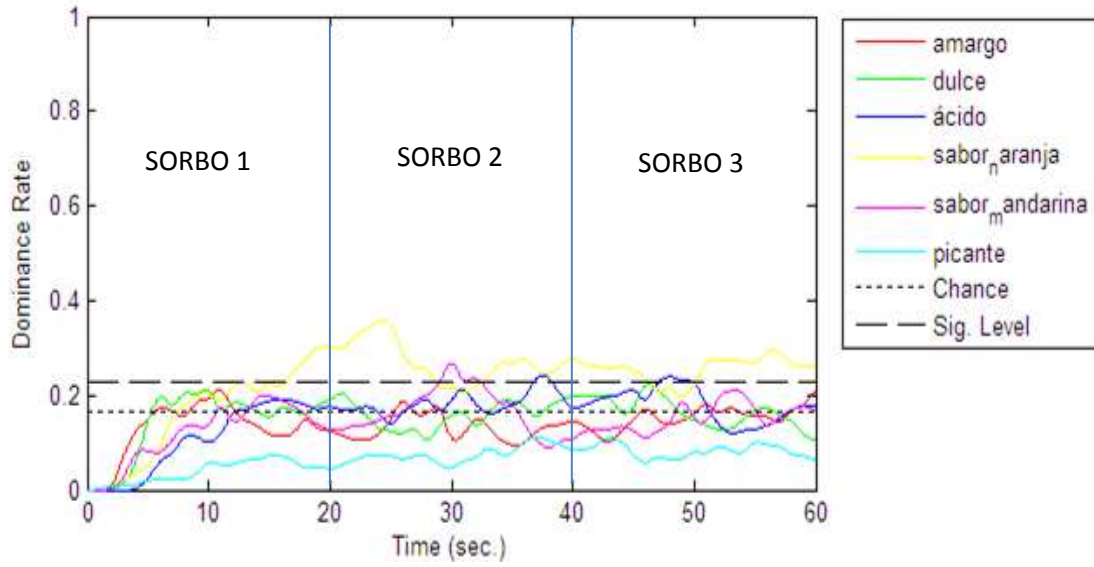
En el jugo T-comercial, el dulzor fue la única sensación percibida como dominante por instantes cortos a lo largo de los tres sorbos (8 a 9 s, 26 a 27 s, 44 s, 46 s, 56 a 58 s). El sabor a naranja nunca alcanza la línea de significancia a lo largo de toda la ingesta, insinuando que el jugo es percibido sólo como dulce y no como cítrico. De todos modos, en la **Figura 4.37 b i** a se puede observar que el sabor a naranja alcanza la línea de chance prácticamente a lo largo de toda la prueba pero nunca llega a expresarse ya que no supera la línea de significancia. En este jugo, los demás atributos en ningún momento alcanzaron la línea de chance.

En la **Tabla 4.14**, puede observarse el valor del máximo alcanzado para cada atributo (DR\_max), el tiempo en que se alcanzó ese máximo (T\_max) y el intervalo de tiempo en que el valor se mantuvo por sobre el 90% del T\_max (T\_90%max), para el jugo UV-C/T natural y T-comercial. En el caso de UV-C/T-natural el sabor a naranja alcanzó el mayor valor de DR\_max (0,36) a los 24,5 segundos, para el ácido fue de 0,24 a los 37,5 segundos y para el sabor a mandarina fue de 0,26 a los 30 segundos. En el caso del jugo T-comercial el dulzor, que fue el único atributo significativamente dominante, alcanzó su mayor valor de DR\_max a los 8,5 segundos con un valor de 0,3.

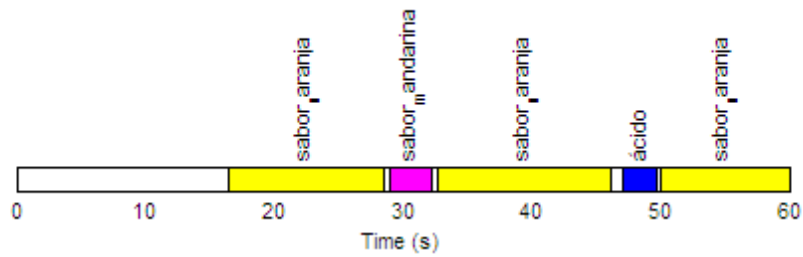
**Figura 4.37.** Gráficos de dominancia en función del tiempo (i), intervalos en que la sensación dominante supera la línea de significancia (ii) y tabla de parámetros de ratio

máximo de dominancia (DR\_max), tiempo en que el DR\_max es alcanzado (T\_max) e intervalo de tiempo en que se mantiene el máximo (T\_90%max)

a) i)

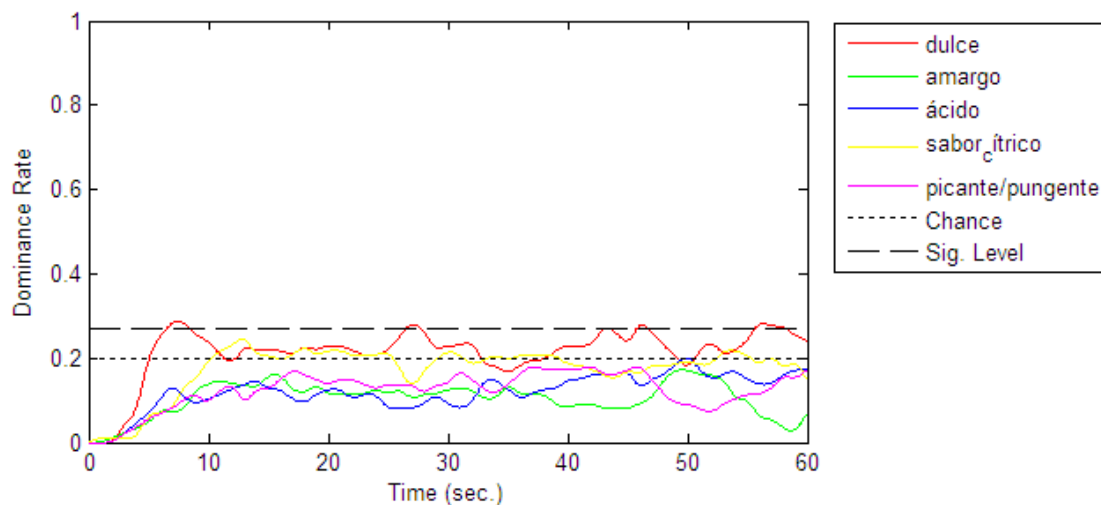


ii)

