

## Información Importante

La Universidad de La Sabana informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad de La Sabana.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan finalidad académica, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, La Universidad de La Sabana informa que los derechos sobre los documentos son propiedad de los autores y tienen sobre su obra, entre otros, los derechos morales a que hacen referencia los mencionados artículos.

**BIBLIOTECA OCTAVIO ARIZMENDI POSADA**  
UNIVERSIDAD DE LA SABANA  
Chía - Cundinamarca



El presente formulario debe ser diligenciado en su totalidad como constancia de entrega del documento para ingreso al Repositorio Digital (Dspace).

<b>TITULO</b>	: Evaluación del efecto de factores intrínsecos de una matriz líquida sobre la inactivación microbiana mediante la aplicación de ultrasonido de alta intensidad		
<b>SUBTITULO</b>			
<b>AUTOR(ES)</b> Apellidos, Nombres (Completo) del autor(es) del trabajo	<b>Mejía Cano, Angélica María</b>		
<b>PALABRAS CLAVE</b> (Mínimo 3 y máximo 6)	ultrasonido de alta intensidad		
	propiedades intrínsecas del medio		
	inactivación microbiana		
<b>RESUMEN DEL CONTENIDO</b> (Mínimo 80 máximo 120 palabras)	<p style="text-align: center;">El ultrasonido de alta intensidad (UAI), se perfila como una tecnología promisorio para la conservación de alimentos. Sin embargo, hacen falta estudios sistemáticos del efecto de propiedades intrínsecas del medio sobre la efectividad de los tratamientos que permitan determinar su potencial de aplicación real. En este trabajo se evaluó el efecto del UAI sobre tres cepas microbianas de importancia en alimentos y con características diferenciales a nivel de pared celular: <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Escherichia coli</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, y se determinó la influencia de diferentes condiciones intrínsecas del medio (glucosa, NaCl, grasa y pH) sobre la inactivación microbiana. Los resultados mostraron que la concentración celular de <i>L. monocytogenes</i>, <i>E. coli</i> y <i>S. cerevisiae</i>, se redujo luego de 10 minutos de tratamiento y se encontró que los factores intrínsecos del medio ejercen un efecto significativo sobre la cinética de inactivación microbiana por ultrasonido</p>		

Autorizo (amos) a la Biblioteca Octavio Arizmendi Posada de la Universidad de La Sabana, para que con fines académicos, los usuarios puedan consultar el contenido de este documento en las plataformas virtuales de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE FACTORES INTRÍNSECOS DE UNA MATRIZ LÍQUIDA SOBRE  
LA INACTIVACIÓN MICROBIANA MEDIANTE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDO DE ALTA  
INTENSIDAD**

**ANGÉLICA MARÍA MEJÍA CANO**

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
MAGISTER EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS CON ÉNFASIS EN ALIMENTOS**

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS  
BOGOTÁ D.C.**

**2012**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE FACTORES INTRÍNSECOS DE UNA MATRIZ LÍQUIDA SOBRE  
LA INACTIVACIÓN MICROBIANA MEDIANTE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDO DE ALTA  
INTENSIDAD**

**ANGÉLICA MARÍA MEJÍA CANO**

**BERNADETTE KLOTZ CEBERIO, Ph.D**

**Director**

**CATALINA AGUILAR RIVERA, M.Sc**

**Co-Director**

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS**

**BOGOTÁ D.C.**

**2012**

*“A Dios y a la Virgen por haberme permitido llegar a este momento tan especial de mi vida. A las personas que me han apoyado y han creído en mi trabajo en estos años. A mi familia, gracias por su infinito amor, cariño y comprensión”.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Bernadette Klotz Ceberio y a Catalina Aguilar Rivera por sus observaciones y por llamar la atención en torno a la percepción, claridad e intención de los conceptos que sustentan este escrito. A ellas les digo, gracias por su apoyo logístico y académico, por sus correcciones, sus calidades humanas y por su amistad, cosas que han sido invaluable para mí.

Agradezco a Colciencias y al Fondo de Investigación de la Universidad de La Sabana por financiar y apoyar este trabajo.

Agradezco a la gente del grupo de Investigación del Laboratorio de Nuevas tecnologías de la Universidad de La Sabana, Johanna Andrea Serna, Francisco Garcés y Javier Melo, muchas gracias por su apoyo, ayuda y ánimo en todo momento, indispensable en el logro de este trabajo. A todos los auxiliares de Laboratorio, al personal administrativo de la Universidad de La Sabana y a todas las personas que hicieron parte de este proceso.

Agradezco muy especialmente a Geraldo De Martino por su continua ayuda, apoyo, compañía, por sus sugerencias académicas y personales y por creer en mí.

Agradezco a todas las personas que me acompañaron y ayudaron en el transcurso de mi maestría, en especial a Dolly Andrea Leiva, Annamaria Filomena e Indira Sotelo, que aportaron con sus críticas comentarios y sugerencias a lo largo del desarrollo de este escrito y en mi formación como magister, gracias por su amistad y apoyo.

Finalmente agradezco a mi familia que me acompañó todo el proceso y supo darme todo su apoyo en los momentos difíciles, a ellos les digo que no hay palabras para expresar todo mi cariño porque son una parte importante de mí; espero que todos mis logros académicos y profesionales sean una parte tangible de toda la gratitud que les debo.

*La Universidad de La Sabana no se hace responsable por las opiniones  
contenidas en el presente documento, que son exclusiva  
responsabilidad del autor*

# TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUCCIÓN .....	14
2. OBJETIVOS .....	16
2.1.OBJETIVO GENERAL .....	16
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
3. MARCO TEÓRICO.....	17
3.1. ULTRASONIDO .....	17
3.1.1. GENERALIDADES DEL ULTRASONIDO.....	17
3.1.2. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ULTRASONIDO .....	20
3.1.3. APLICACIONES DEL ULTRASONIDO .....	24
3.1.3.1. Ultrasonido como método de emulsificación/homogenización .....	24
3.1.3.2. Filtración asistida ultrasónicamente .....	24
3.1.3.3. Ultrasonido como método antiespumante .....	25
3.1.3.4. Ultrasonido en el proceso de desgasificación/desaireación .....	25
3.1.3.5. Despolimerización por ultrasonido .....	25
3.1.3.6. Ultrasonido y cocción .....	26
3.1.3.7. Ultrasonido y corte .....	26
3.1.3.8. Ultrasonido para mejorar viscosidad y textura .....	27
3.1.3.9. Ultrasonido en el proceso de congelación y cristalización.....	27
3.1.3.10. Ultrasonido en el proceso de descongelación.....	27
3.1.3.11. Ultrasonido en el proceso de secado .....	27
3.1.3.12. Inactivación microbiana y de enzimas.....	28
3.2. MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN ALIMENTOS.....	29
3.2.1. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	30
3.2.2. <i>Escherichia coli</i> .....	30
3.2.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	31



<b>3.3. FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO MICROBIANO</b> .....	32
<b>3.3.1. FACTORES INTRÍNSECOS</b> .....	32
<b>3.3.2 FACTORES EXTRÍNSECAS</b> .....	33
<b>3.3.3. FACTORES IMPLÍCITOS</b> .....	34
<b>3.4. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA</b> .....	35
<b>3.4.1. MODELOS PREDICTIVOS</b> .....	35
<b>3.4.2. AJUSTE DE MODELOS PREDICTIVOS</b> .....	40
<b>3.4.3.HERRAMIENTAS DE MODELACIÓN</b> .....	41
<b>3.4.3.1. GINAFIT® (Geeraerd and Van Impe inactivation model fitting tool)</b> .....	42
<b>4. ESTADO DEL ARTE</b> .....	43
<b>4.1. APLICACIONES DEL ULTRASONIDO EN LA INDUSTRIA ALIMENTICIA</b> .....	43
<b>4.2. INACTIVACIÓN MICROBIANA POR ULTRASONIDO</b> .....	44
<b>4.3 CONDICIONES INTRÍNSECAS Y EXTRÍNSECAS QUE AFECTAN LA INACTIVACIÓN MICROBIANA POR ULTRASONIDO</b> .....	49
<b>4.3.1. TIEMPO DE TRATAMIENTO ULTRASÓNICO</b> .....	51
<b>4.3.2. PRESIÓN HIDROSTÁTICA</b> .....	52
<b>4.3.3. FRECUENCIA Y AMPLITUD</b> .....	52
<b>4.3.4. TEMPERATURA</b> .....	53
<b>4.3.5. MICROORGANISMO</b> .....	53
<b>4.3.6. pH</b> .....	54
<b>4.3.7. COMPOSICIÓN DEL MEDIO</b> .....	54
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	56
<b>5.1. MICROORGANISMOS</b> .....	56
<b>5.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS</b> .....	56
<b>5.3. TRATAMIENTO ULTRASÓNICO</b> .....	58
<b>5.4. RECUENTO DE MICROORGANISMOS</b> .....	59
<b>5.5. GENERACIÓN DE LAS CURVAS DE INACTIVACIÓN</b> .....	59
<b>5.6. OBTENCIÓN DE LOS MODELOS DE INACTIVACIÓN</b> .....	60
<b>5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	62
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	63

<b>6.1. CINÉTICA DE INACTIVACIÓN EN TRATAMIENTOS ULTRASÓNICOS DE ALTA INTENSIDAD EN SOLUCIÓN TAMPÓN</b>	<b>64</b>
<b>6.2. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DEL SUSTRATO SOBRE LA CINÉTICA DE INACTIVACIÓN MICROBIANA EN LOS TRATAMIENTOS DE ULTRASONIDO DE ALTA INTENSIDAD</b>	<b>65</b>
<b>6.3. EFECTO DEL PH DEL MEDIO SOBRE LA CINÉTICA DE INACTIVACIÓN MICROBIANA EN TRATAMIENTOS DE ULTRASONIDO DE ALTA INTENSIDAD</b>	<b>72</b>
<b>6.4. MODELACIÓN DEL EFECTO DE TRATAMIENTOS ULTRASÓNICOS SOBRE LA CARGAMICROBIANA DE SOLUCIONES AJUSTADAS CON DIFERENTES FACTORES INTRÍNSECOS</b>	<b>76</b>
<b>6.4.1. EFECTO DE LA GLUCOSA SOBRE LA CINÉTICA DE INACTIVACIÓN MICROBIANA POR ULTRASONIDO</b>	<b>76</b>
<b>6.4.2. EFECTO DEL NaCl SOBRE LA CINÉTICA DE INACTIVACIÓN MICROBIANA POR ULTRASONIDO</b>	<b>80</b>
<b>6.4.3. EFECTO DE LA GRASA SOBRE LA CINÉTICA DE INACTIVACIÓN MICROBIANA POR ULTRASONIDO</b>	<b>83</b>
<b>6.4.4. EFECTO DEL pH SOBRE LA CINÉTICA DE INACTIVACIÓN MICROBIANA POR ULTRASONIDO</b>	<b>86</b>
<b>6.5. DISCUSIÓN FINAL</b>	<b>91</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>95</b>
<b>8. RECOMENDACIONES</b>	<b>98</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>100</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>115</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación del ultrasonido según frecuencia de aplicación .....	19
<b>Figura 2.</b> Cavitación ultrasónica .....	23
<b>Figura 3.</b> Curva de crecimiento microbiano (Tipo I) y curva de sobrevivencia (Tipo II) .....	37
<b>Figura 4.</b> Modelo Log-linear+Shoulder+Tail .....	40
<b>Figura 5.</b> Interfase de modelos en Ginafit® .....	62
<b>Figura 6.</b> Resumen de la metodología utilizada .....	63
<b>Figura 7.</b> Cinética de inactivación microbiana en solución tampón mediante ultrasonido	64
<b>Figura 8.</b> Efecto del contenido de glucosa sobre la inactivación microbiana por ultrasonido .....	67
<b>Figura 9.</b> Efecto del contenido de NaCl sobre la inactivación microbiana por ultrasonido	68
<b>Figura 10.</b> Efecto del contenido de grasa sobre la inactivación microbiana por ultrasonido .....	70
<b>Figura 11.</b> Efecto del pH modificado con ácido cítrico sobre la inactivación microbiana por ultrasonido .....	73
<b>Figura 12.</b> Efecto del pH modificado con ácido inorgánico sobre la inactivación microbiana por ultrasonido .....	75
<b>Figura 13.</b> Modelos de inactivación microbiana por ultrasonido en medio PBS modificado con glucosa .....	79
<b>Figura 14.</b> Modelos de inactivación microbiana por ultrasonido en medio PBS modificado con NaCl .....	82
<b>Figura 15.</b> Modelos de inactivación microbiana por ultrasonido en medio PBS modificado con grasa .....	85
<b>Figura 16.</b> Modelos de inactivación microbiana por ultrasonido en medio PBS modificado con ácido inorgánico .....	88
<b>Figura 17.</b> Modelos de inactivación microbiana por ultrasonido en medio PBS modificado con ácido cítrico .....	90
<b>Figura 18.</b> Efecto de la composición del medio sobre el parámetro cinético $k_{max}$ .....	93
<b>Figura 19.</b> Evaluación de la viabilidad microbiana frente a diferentes factores intrínsecos .....	118