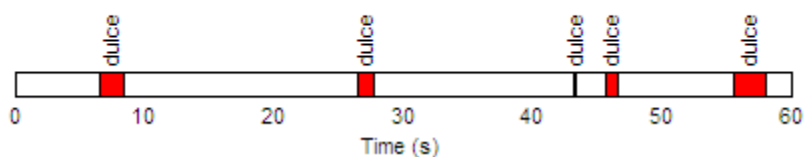


b)

i)



ii)



**Tabla 4.14.** Valor del máximo alcanzado para cada atributo (DR\_max), el tiempo en que se alcanzó ese máximo (T\_max) y el intervalo de tiempo en que el valor se mantuvo por sobre el 90% del T\_max (T\_90%max), para el jugo UV-C/T natural (a) y T-comercial (b).

a)

	Dulce	Sabor a naranja	Sabor a mandarina	Ácido	Amargo	Picante
<b>DR_max</b>	0,22	0,36	0,27	0,24	0,21	0,11
<b>T_max</b>	46,3	24,5	30	37,5	60	37
<b>T_90%max</b>	39,5	3,4	1,4	13,6	50,4	8

b)

	Dulce	Sabor cítrico	Ácido	Amargo	Picante
<b>DR_max</b>	0,30	0,30	0,24	0,16	0,21
<b>T_max</b>	8,5	56,5	12,8	15,5	27,1
<b>T_90%max</b>	4,5	51,8	44,5	38,3	9,4

Los resultados obtenidos en el TDS son coherentes con los obtenidos en los estudios sensoriales previos, ya que en el caso del JAR el jugo UV-C/T-natural recibió un mejor puntaje en cuanto a la acidez y un mayor sabor cítrico que el jugo comercial, y en el CATA se lo asoció a *sabor cítrico y ácido* lo cual se vio reflejado en este test. Por otro lado, el jugo T-comercial se percibió como poco ácido en el JAR y en el TDS, y a la vez se asoció al término *dulce* y sabor artificial en el análisis de correspondencias a partir del CATA.

#### 4.19 CONCLUSIONES PARCIALES: Segunda parte - escala piloto

- En esta etapa se puso en marcha exitosamente un equipo de procesamiento por luz UV-C a escala piloto, representando un cambio sustantivo y muy enriquecedor respecto de la etapa anterior.
- Al igual que en la escala laboratorio, se demostró que la efectividad del tratamiento por luz UV-C dependió de manera significativa de las características ópticas y fisicoquímicas de las matrices estudiadas. En todos los casos se consiguió mayor inactivación total en las matrices claras (agua peptonada, solución modelo y jugo de pera) que en las matrices turbias (jugos mix y naranja-mandarina).
- En cuanto a las condiciones de operación en el reactor UV-C a escala piloto, se determinó que aplicando un caudal de trabajo de 380 L/h se logró trabajar bajo un régimen de flujo turbulento, y de tipo Dean, lo cual permitió la formación de vórtices de flujo secundario que optimizaron el mezclado durante la operación.
- Las técnicas de radiometría y actinometría fueron adecuadas para la caracterización parcial de las distintas dosis dentro del reactor.
- Al igual que en la etapa previa, *E. coli* fue el más susceptible al tratamiento UV-C simple seguido por *L. plantarum* y luego por *S. cerevisiae*.
- El tratamiento UV-C simple a escala piloto fue muy efectivo para inactivar esporas de *A. acidoterrestis* en un jugo claro (limón claro) ya que se alcanzaron más de 3 reducciones logarítmicas del inóculo, y moderadamente efectivo para hacerlo en matrices turbias como el jugo mix en las que se alcanzaron más de 1 reducción logarítmica. Estas reducciones son importantes ya que se trata de un microorganismo que no logra ser inactivado en ningún nivel por los tratamientos térmicos

tradicionales, por lo cual, se demuestra la potencial aplicabilidad de esta tecnología para resolver esta problemática de la industria juguera.

- La aplicación del tratamiento UV-C asistido por calor moderado (UV-C/T), logró aumentar la inactivación total de las poblaciones microbianas en todos los casos en comparación con el tratamiento UV-C simple. Mediante el tratamiento por luz UV-C/T se lograron inactivaciones altas y efectos sinérgicos de los factores de estrés aplicados. A la vez, la asistencia por calor modificó la forma de las curvas de inactivación respecto de aquellas obtenidas para el tratamiento UV-C simple, logrando reducir los hombros y eliminando las colas de las mismas.
- Si bien los tres modelos matemáticos aplicados presentaron buen ajuste en todas las curvas de inactivación, los modelos Weibull y el bifásico con hombro describieron adecuadamente la inactivación observada en una mayor cantidad de casos. El modelo de Coroller perdió representatividad al caracterizar la inactivación alcanzada, respecto de lo observado a escala piloto debido fundamentalmente al cambio en la forma de las curvas de inactivación y la desaparición en general de colas marcadas cuando se aplicó el tratamiento asistido propuesto.
- En particular, el modelo de Weibull, entregó información valiosa respecto a la cinética de inactivación ya que reveló que en todos los sistemas, la asistencia por calor (UV-C/T) redujo significativamente el tiempo del tratamiento al cual la frecuencia de muerte es mayor.
- El modelo bifásico con hombro contribuyó a determinar la existencia o no de un hombro al inicio del tratamiento y la velocidad de inactivación de cada sub población dentro de la población microbiana. El modelo evidenció la mayor eficiencia del tratamiento asistido para lograr inactivación a cortos tiempos de tratamiento. En la mayoría los sistemas se pudo observar el ratio específico de inactivación tanto para las sub población sensible como la resistente en las matrices más simples (claras) fue mayor que en las complejas (turbias) y que en términos generales, la asistencia de la luz UV-C con calor moderado aumentó estos valores sugiriendo una mayor efectividad por parte del tratamiento asistido.
- El tratamiento UV-C asistido por calor moderado no alteró significativamente los parámetros CIELab de color del jugo comercial de naranja-mandarina y que no hubo cambios significativos en el color a lo largo de 20 días de almacenamiento en frío. El tratamiento UV-C asistido tampoco alteró el contenido de polifenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante medida por el método de DPPH, del jugo

comercial tratado en comparación al mismo jugo sin tratar. Todas las determinaciones se mantuvieron sin cambios significativos a lo largo de los 20 días de almacenamiento en frío.

- En el jugo natural exprimido de naranja-mandarina tratado por UV-C asistido por calor moderado existió una disminución en el contenido de polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante en comparación al mismo jugo sin tratar. La muestra sin tratar presentó el mayor contenido de Vitamina C. No existieron cambios en el color de la muestra luego del tratamiento, y tampoco a lo largo del almacenamiento en frío.
- La formación de hidroximetilfurfural (HMF) en el jugo natural exprimido tratado por UV-C asistido fue prácticamente nula, siendo el contenido de HMF en este jugo muy similar al del jugo sin tratar. Adicionalmente, la formación de HMF en un jugo comercial de naranja-mandarina tratado por altas temperaturas (80°C-6 min) fue significativamente mayor que en el jugo natural tratado por luz UV-C asistida.
- El tratamiento UV-C/T propuesto logró una inactivación total de la actividad de la enzima POD, alta de la enzima PPO y parcial de la enzima PME, en concordancia con reportado en bibliografía. El jugo de naranja-mandarina comercial tratado por altas temperaturas presentó actividad despreciable de las tres enzimas estudiadas (PPO, PME y POD).
- Se encontró un segmento de consumidores particularmente interesado en la acidez y sabor frutal del producto. Los consumidores determinaron que la acidez, el aroma, el sabor frutal y el cuerpo del jugo se expresaban en su punto justo en el jugo.
- El jugo propuesto (UV-C/T-natural) fue valorado en el segmento más alto de calificaciones hedónicas, mientras que el leve descenso en el puntaje hedónico se debió fundamentalmente al atributo *aroma*.
- En particular, el jugo UV-C/T-natural fue asociado a descriptores como *sabor cítrico, ácido y amargo*. Mientras que el jugo comercial tratado por alta temperatura (T-comercial) se asoció a *dulce, color y sabor artificial*. El jugo ideal según los consumidores debe ser *natural, saludable* y tener *cuerpo agradable*.
- Asimismo, en el jugo UV-C/T-natural, el sabor a cítrico fue la sensación dominante a lo largo de prácticamente todo el consumo, a diferencia del jugo T-comercial en el cual no dominó esta sensación, siendo el dulzor la única que se destacó a lo largo del consumo.



## 5. Conclusiones finales

El trabajo realizado a lo largo de esta tesis permitió:

- Diseñar y desarrollar un reactor de luz UV-C a escala piloto y proponer un procesamiento asistido por temperatura moderada, de fácil implementación y bajo costo y directamente transferible a las industrias juguera, el cual logró alcanzar la inactivación micorbiana equivalente de 5 ciclos logarítmicos requerida por la FDA, bajo régimen de flujo turbulento de trabajo, y que alcanzó una adecuada vida útil en el almacenamiento en refrigeración.
- Caracterizar adecuadamente el procesamiento por luz UV-C a escala laboratorio y piloto, mediante la determinación de diversas dosis en ambos equipos, incluyendo una dosis germicida medida desde el microorganismo.
- Evaluar el efecto de la microbiota de fondo y de las características de la matriz, en la efectividad de la luz UV-C para inactivar distintos microorganismo de interés.
- Evaluar la efectividad de la luz UV-C para inactivar las esporas termo resistentes de *A. acidoterretris*, las cuales representan un problema mayor en la industria.
- Caracterizar, describir e interpretar las curvas de inactivación de diversos microorganismos en diversas matrices a fin de observar su forma (presencia de hombro y colas) y optimizar las condiciones de procesamiento empleando distintos modelos matemáticos. A raíz de esto se comprendió la necesidad de hacer modificaciones en los equipos y/o incluir nuevos factores para incrementar la fluencia y/o utilizar esta tecnología como parte de una estrategia multifactorial.
- Estudiar la aceptabilidad y el perfil sensorial de un producto diseñado y desarrollado durante la tesis, procesado por el tratamiento propuesto de luz UV-C asistido por calor moderado a escala piloto.

## 6. Investigaciones futuras

En el futuro cercano, se desea avanzar en distintos aspectos de esta investigación:

- Medir la dosis germicida mediante la técnica de biodosimetría en el equipo de procesamiento UV-C a escala piloto realizando las correspondientes adaptaciones/modificaciones necesarias para la inyección del trazador.
- Abordar investigaciones que incluyan la aplicación de luz UV-C asistida por calor moderado en combinación con otras tecnologías emergentes o métodos de preservación a fin de lograr, si se quisiera, una mayor extensión de la vida útil.
- Estudiar la efectividad del tratamiento por luz UV-C asistida por calor moderado a escala piloto sobre otros microorganismos de relevancia no evaluados en los experimentos realizados en esta tesis. Por ejemplo, analizar la inactivación de hongos deteriorativos presentes en la superficie de naranjas y mandarinas como *Penicillium*, *Alternaria* y *Aspergillus*.
- Explorar la versatilidad del tratamiento en otro tipo de matrices con diferente complejidad a la estudiada en esta tesis (por ejemplo, bebidas texturizadas, bebidas isotónicas, etc.).

## 7 Bibliografía

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.

Acevedo, B. A., Sgroppo, S. C., & Dellacassa, E. S. (2018). Effects of ultraviolet radiation on the microbiological, physicochemical, and sensory properties of Rangpur lime juice.