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Mecanismos del ultrasonido .....	20
<b>Tabla 2.</b> Efecto del ultrasonido en microorganismos .....	46
<b>Tabla 3.</b> Efecto del ultrasonido en productos .....	50
<b>Tabla 4.</b> Parámetros para modelo de inactivación en medio PBS modificado con glucosa	74
<b>Tabla 5.</b> Parámetros para modelo de inactivación en medio PBS modificado con NaCl ....	77
<b>Tabla 6.</b> Parámetros para modelo de inactivación en medio PBS modificado con grasa ...	80
<b>Tabla 7.</b> Parámetros para modelo de inactivación en medio PBS con pH modificado .....	83
<b>Tabla 8.</b> Parámetros para modelo de inactivación en medio PBS con pH modificado con ácido cítrico .....	84
<b>Tabla 9.</b> Influencia de los factores intrínsecos evaluados sobre la tasa de inactivación microbiana ( $k_{max}$ ) .....	89
<b>Tabla 10.</b> Condiciones óptimas de tratamiento por microorganismo y propiedad intrínseca evaluada .....	91

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO 1.</b> FICHA TÉCNICA DEL PBS (PHOSPHATE BUFFER SALINE).....	115
<b>ANEXO 2.</b> ENSAYO DE VIABILIDAD DE LOS MICROORGANISMOS BAJO DIFERENTES FACTORES INTRÍNSECOS.....	117
<b>ANEXO 3.</b> REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS PARA LA SELECCIÓN DE CONDICIONES DE TRATAMIENTO ULTRASÓNICO .....	119
<b>ANEXO 4.</b> SOCIALIZACIÓN Y PUBLICACIÓN DE ALGUNOS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ELPROYECTO.....	121

## RESUMEN

El ultrasonido de alta intensidad es una tecnología emergente y promisoría para la conservación de los alimentos que reduce la concentración microbiana sin afectar sus propiedades fisicoquímicas y nutricionales de manera significativa. Como se observa en otras nuevas tecnologías de preservación, las propiedades intrínsecas de los alimentos podría tener un impacto significativo sobre la efectividad de los tratamientos. Por esta razón los estudios sobre estas interacciones matriz-tratamiento-microorganismo, son requeridos para determinar el potencial real de aplicación ultrasonidos de alta intensidad.

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la influencia de las propiedades intrínsecas de los alimentos sobre el efecto del ultrasonido de alta intensidad en tres cepas microbianas de importancia en alimentos y con características diferenciales a nivel de pared celular: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*. El efecto de diferentes concentraciones de glucosa, NaCl y grasa y de diferentes valores de pH sobre la cinética de inactivación microbiana fue evaluado. Poblaciones microbianas de 7,0 log UFC/ml inoculadas en PBS (phosphate buffered saline) se trataron de 1,0 a 10,0 minutos con el Sonicator Misonix S-4000 (amplitud: 120µm y frecuencia: 24KHz). El modelo matemático de Geeraerd se utilizó para describir la respuesta de los microorganismos a las diferentes condiciones de tratamiento.

Los resultados mostraron que la concentración celular de *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. cerevisiae*, se redujo 0,5, 0,9 y 1,1 ciclos logarítmicos, respectivamente, después de 10,0 minutos de tratamiento en soluciones de PBS. Concentraciones de glucosa por encima del 8,0%, favorecieron la inactivación microbiana por ultrasonido con reducciones de más de 2,0 log ciclos log. Concentraciones de NaCl al 1,0%, también potencializaron el efecto del ultrasonido, generando reducciones de 1,5 ciclos log. El contenido de grasa y el pH del medio mostraron un efecto cepa-dependiente sobre la efectividad de los tratamientos. Los resultados sugieren que los factores intrínsecos del ambiente ejercen un efecto significativo sobre la cinética de inactivación microbiana por ultrasonido. Con el fin de aplicar esta tecnología a escala industrial, se requiere estudiar ampliamente las características fisicoquímicas de cada matriz alimentaria.

## ABSTRACT

High-intensity ultrasound is an emerging and promising technology for food preservation, reducing microbial concentration without affecting significantly the physicochemical and nutritional properties of foods. Similarly to other novel preservation technologies, the intrinsic properties of the food could have a significant impact on the effectiveness of treatments. For this reason studies on these interactions matrix-microorganism-treatment are required to determine the real potential of application high-intensity ultrasound.