Ağçam, E., Akyıldız, A., & Dündar, B. (2018). Thermal pasteurization and microbial inactivation of fruit juices. *Fruit juices*, 309-339.

Agcam, E. (2022). A kinetic approach to explain hydroxymethylfurfural and furfural formations induced by Maillard, caramelization, and ascorbic acid degradation reactions in fruit juice-based mediums. *Food Analytical Methods*, 15(5), 1286-1299.

Akaike, H., (1973). Information Theory and Extension of the Maximum Likelihood Principle. In: Petrov, B.N., Cza'ki, F. (Eds.), Proceedings of the 2nd International Symposium of Information. Akademia iKiado, Budapest, 267–281.

Allende, A., Bover-Cid, S., & Fernández, P. S. (2022). Challenges and opportunities related to the use of innovative modelling approaches and tools for microbiological food safety management. *Current Opinion in Food Science*, 100839.

Alzamora, S.M., Guerrero, S., Viollaz, P., Welti, J., 2005. Novel Food Processing. In G. Barbosa-Cánovas (Ed.), *Experimental protocols for modeling the response of microbial populations exposed to emerging technologies: Some points of concern*. Marcel Dekker, Inc: New York, USA , 591-607.

Antonio-Gutiérrez, O. T., López-Díaz, A. S., López-Malo, A., Palou, E., & Ramírez-Corona, N. (2019a). UV-C Light for processing beverages: principles, applications, and future trends. In *Processing and Sustainability of Beverages* Woodhead Publishing, 205-234.

Antonio-Gutiérrez, O., López-Díaz, A., Palou, E., López-Malo, A., & Ramírez-Corona, N. (2019b). 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.

Ares, G., & Jaeger, S. R. (2013). Check-all-that-apply questions: Influence of attribute order on sensory product characterization. *Food Quality and Preference*, 28(1), 141-153.

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.

Bang, H. J., Park, S. Y., Kim, S. E., Md Furkanur Rahaman, M., and Ha, S. D. (2017). Synergistic effects of combined ultrasound and peroxyacetic acid treatments against *Cronobacter sakazakii* biofilms on fresh cucumber. *LWT - Food Science and Technology*, 84, 91–98

Barut Gök, S. (2021). UV-C treatment of apple and grape juices by modified UV-C reactor based on Dean vortex technology: Microbial, physicochemical and sensorial parameters evaluation. *Food and Bioprocess Technology*, 14(6), 1055-1066.

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.

Bazin, T., Hooks, K. B., Barnetche, T., Truchetet, M. E., Enaud, R., Richez, C & Schaefferbeke, T. (2018). Microbiota composition may predict anti-TNF alpha response in spondyloarthritis patients: an exploratory study. *Scientific reports*, 8(1), 5446.

Ben Rejeb, I., Dhen, N., Kassebi, S., & Gargouri, M. (2020). Quality evaluation and functional properties of reduced sugar jellies formulated from citrus fruits. *Journal of Chemistry*, 2020, 1-8.

Bermúdez-Aguirre, D., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2011). An update on high hydrostatic pressure, from the laboratory to industrial applications. *Food Engineering Reviews*, 3(1), 44-61.

Biancaniello, M., Popović, V., Fernandez-Avila, C., Ros-Polski, V., Koutchma, T., (2018). Feasibility of a Novel Industrial-Scale Treatment of Green Cold-Pressed Juices by UV-C Light Exposure. *Beverages*, 4, 29.

Borba, K. R., Spricigo, P. C., Aykas, D. P., Mitsuyuki, M. C., Colnago, L. A., & Ferreira, M. D. (2021). Non-invasive quantification of vitamin C, citric acid, and sugar in 'Valência' oranges using infrared spectroscopies. *Journal of Food Science and Technology*, 58(2), 731-738.

Butot, S., Cantergiani, F., Moser, M., Jean, J., Lima, A., Michot, L., & Zuber, S. (2018). UV-C inactivation of foodborne bacterial and viral pathogens and surrogates on fresh and frozen berries. *International journal of food microbiology*, 275, 8-16.

Chen, Q., Zhao, Z., Wang, X., Xiong, K., & Shi, C. (2022). Microbiological predictive modeling and risk analysis based on the one-step kinetic integrated Wiener process. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 75, 102912.

Choo, Y. X., Teh, L. K., & Tan, C. X. (2023). Effects of sonication and thermal pasteurization on the nutritional, antioxidant, and microbial properties of noni juice. *Molecules*, 28(1), 313.

Claranor (2020) <https://www.claranor.com/en/news-en/pulsed-light-sterilization-on-the-german-market/>. Visitado 15 de marzo de 2023.

CODEX Alimentarius. (2005). Norma general del codex para zumos (jugos) y néctares de frutas. Codex Stan 247-2005.

Coroller, L., Leguerinel, I., Mettler, E., & Savy, N.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, 6493-6502.

Cosme, F., Pinto, T., & Vilela, A. (2018). Phenolic compounds and antioxidant activity in grape juices: A chemical and sensory view. *Beverages*, 4(1), 22.

Demirci, A., Feng, H., & Krishnamurthy, K. (Eds.). (2020). Food safety engineering. Springer International Publishing.

Dewey-Mattia, D., Manikonda, K., Hall, A. J., Wise, M. E., & Crowe, S. J. (2018). Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 2009–2015. *MMWR Surveillance Summaries*, 67(10), 1.

Dhar, R., Basak, S., & Chakraborty, S. (2022). Pasteurization of fruit juices by pulsed light treatment: A review on the microbial safety, enzymatic stability, and kinetic approach to process design. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 21(1), 499-540.

Eib, S., Schneider, D. J., Hensel, O., & Seuß-Baum, I. (2021). Evaluation of trigeminal pungency perception of allyl isothiocyanate—A time intensity (TI) study. *Food Quality and Preference*, 87, 104039.

Everitt, B., & Hothorn, T. (2011). An introduction to applied multivariate analysis with R. Springer Science & Business Media.

Farroni, A. E. (2012). *Transformaciones estructurales y físico-químicas de maíces argentinos en la producción de alimentos obtenidos por procesos de gelatinización-laminación* (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires).

Feliciano, R. J., Estilo, E. E. C., Nakano, H., & Gabriel, A. A. (2019a). Ultraviolet-C resistance of selected spoilage yeasts in orange juice. *Food microbiology*, 78, 73-81.

Feliciano, R. J., Estilo, E. E. C., Nakano, H., & Gabriel, A. A. (2019b). Ultraviolet-C resistance of selected spoilage yeasts in orange juice. *Food microbiology*, 78, 73-81.

Ferrario, M., Schenk, M., Carrillo, M. G., & 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.

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.

- 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.
- 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 Food Engineering*, 118, 302-311.
- 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.
- 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.
- Gayán, E., Serrano, M. J., Monfort, S., Álvarez, I., & Condón, S. (2012). Combining ultraviolet light and mild temperatures for the inactivation of *Escherichia coli* in orange juice. *Journal of Food Engineering*, 113(4), 598-605.
- García Carrillo, M., Ferrario, M., & Guerrero, S. (2017). Study of the inactivation of some microorganisms in turbid carrot-orange juice blend processed by ultraviolet light assisted by mild heat treatment. *Journal of food engineering*, 212, 213-225.
- García Carrillo, M., Ferrario, M., Schenk, M., & Guerrero, S. (2020). Effect of an UV-C light-Based hurdle strategy for carrot-orange juice processing on *candida parapsilosis* inactivation and physiological state: Impact on juice sensory and physicochemical quality parameters. *Food and Bioprocess Technology*, 13(11), 1954-1967.
- Geeraerd, A. H., Valdramidis, V. P., & Van Impe, J. F. (2005). GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*, 102(1), 95-105.
- Gök, S. B. (2021). Effect of Uv-C Treatment on Microbial Population and Bioactive Compounds of Orange Juice Using Modified Reactor Based on Dean Vortex Flow. *Gıda*, 46(3), 634-646.
- Gopisetty, V. V. S. (2018). *Impact of UV-C Irradiation on Safety and Quality of Cranberry-Flavored Water Using a Novel Flow Continuous UV System* (Doctoral dissertation, Tennessee State University).
- Gould, G. W. (1996). Methods for preservation and extension of shelf life. *International journal of food microbiology*, 33(1), 51-64.
- 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.

Gouma, M., Álvarez, I., Condón, S., & Gayán, E. (2020). Pasteurization of carrot juice by combining UV-C and mild heat: Impact on shelf-life and quality compared to conventional thermal treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 64, 102362.

Granato, D., & Masson, M. L. (2010). Instrumental color and sensory acceptance of soy-based emulsions: a response surface approach. *Food Science and Technology*, 30, 1090-1096.

Guerrero, S., Ferrario, M., Schenk, M., Fenoglio, D. & Andreone, A. (2022). Ultraviolet light En *Electromagnetic Technologies in Food Science*. Eds Gómez López, V. & Bhat, R. Wiley Blackwell, UK. ISBN-13 978-1119759515 , 481 páginas.

Guerrero, S. N., Ferrario, M., Schenk, M., Fenoglio, D., & Andreone, A. (2021). Ultraviolet Light. *Electromagnetic Technologies in Food Science*, 128-180.

Guerrero, S., Alzamora, S. M., & Ferrario, M. (2016). The use of pulsed light technology in a hurdle preservation strategy. In: G. Pataro and J. Ling (Eds.), *High Intensity Pulsed light in Processing and Preservation of Foods*. Nova Publishers, New York, USA.

Gutiérrez, D., Char, C., Escalona, V., Chaves, A., & Rodríguez, S. (2015). Application of UV-C radiation in the conservation of minimally processed rocket (*Eruca sativa* Mill.). *Journal of Food Processing and Preservation*, 39, 3117–3127.

He, Y., Chen, S., Tang, K., Qian, M., Yu, X., & Xu, Y. (2021). Sensory characterization of Baijiu pungency by combined time-intensity (TI) and temporal dominance of sensations (TDS). *Food Research International*, 147, 110493.

He, Y., Wang, B., Wen, L., Wang, F., Yu, H., Chen, D., & Zhang, C. (2022). Effects of dietary fiber on human health. *Food Science and Human Wellness*, 11(1), 1-10.

Helms, E. (2014). Welcome to the juice generation. *The juice generation. 100 recipes for fresh juices and superfood smoothies*. Simon and Schuster, EE.UU., 27-30.

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.

Hirt, B., Hansjosten, E., Hensel, A., Gräf, V., & Stahl, M. (2022). Improvement of an annular thin film UV-C reactor by fluid guiding elements. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 102988.

Insights, I. M. (2021). “Shared Planet” leads Innova Market Insights’ Top Ten Trends for 2022. *Fruit processing: journal for the fruit processing and juice producing european and overseas industry*, 31(10), 344-345.

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria,  
[https://inta.gov.ar/sites/default/files/catalogo\\_de\\_variedades\\_de\\_mandarinas.pdf](https://inta.gov.ar/sites/default/files/catalogo_de_variedades_de_mandarinas.pdf).  
Visitados por ultima vez 2l 15 de diciembre de 2022

Jaffe, R., & Mani, J. (2018). Polyphenolics evoke healing responses: clinical evidence and role of predictive biomarkers. In *Polyphenols: Mechanisms of action in human health and disease* (pp. 403-413). Academic Press.

Jain, S., Bidol, S. A., Austin, J. L., Berl, E., Elson, F., Williams, M. L., ... & Lynch, M. F. (2009). Multistate outbreak of Salmonella Typhimurium and Saintpaul infections associated with unpasteurized orange juice—United States, 2005. *Clinical Infectious Diseases*, 48(8), 1065-1071.

Kafkas, E., Ercisli, S., Kemal, K. N., Baydar, K., & Yilmaz, H. (2009). Chemical composition of blood orange varieties from Turkey: A comparative study. *Pharmacognosy Magazine*, 5(20), 329-335.

Kaya, Z., & Unluturk, S., 2016. Processing of clear and turbid grape juice by a continuous flow UV system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, 282-288.