The main objective of this study was to evaluate the influence of the intrinsic properties of food on the effect of high intensity ultrasound on three important microorganisms with different characteristics of cell wall and size related to food: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. The effect of different glucose, NaCl, and fat concentrations and pH values on the kinetics of microbial inactivation was assessed. Microbial populations of 7,0 log CFU/mL inoculated into PBS (phosphate buffered saline) were treated from 1,0 to 10,0 minutes with the Sonicator Misonix S-4000 (range: 120µm and frequency: 24KHz). The Geeraerd mathematical model was used to describe the response of the microorganisms to the different treatment conditions.

The results showed that the cell concentration of *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. cerevisiae*, was reduced 0,5, 0,9 and 1,1 log cycles respectively, after 10,0 minutes of treatment in solutions of PBS. Glucose concentrations above 8,0%, promotes microbial inactivation by ultrasound with more than 2,0 log cycles reduction. Concentrations of NaCl 1,0% also potentiated the effect of ultrasound, causing reductions of 1,5 log cycles. The fat content and pH of the medium showed a strain-dependent effect on the effectiveness of the treatments. The results suggested that intrinsic factors of the environment exert a significant effect on the kinetics of microbial inactivation by ultrasound. In order to implement this technology at industrial scale more extensive studies on the physicochemical characteristics of each food matrix are required.

# 1. INTRODUCCIÓN

El efecto marcado de la globalización y los acelerados ritmos de trabajo, así como también el acceso ilimitado y casi instantáneo a la información, han provocado que los consumidores de alimentos se vuelvan cada vez más exigentes en cuanto a las características de aceptabilidad de los productos que consumen. Es así como hoy en día la decisión de compra de un alimento procesado está más basada en la preservación de las características nutricionales y funcionales del material fresco, que en una vida de anaquel extremadamente larga. Por tal motivo, durante las últimas décadas, las investigaciones en alimentos se han encaminado hacia la búsqueda y el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan reducir la intensidad de los tratamientos térmicos requeridos para la estabilización de sistemas alimentarios (López et al., 1994). Esta búsqueda ha permitido que tratamientos físicos no térmicos como las altas presiones, los pulsos eléctricos, los pulsos magnéticos, los pulsos luminosos, las irradiaciones y el ultrasonido, entre muchos otros, se conviertan en alternativas promisorias para el procesamiento de alimentos por cuanto permiten realizar operaciones de estabilización sin incrementar drásticamente la temperatura del sistema, preservando mucho mejor las características sensoriales y nutricionales del producto final (Aleman et al., 1994; Parish, 1998; Villamiel et al., 2000; D'Amico et al., 2006; Knorr et al., 2007; Barbosa-Canovas et al., 2008).

La utilización de ondas de ultrasonido en la industria de alimentos ha sido objeto de investigación durante muchos años, especialmente para el desarrollo de técnicas de análisis no invasivas y para el control de calidad (Mason et al., 1996). Recientemente, varios estudios han demostrado que el ultrasonido de alta intensidad tiene un efecto destructivo sobre las paredes y membranas biológicas, por lo cual se constituye como una tecnología de gran potencial para la reducción de carga microbiana a temperaturas de procesamiento inferiores a las utilizadas durante la pasteurización y la esterilización (Mason et al., 1996; Ordoñez, 1987; Wrigley et al., 1992). Estudios previos realizados por el grupo de investigación en Procesos Agroindustriales de la Universidad de La Sabana y la empresa Productos Naturales de la Sabana Alquería S.A, demostraron que tratamientos con ondas de ultrasonido de alta intensidad reducen sustancialmente la carga bacteriana en medios de cultivo, soluciones tampón y leche, lo cual abre



una posibilidad de innovación tecnológica importante para disminuir la concentración de microorganismos y extender la vida útil de productos alimenticios. Sin embargo, los estudios sobre su efecto en otras matrices son escasos y hace falta establecer los límites y los alcances de esta tecnología para la implementación del ultrasonido a nivel industrial. Adicionalmente, aunque es bien conocido que los factores extrínsecos e intrínsecos inciden significativamente sobre el comportamiento de los microorganismos cuando son sometidos a condiciones de estrés como los tratamientos físicos (Madigan et al., 2008; Barbosa-Canovas et al., 2008; Chemat et al., 2011), hasta el momento no se han reportado estudios que demuestren de manera sistemática el efecto de estos factores sobre la efectividad de los tratamientos ultrasónicos.

Con base en lo anteriormente expuesto se hace evidente la gran necesidad que existe de realizar trabajos de investigación que permitan esclarecer el efecto de tecnologías emergentes de carácter no térmico como el ultrasonido, sobre la estabilidad microbiológica de productos de importancia nutricional, causando a la vez un impacto tecnológico positivo en la industria alimentaria de la región. De esta manera, la industria de alimentos en Colombia necesita afrontar de manera competitiva los retos tecnológicos establecidos para el siglo XXI, y para ello requiere un replanteamiento de las tecnologías de procesamiento actualmente utilizadas.

Es por eso que este trabajo se centró en el estudio de los factores que afectan la respuesta de los microorganismos a las ondas de ultrasonido de alta intensidad para poder establecer condiciones de tratamiento (frecuencia, tiempo y potencia transmitida al medio) que permitan validar el uso de esta tecnología en diferentes matrices alimentarias. Así, con el propósito de aportar nuevo conocimiento en el tema de tecnologías no térmicas y con el objetivo de acercar la investigación científica en ultrasonido de alta intensidad a su implementación industrial, se estudió en este trabajo el efecto de factores intrínsecos como el pH y la composición del medio (azúcar, sal, lípidos, proteínas y ácidos orgánicos) sobre la inactivación de tres microorganismos de importancia en la industria alimenticia como lo son *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Saccharomyces cerevisiae*, sometiendo para esto una matriz líquida ajustada a diferentes condiciones intrínsecas, a tratamientos de ultrasonido de alta intensidad y así poder plantear su potencial de aplicación efectiva.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de factores intrínsecos de una matriz líquida sobre la inactivación microbiana de tres microorganismos de importancia en alimentos, por tratamientos con ultrasonido de alta intensidad.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la cinética de inactivación en tratamientos ultrasónicos de alta intensidad de tres microorganismos diferentes asociados a alimentos (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*) suspendidos en solución tampón.

Determinar el efecto de la composición del sustrato (glucosa, sal, grasa) sobre la cinética de inactivación microbiana en tratamientos con ultrasonido de alta intensidad.

Determinar el efecto de pH del medio sobre la cinética de inactivación microbiana en tratamientos de ultrasonido de alta intensidad.

Obtener los modelos matemáticos que describan el comportamiento de los tres microorganismos evaluados durante tratamientos con ultrasonido de alta intensidad bajo el efecto de diferentes factores intrínsecos.

## 3. MARCO TEÓRICO

### 3.1. ULTRASONIDO

#### 3.1.1. GENERALIDADES DEL ULTRASONIDO

Ultrasonido es el nombre que comúnmente reciben las ondas de sonido con frecuencias mayores a aquellas que pueden ser detectadas por el oído humano. El ultrasonido maneja ondas con frecuencias entre 16KHz y 20MHz, las cuales al ser aplicadas pueden llegar hasta 5MHz en gases o hasta 500MHz en líquidos y sólidos (Kuldiloke et al., 2002; Demirdoven et al., 2009; Arroyo et al., 2011; D'Amico et al., 2006).

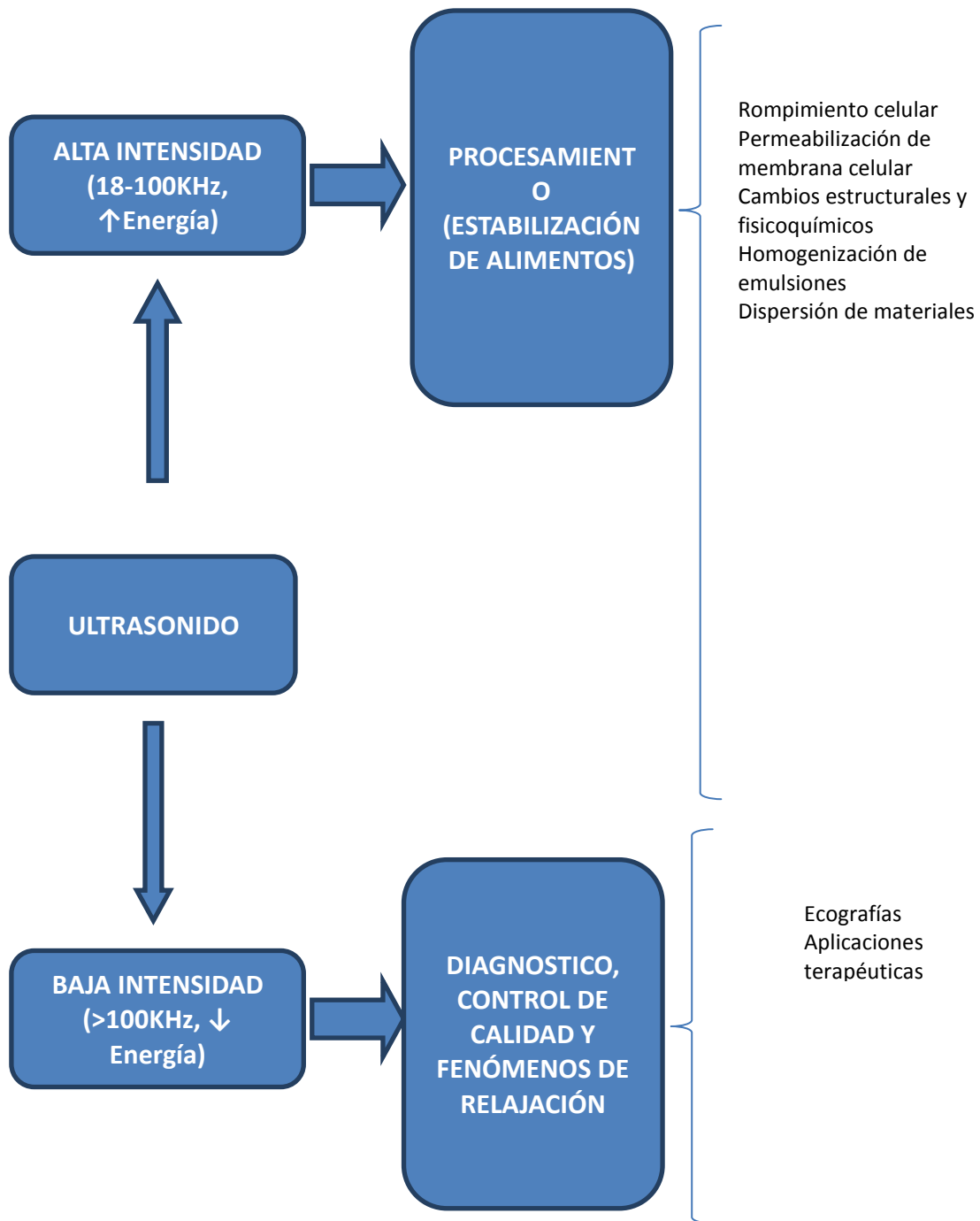
El ultrasonido es una tecnología emergente que recientemente ha sido estudiada para propósitos de inactivación microbiana y enzimática, pero que durante años ha sido objeto de investigación, especialmente en el tema de control de calidad en la industria de alimentos. Se ha demostrado que puede ser utilizado para la evaluación de textura, composición y viscosidad de alimentos (Lee et al., 2003), para el desarrollo de técnicas de análisis no invasivas y para determinar el nivel de homogenización de glóbulos de grasa en leche (Mason et al., 1996), entre otras aplicaciones. Adicionalmente, el ultrasonido por su capacidad para destruir paredes y membranas biológicas, es considerado como una tecnología promisoría tanto para la destrucción de microorganismos a temperaturas de procesamiento inferiores a las utilizadas durante la esterilización, como para acompañar otras tecnologías de proceso como lo son la extracción, las altas presiones, la pasteurización, entre otras (Coupland, 2004; Rodgers y Ryser, 2004; Ugarte-Romero et al., 2007; Barbosa et al., 2009; Demirdoven et al., 2009).