Kim, J. K., & Harrison, M. A. (2009). Surrogate selection for Escherichia coli O157: H7 based on cryotolerance and attachment to romaine lettuce. *Journal of food protection*, 72(7), 1385-1391.

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.

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.

Koutchma, T. (2009). Advances in ultraviolet light technology for non-thermal processing of liquid foods. *Food and Bioprocess Technology*, 2, 138-155.

Koutchma, T., Popović, V., Ros-Polski, V., & Popielarz, A. (2016). Effects of ultraviolet light and high-pressure processing on quality and health-related constituents of fresh juice products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(5), 844–867.

Koutsoumanis, K. P., Lianou, A., & Gougouli, M. (2016). Latest developments in foodborne pathogens modeling. *Current Opinion in Food Science*, 8, 89-98.

Kozono, L., Fenoglio, D., Ferrario, M., & Guerrero, S. (2023). Inactivation of Alicyclobacillus acidoterrestris spores, single or composite Escherichia coli and native microbiota in isotonic fruit-flavoured sports drinks processed by UV-C light. *International Journal of Food Microbiology*, 386, 110024.

La Cava, E. L., & Sgroppo, S. C. (2015). Evolution during refrigerated storage of bioactive compounds and quality characteristics of grapefruit [*Citrus paradisi* (Macf.)] juice treated with UV-C light. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 1325-1333.



- La Cava, E. L. M., & Sgroppo, S. C. (2019). Combined effect of UV-C light and mild heat on microbial quality and antioxidant capacity of grapefruit juice by flow continuous reactor. *Food and Bioprocess Technology*, 12, 645-653.
- Lawless, H. T., Heymann, H., Lawless, H. T., & Heymann, H. (1999). Principles of good practice. *Sensory evaluation of food: Principles and practices*, 83-115.
- Lawless, H. T., & Heymann, H. (2010a). Discrimination testing. In *Sensory evaluation of food* (pp. 79-100). Springer, New York, NY.
- Lawless, H., & Heymann, H. (2010b). Consumer field tests and questionnaire design. In D.R. Heldman, (Ed.), *Sensory evaluation of food. Principles and practices*, New York: Springer, 349-378.
- 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.
- Lee, S., Han, A., Yoon, J. H., & Lee, S. Y. (2022). Growth evaluation of Escherichia coli O157: H7, Salmonella typhimurium, and Listeria monocytogenes in fresh fruit and vegetable juices via predictive modeling. *LWT*, 162, 113485.
- Li, D., Wang, J., & Ma, X. (2018). White-Light-Emitting Materials Constructed from Supramolecular Approaches. *Advanced Optical Materials*, 6(20), 1800273.
- López-Gómez, A., Fernández, P. S., Palop, A., Periago, P. M., Martínez-López, A., Marín-Iñiesta, F., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2009). Food safety engineering: an emergent perspective. *Food Engineering Reviews*, 1(1), 84-104.
- MacDougall, D. B. (2002). Discontinuity, bubbles, and translucence: major error factors in food color measurement. In *9th Congress of the International Colour Association* (Vol. 4421, pp. 685-688). SPIE.
- Mahdinia, E., Liu, S., Demirci, A., & Puri, V. M. (2020). Microbial growth models. *Food safety engineering* (pp. 357-398). Springer, Cham.
- Martins, F. C., Alcantara, G. M., Silva, A. F. S., Melchert, W. R., & Rocha, F. R. (2022). The role of 5-hydroxymethylfurfural in food and recent advances in analytical methods. *Food Chemistry*, 395, 133539.
- Martysiak-Żurowska, D., & Wenta, W. (2012). A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta scientiarum polonorum technologia alimentaria*, 11(1), 83-89.
- McKay, S., Sawant, P., Fehlberg, J., & Almenar, E. (2021). Antimicrobial activity of orange juice processing waste in powder form and its suitability to produce antimicrobial packaging. *Waste Management*, 120, 230-239.

McMeekin, T. A., Presser, K., Ratkowsky, D., Ross, T., Salter, M., & Tienungoon, S. (2000). Quantifying the hurdle concept by modelling the bacterial growth/no growth interface. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1-3), 93-98.

Mollah, M., Sánchez, C., Barría, K., Ferrán, D., & Vallester, E. (2018). Estudio del comportamiento hidrodinámico de un filtro biológico de flujo ascendente, utilizando mazorca de maíz como material de soporte. *Revista de Iniciación Científica*, 4(1), 50-54.

Morales-de la Peña, M., Salinas-Roca, B., Escobedo-Avellaneda, Z., Martín-Belloso, O. & Welte-Chanes, J. (2018). Effect of high hydrostatic pressure and temperature on enzymatic activity and quality attributes in mango purée varieties (cv. Tommy Atkins and Manila). *Food and Bioprocess Technology*, 11, 1211–1221.

Mordor Intelligence, (2022). Fruit and vegetable juice market-Growth, trends, Covid-19 impact, and forecasts (2022 - 2027).

Moulin, P., Rouch, J. C., Serra, C., Clifton, M. J., & Aptel, P. (1996). Mass transfer improvement by secondary flows: Dean vortices in coiled tubular membranes. *Journal of Membrane Science*, 114(2), 235-244.

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.

Müller, A., Orłowska, M., Knörr, M., Stahl, M. R., Greiner, R., & Koutchma, T. (2017). Actinometric and biosimetric evaluation of UV-C dose delivery in annular, Taylor–Coutte and coiled tube continuous systems. *Food Science and Technology International*, 23(3), 222-234.

Musara, C., Aladejana, E. B., & Mudywa, S. M. (2020). Review of the nutritional composition, medicinal, phytochemical and pharmacological properties of Citrus reticulata Blanco (Rutaceae). *F1000Research*, 9(1387), 1387.

NACMCF. (2006). Requisite Scientific Parameters for Establishing the Equivalence of Alternative Methods of Pasteurization. *Journal of Food Protection*, Vol. 69, No. 5, 2006, Pages 1190–1216

Navarro, J. M., Pérez-Pérez, J. G., Romero, P., & Botía, P. (2010). Analysis of the changes in quality in mandarin fruit, produced by deficit irrigation treatments. *Food Chemistry*, 119(4), 1591-1596.