Dependiendo de los rangos de frecuencias utilizados, el ultrasonido se puede dividir en dos tipos: ultrasonido de baja intensidad y ultrasonido de alta intensidad (Figura 1).

El ultrasonido de baja intensidad maneja ondas sonoras de frecuencias mayores a 100KHz con baja amplitud de propagación y utiliza también, niveles de potencia muy bajos ( $<1\text{Wcm}^2$ ) que no causan alteraciones físicas ni químicas en el material sobre el cual actúan, por lo cual son

conocidas como no destructivas. La aplicación más común de este tipo de ultrasonido es en el campo médico para el análisis de imágenes, el análisis químico y en estudios de fenómenos de relajación. Igualmente, en el campo de la ingeniería de alimentos es utilizado como método analítico para obtener información importante acerca de las propiedades fisicoquímicas y el estado físico de los alimentos en el área de control de calidad (McClements, 1994; Kuldiloke, 2002).

Por otro lado, el ultrasonido de alta intensidad, utiliza rangos de frecuencia entre 18 y 100KHz y niveles de potencia más altos (en el rango de 10-10.00Wcm<sup>2</sup>) que generan intensos gradientes de presión, temperatura y corte dentro del material sobre el cual actúan, lo que podría modificar su estructura y reactividad química (Suslik, 1998). Es por esto, que las aplicaciones de este tipo de ultrasonido se basan en el efecto físico, mecánico y químico que las ondas transmitidas causan sobre el alimento. Se ha comprobado que el tratamiento ultrasónico facilita fenómenos de rompimiento celular, desgasificación de líquidos, homogenización de emulsiones, dispersión de materiales agregados, alteración de la actividad enzimática, modificación de procesos de cristalización y destrucción de microorganismos entre otros (Mason, 1996; Shoh, 1988). Igualmente, produce radicales libres que promueven reacciones de oxidación en bebidas alcohólicas, aumenta las reacciones de polimerización y despolimerización por la dispersión temporal de los agregados o por el rompimiento permanente de los enlaces químicos en las cadenas poliméricas, e incrementa las tasas de difusión, entre otros (McClements, 1995). De esta manera, el ultrasonido de alta intensidad ha sido aplicado a diferentes campos como la preservación de alimentos, por sus efectos en la inactivación microbiana y enzimática.



**Figura 1.** Clasificación del ultrasonido según frecuencia de aplicación  
(Fuente: McClements et al., 1995; Lee et al., 2003; Barbosa et al, 2009; Demirdoven et al., 2009).

### 3.1.2. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ULTRASONIDO

En los últimos años, las investigaciones se han concentrado en entender el mecanismo de acción del ultrasonido de alta intensidad para la inactivación de microorganismos, ya que cuando el ultrasonido es aplicado con suficiente intensidad, éste tiene el potencial de causar muerte celular, lo que envuelve diversas hipótesis entre las que se encuentran los fenómenos de cavitación, el calentamiento localizado, la formación de radicales libres y el aumento de la temperatura y la presión, entre otros (Earnshaw et al., 1995; Ashokkumar et al., 2008; Cameron et al., 2008).

Los mecanismos de acción del ultrasonido se clasifican principalmente en mecanismos térmicos (generación de energía calórica ó mecánica), y mecanismos no térmicos (cavitación, rarefacción, formación de radicales libres, choques micro-mecánicos y fuerza de radiación). En la Tabla 1, se resumen cada uno de los mecanismos y su campo de aplicación.

Los mecanismos térmicos se basan en la hipótesis de generación de energía calórica o mecánica. O'Brien (2007), propone que cuando la energía ultrasónica es propagada en un material atenuante como lo es un tejido, la amplitud de la onda decrece con la distancia, y la absorción se representa en la porción de la energía de onda que es convertida en calor. Este calor generado puede conllevar a la inactivación microbiana si la aplicación del ultrasonido es continua y dependerá de la intensidad con que éste sea aplicado.

Por otro lado, entre los principales mecanismos de acción no térmicos se encuentran la cavitación y la fuerza de radiación, siendo el primero el mecanismo no térmico que más ha recibido atención por parte de varios autores (Earnshaw et al., 1995; Ashokkumar et al., 2008; Cameron et al., 2008; Bermudez et al., 2008; Barbosa-Canovas et al., 2009). La fuerza de radiación, consistente en mover o hacer vibrar localmente tejidos, produce cambios en el medio de propagación, los cuales pueden ser explicados por muchos mecanismos, no todos conocidos o suficientemente comprendidos (O'Brien, 2007).

**Tabla 1.** Mecanismos de acción del ultrasonido (Fuente: Autor).

TEORÍA	MECANISMO	APLICACIÓN	REFERENCIA
<b>Cavitación</b>	Remoción mecánica por irrupción o atrapamiento de la bacteria, a través de burbujas localizadas con altas temperaturas (5500°C) y presiones (500MPa).	Procesos de desinfección, lisis celular e inactivación enzimática.	Mason et al. (2006), O'Donell et al. (2010), Suslick (1998), Piyasena et al. (2003).
<b>Formación de radicales Libres</b>	Sonólisis del agua puede producir iones (OH-) y (H+) y peróxido de hidrógeno.	Inactivación microbiana y enzimática.	Suslick (1998), O'Donell et al. (2010).
<b>Choques micro-mecánicos intracelulares</b>	Disrupción de las células y disminución del grosor de paredes celulares.	Lisis celular, inactivación enzimática y efecto antimicrobiano.	Guerrero et al. (2001).
<b>Generación de energía calórica y mecánica</b>	Propagación de la onda decrece con la distancia al ser aplicado en material atenuante. Esta porción que es absorbida se traduce en calor.	Inactivación microbiana.	O'Brien (2007). Sala et al. (1995).
<b>Fuerza de radiación</b>	Movimiento o vibración local de un tejido por fuerza de radiación acústica.	Análisis clínicos.	O'Brien (2007).
<b>Compresión y Rarefacción</b>	Microcorriente acústica.	Inactivación microbiana y enzimática.	O'Donell et al. (2010) O'Brien (2007).

En cuanto a la cavitación, algunos investigadores sostienen que durante el ciclo de expansión, las ondas ultrasónicas de alta intensidad producen pequeñas burbujas dentro de los líquidos. Cuando el medio está confinado y la energía transmitida por las ondas no se puede disipar fácilmente, se produce un crecimiento y una explosión violenta de las burbujas generándose un fenómeno conocido como cavitación (Figura 2). Durante la implosión se alcanzan temperaturas del orden de 5000°K por unos cuantos nanosegundos, con presiones cercanas a los 50.000kPa (Sala et al., 1998; Suslick, 1985; Álvarez et al., 1999; Demirdoven et al., 2009).

Uno de los efectos del mecanismo de cavitación es que daña la pared celular y posiblemente la membrana citoplasmática, afectando de esta manera la permeabilidad celular. Los contenidos intracelulares y el citosol salen de la pared y la membrana celular, lo que causa la inactivación bacteriana y por último su eliminación. El colapso violento de las burbujas en la cavitación induce el choque de ondas y la formación de radicales libres (Cameron et al., 2008). Este fenómeno genera un incremento en la permeabilidad de las membranas biológicas haciendo que se pierda completamente su selectividad y se alteren las propiedades de transporte de masa del sistema. Adicionalmente, la formación de radicales libres en el medio (iones  $H^+$  y  $OH^-$ ), podría tener un efecto negativo directo sobre las células, debido a su actividad microbicida.

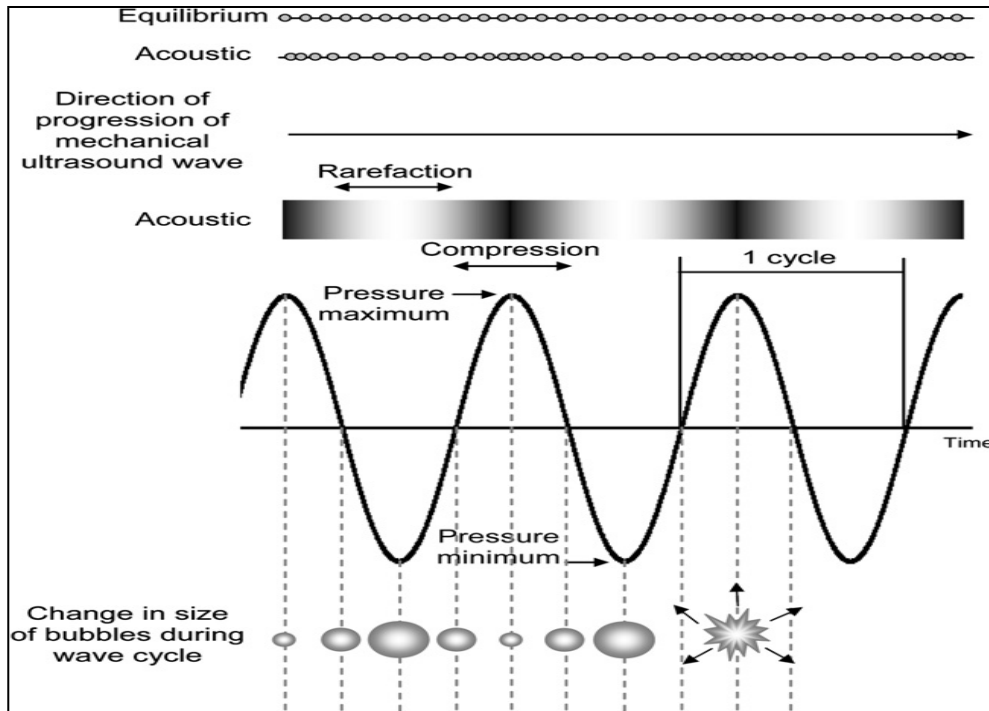
El ultrasonido produce también un calentamiento del material tratado como resultado de la absorción de la energía acústica en membranas y biomateriales, especialmente en sus interfases (Floros-Liang, 1994), y produce en líquidos de baja viscosidad y en gases, una agitación violenta que puede ser utilizada para dispersar partículas (Ensminger, 1988). En los límites de capa de líquido y sólido o de gas y sólido, las ondas acústicas producen una turbulencia extrema conocida como corriente acústica o microcorriente (Nyborg, 1965).

Otros efectos en los materiales que son sometidos a ondas sonoras de alta intensidad son la compresión y rarefacción sucesivas, las cuales se utilizan en el secado de productos de origen vegetal. La compresión se refiere a regiones densas en las cuales un gran número de moléculas se agrupan acercándose mucho entre sí, mientras que la rarefacción se refiere a regiones que tienen relativamente pocas moléculas y corresponden a regiones de baja presión<sup>1</sup>. Es decir, se pasa de una zona de alta presión a una de baja presión de acuerdo a la densidad de moléculas.

---

<sup>1</sup> Compresión y rarefacción. Recuperado el 12 de Diciembre de 2011 de:  
<http://www.angelfire.com/empire/seigfrid/Compresionesyrarefacciones.html>





**Figura 2.** Cavitación ultrasónica (Fuente: Soria et al., 2010).

En carnes se ha demostrado que la exposición al ultrasonido produce ablandamiento del tejido (Roberts, 1993) y adicionalmente facilita la liberación de proteínas sarcoplásmicas, responsables de la estructura en carnes procesadas. Se ha reportado también que el ultrasonido de alta intensidad es de utilidad en procesos de cristalización por cuanto las pequeñas burbujas formadas durante la cavitación podrían influenciar y dirigir la nucleación y posterior crecimiento de los cristales (Mason et al., 1996). Por otro lado, prolongadas exposiciones a ultrasonido de alta intensidad han demostrado inhibir la acción catalítica de algunas enzimas como la peroxidasa y la pepsina. Sin embargo, algunos estudios han demostrado efectos contrarios después de tratamientos cortos de ultrasonido, debido quizás al rompimiento de agregados moleculares que hacen que la enzima esté más dispuesta para la reacción (McClements, 1995).