Nicolau-Lapeña, I., Colás-Medà, P., Viñas, I., & Alegre, I. (2022). Inactivation of Escherichia coli, Salmonella enterica and Listeria monocytogenes on apple peel and apple juice by ultraviolet C light treatments with two irradiation devices. *International Journal of Food Microbiology*, 364, 109535.

- Niu, D., Zeng, X. A., Ren, E. F., Xu, F. Y., Li, J., Wang, M. S., & Wang, R. (2020). Review of the application of pulsed electric fields (PEF) technology for food processing in China. *Food Research International*, *137*, 109715.
- Ongeng, D., Haberbeck, L. U., Mauriello, G., Ryckeboer, J., Springael, D., & Geeraerd, A. H. (2014). Modeling the fate of Escherichia coli O157: H7 and Salmonella enterica in the agricultural environment: current perspective. *Journal of food science*, *79*(4), R421-R427.
- 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*, 603-614.
- Ozturk, S., Kong, F., & Singh, R. K. (2020). Evaluation of *Enterococcus faecium* NRRL B-2354 as a potential surrogate of Salmonella in packaged paprika, white pepper and cumin powder during radio frequency heating. *Food Control*, *108*, 106833.
- Pagal, G. A., & Gabriel, A. A. (2020). Individual and combined mild heat and UV-C processes for orange juice against Escherichia coli O157: H7. *Lwt*, *126*, 109295.
- 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.
- Pataro, G., Muñoz, A., Palgan, I., Noci, F., Ferrari, G., & Lyng, J. G. (2011). Bacterial inactivation in fruit juices using a continuous flow pulsed light (PL) system. *Food Research International*, *44*(6), 1642-1648.
- 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*, 36-60.
- Paniwnyk, L. (2017). Applications of ultrasound in processing of liquid foods: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *38*, 794-806.
- 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.
- Peleg, M., & Cole, M. B. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science*, *38*(5), 353-380.
- Pendyala, B., Patras, A., Gopisetty, V. V. S., & Sasges, M. (2021). UV-C inactivation of microorganisms in a highly opaque model fluid using a pilot scale ultra-thin film annular reactor: Validation of delivered dose. *Journal of Food Engineering*, *294*, 110403.
- Perestrelo, R., Silva, C., Silva, P., Medina, S., & Câmara, J. S. (2019). Differentiation of fresh and processed fruit juices using volatile composition. *Molecules*, *24*(5), 974.

- Petrus, R. R., Churey, J. J., & Worobo, R. W. (2020). Challenging a range of high pressure processing parameters to inactivate pathogens in orange juice. *High Pressure Research*, 40(4), 537-542.
- Petruzzi, L., Campaniello, D., Speranza, B., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2017). Thermal treatments for fruit and vegetable juices and beverages: A literature overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(4), 668-691.
- Poepping, C., Beck, S. E., Wright, H., & Linden, K. G. (2014). Evaluation of DNA damage reversal during medium-pressure UV disinfection. *Water research*, 56, 181-189.
- Preetha, P., Pandiselvam, R., Varadharaju, N., Kennedy, Z. J., Balakrishnan, M., & Kothakota, A. (2021). Effect of pulsed light treatment on inactivation kinetics of *Escherichia coli* (MTCC 433) in fruit juices. *Food Control*, 121, 107547.
- Puligundla, P., Pyun, Y. R., & Mok, C. (2018). Pulsed electric field (PEF) technology for microbial inactivation in low-alcohol red wine. *Food science and biotechnology*, 27(6), 1691-1696.
- Putnik, P., Pavlić, B., Šojić, B., Zavadlav, S., Žuntar, I., Kao, L., Kitonić, D., & Kovačević, D. B. (2020). Innovative hurdle technologies for the preservation of functional fruit juices. *Foods*, 9, 699.
- Quinn, G., & Keough, M., 2002. *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge University Press. Cambridge, UK; ISBN: 0-521-00976-6
- Renard, C., & Maingonnat, J. F. (2012). Thermal processing of fruits and fruit juices. *Thermal Food Processing: New technologies and qualities issues*, 2da Ed., CRC Press Boca Raton, 686 p., 2012, Contemporary Food Engineering, 9781439876787.
- Rhan, 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.
- Rios-Romero, E. A., Ochoa-Martínez, L. A., Morales-Castro, J., Bello-Pérez, L. A., Quintero-Ramos, A., & Gallegos-Infante, J. A. (2018). Ultrasound in orange sweet potato juice: Bioactive compounds, antioxidant activity, and enzymatic inactivation. *Journal of food processing and preservation*, 42(6), e13633.
- Rodríguez-Concepción, M., Avalos, J., Bonet, M. L., Boronat, A., Gomez-Gomez, L., Hornero-Mendez, D., & Zhu, C. (2018). A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Progress in lipid research*, 70, 62-93.
- Rojo, M. C., Cristiani, M., Szerman, N., Gonzalez, M. L., Lerena, M. C., Mercado, L. A., & Combina, M. (2019). Reduction of *Zygosaccharomyces rouxii* population in concentrated grape juices by thermal pasteurization and hydrostatic high pressure processing. *Food and bioprocess technology*, 12(5), 781-788.

Roobab, U., Abida, A., Afzal, R., Madni, G. M., Zeng, X. A., Rahaman, A., & Aadil, R. M. (2022). Impact of high-pressure treatments on enzyme activity of fruit-based beverages: an overview. *International Journal of Food Science & Technology*, *57*(2), 801-815.

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.

Salomão, B. D. C. M. (2018). Pathogens and spoilage microorganisms in fruit juice: an overview. *Fruit juices*, 291-308.

Sampedro, F., & Fan, X. (2014). Inactivation kinetics and photoreactivation of vegetable oxidative enzymes after combined UV-C and thermal processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *23*, 107-113.

Sauceda-Gálvez, J. N., Tió-Coma, M., Martínez-García, M., Hernández-Herrero, M. M., Gervilla, R., & Roig-Sagués, A. X. (2020). Effect of single and combined UV-C and ultra-high pressure homogenisation treatments on inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *60*, 102299.

Sauer, A., & Moraru, C.I. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice and apple cider, using pulsed light treatment. *Journal of Food Protection*, *72*, 937-944.

Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, *14*, 111-125.

Schlich, P. (2017). Temporal Dominance of Sensations (TDS): A new deal for temporal sensory analysis. *Current Opinion in Food Science*, *15*, 38-42.

Schultze, D. M., Couto, R., Temelli, F., McMullen, L. M., & Gänzle, M. (2020). Lethality of high-pressure carbon dioxide on Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* and surrogate organisms on beef jerky. *International Journal of Food Microbiology*, *321*, 108550

Serment-Moreno, V., Mujica-Paz, H., Torres, J. A., & Welti-Chanes, J. (2012). Monte Carlo simulation of orange juice pectinmethylesterase (pme) inactivation by combined processes of high hydrostatic pressure (hhp) and temperature. *Revista mexicana de ingeniería química*, *11*(3), 363-372.

Shah, N. N. A. K., Shamsuddin, R., Rahman, R. A., & Adzahan, N. M. (2016). Furan development In Dean vortex UVC treated Pummelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) fruit juice. *International Food Research Journal*, *23*.

Shalaby, E. A., & Shanab, S. M. (2013). Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*.

Shankar, V., Mahboob, S., Al-Ghanim, K. A., Ahmed, Z., Al-Mulhm, N., & Govindarajan, M. (2021). A review on microbial degradation of drinks and infectious diseases: A perspective of human well-being and capabilities. *Journal of King Saud University-Science*, 33(2), 101293.

Silva, F. V., & Gibbs, P. (2001). Alicyclobacillus acidoterrestris spores in fruit products and design of pasteurization processes. *Trends in food science & technology*, 12(2), 68-74.

Singleton, V., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R., & Lester, P. (1999). Analysis of totalphenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).

Stathers, T., Holcroft, D., Kitinoja, L. (2020). A scoping review of interventions for crop postharvest loss reduction in sub-Saharan Africa and South Asia. *Nature Sustainability*, 3, 821–835.

Stavropoulou, E., & Bezirtzoglou, E. (2019). Predictive modeling of microbial behavior in food. *Foods*, 8(12), 654.

Torkamani, A. E., & Niakousari, M. (2011). Impact of UV-C light on orange juice quality and shelf life. *International Food Research Journal*, 18(4).

Tremarin, A., Brandão, T. R., & Silva, C. L. (2017a). Application of ultraviolet radiation and ultrasound treatments for Alicyclobacillus acidoterrestris spores inactivation in apple juice. *Lwt*, 78, 138-142.

Tremarin, A., Brandão, T. R., & Silva, C. L. (2017b). Inactivation kinetics of Alicyclobacillus acidoterrestris in apple juice submitted to ultraviolet radiation. *Food Control*, 73, 18-23.

Turner, T., & Burri, B. J. (2013). Potential nutritional benefits of current citrus consumption. *Agriculture*, 3(1), 170-187.

Ukuku, D. O., Geveke, D. J., Chau, L., & Niemira, B. A. (2016). Microbial safety and overall quality of cantaloupe fresh-cut pieces prepared from whole fruit after wet steam treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 231, 86-92.

Usaga, J., Manns, D. C., Moraru, C. I., Worobo, R. W., & Padilla-Zakour, O. I. (2017). Ascorbic acid and selected preservatives influence effectiveness of UV treatment of apple juice. *LWT*, 75, 9-16.

US FDA. (2019). Ultraviolet radiation for the processing and treatment of food. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=179.39>

Varela-Santos, E., Ochoa-Martinez, A., Tabilo-Munizaga, G., Reyes, J. E., Pérez-Won, M., Briones-Labarca, V., & Morales-Castro, J. (2012). Effect of high hydrostatic pressure (HHP) processing on physicochemical properties, bioactive compounds and shelf-life of pomegranate juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, 13-22.

- Wahia, H., Zhou, C., Fakayode, O. A., Amanor-Atiemoh, R., Zhang, L., Mustapha, A. T., & Ma, H. (2021). Quality attributes optimization of orange juice subjected to multi-frequency thermosonication: *Alicyclobacillus acidoterrestris* spore inactivation and applied spectroscopy ROS characterization. *Food Chemistry*, 361, 130108.
- Wang, Y., Lu, Z., Wu, H., & Lv, F. (2009). Study on the antibiotic activity of microcapsule curcumin against foodborne pathogens. *International journal of food microbiology*, 136(1), 71-74.
- Wen, G., Deng, X., Wan, Q., Xu, X., & Huang, T. (2019). Photoreactivation of fungal spores in water following UV disinfection and their control using UV-based advanced oxidation processes. *Water research*, 148, 1-9
- Wilczyński, K., Kobus, Z., & Dziki, D. (2019). Effect of Press Construction on Yield and Quality of Apple Juice. *Sustainability*, 11(13), 3630.
- Whiting, R. C. (1995). Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 35(6), 467-494.
- Xie, D., & Guo, W. (2020). Measurement and calculation methods on absorption and scattering properties of turbid food in Vis/NIR range. *Food and Bioprocess Technology*, 13(2), 229-244.
- Zafra-Rojas, Q. Y., Cruz-Cansino, N., Ramírez-Moreno, E., Delgado-Olivares, L., Villanueva-Sánchez, J., & Alanís-García, E. (2013). Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1283-1288.
- Zhai, Y., Tian, J., Ping, R., Xiu, H., Xiang, Q., Shen, R., & Wang, Z. (2020). Effects of ultraviolet-C light-emitting diodes at 275 nm on inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells and its spores as well as the quality attributes of orange juice. *Food Science and Technology International*, 1082013220957529.
- Zhou, L., Liu, W., Stockmann, R. & Terefe, N.S. (2018). Effect of citric acid and high pressure thermal processing on enzyme activity and related quality attributes of pear purée. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 45, 196–207.