A pesar de todos los mecanismos de acción con los que cuenta esta tecnología para inactivar microorganismos, el efecto que el ultrasonido de alta intensidad pueda generar sobre determinada matriz, es dependiente del número y la intensidad de las burbujas que implosionan por unidad de tiempo, de las condiciones de tratamiento y de las características del medio tratado. De ahí la importancia de profundizar en la influencia de factores intrínsecos sobre la efectividad del tratamiento ultrasónico.

### **3.1.3. APLICACIONES DEL ULTRASONIDO**

La utilización de ondas de ultrasonido a nivel industrial ha sido objeto de investigación durante muchos años, especialmente para el desarrollo de técnicas de análisis no invasivas en el control de calidad. Por otro lado, el ultrasonido de alta intensidad es bien conocido por su efecto en la disminución de tiempos de procesamiento. Es así como la utilización del ultrasonido como complemento a otros procesos puede ayudar a cumplir objetivos de procesamiento en minutos, incluso en segundos, haciendo esta tecnología ventajosa desde el punto de vista de costos, tiempo y proceso.

Por otro lado, el ultrasonido también se constituye como una tecnología promisoría para la destrucción de microorganismos, utilizando temperaturas de procesamiento inferiores a las utilizadas durante la esterilización y, se utiliza, como se mencionó anteriormente para acompañar otras tecnologías de proceso como lo son la extracción, la filtración, la pasteurización, la esterilización, el secado, entre otras. Adicionalmente se utiliza como método antiespumante y para despolimerizar almidones. A continuación son explicados algunos ejemplos de aplicación.

**3.1.3.1 Ultrasonido como método de emulsificación/homogenización.** Cuando dos líquidos inmiscibles son irradiados por ultrasonidos, no siempre es posible mezclarlos y crear una emulsión, ya que una de las fases debe cavitarse y de este modo poder hacer miscibles las dos fases. Durante la cavitación, las burbujas generadas colapsan cerca a la interface existente entre los dos líquidos y este choque resulta en la mezcla eficiente de las dos fases (Soria et al., 2010).

**3.1.3.2. Filtración asistida ultrasónicamente.** La aplicación de energía ultrasónica en la superficie de la membrana utilizada, puede aumentar el flujo del líquido, ya que la permeabilidad intrínseca de la membrana se ve afectada por las ondas de ultrasonido (Kyllönen et al., 2005; Chemat et al. 2011). La filtración asistida ultrasónicamente ha sido exitosamente aplicada para aumentar la filtración de aguas industriales residuales que son consideradas difíciles de procesar (De-Sarabia et al., 2000; Smythe et al., 2000; Kyllönen et al., 2006). Sin embargo, en este proceso hay que controlar la intensidad del ultrasonido, ya que es importante para prevenir el daño de la membrana de filtración (Chemat et al, 2011).

**3.1.3.3. Ultrasonido como método antiespumante.** En la industria de alimentos, la espuma ha sido controlada por procesos mecánicos, disminuyendo las temperaturas de los contenedores de modo que queden debajo de la temperatura ambiente, o también por la adición de químicos anti-espumantes (Mason et al., 2005; Morey et al., 1999; Chemat et al., 2011). Sin embargo, estas tecnologías aún siguen teniendo inconvenientes en su aplicación. Ondas de ultrasonido de alta intensidad ofrecen un método atractivo para controlar el exceso de espuma en los procesos, y al mismo tiempo brindan condiciones estériles, lo que hace de este método particularmente apropiado para la implementación en las industrias alimentaria y farmacéutica (Gallego-Juarez et al., 2002). Como ejemplo se encuentra el control del exceso de espuma en el embotellado de alta velocidad en líneas de latas de bebidas carbónicas, ya que debido a la cavitación (ruptura de burbujas) se da un control casi instantáneamente bajo el haz acústico formado por estas ondas de ultrasonido (Rodríguez et al., 2010).

**3.1.3.4. Ultrasonido en el proceso de desgasificación/de-aireación.** En la industria alimentaria, esta técnica se puede utilizar para las bebidas carbonatadas. En el procesamiento de las bebidas carbonatadas, el objetivo es desplazar el aire de la superficie del líquido con el fin de evitar daños organolépticos del producto por las bacterias y el oxígeno. Este proceso consiste en el acoplamiento de un transductor en la parte exterior de la botella, lo que lleva a la desgasificación. En comparación con agitación mecánica, el método de ultrasonido disminuye el número de botellas rotas y el desbordamiento de la bebida (Boistier-Marquis et al., 1999). Sin embargo aunque la desgasificación ultrasónica asistida es especialmente rápida en sistemas acuosos, es mucho más difícil en líquidos muy viscosos como el chocolate derretido.

**3.1.3.5. Despolimerización por ultrasonido.** La aplicación de ultrasonido de baja potencia por lo general causa una reducción temporal de la viscosidad de los líquidos poliméricos; mientras que tratamientos con altas potencias causan despolimerización y resultan en cambios permanentes en la reología de un producto. Estas modificaciones atribuidas al tratamiento ultrasónico permiten generar productos con características fisicoquímicas y organolépticas diferentes, por lo que esta tecnología es utilizada en el procesamiento de bebidas y el desarrollo de nuevos productos (Lida et al., 2008, Seshadri et al. 2003). Por ejemplo, el ultrasonido puede llevar a varias mejoras en las propiedades de las proteínas tales como las presentes en el suero de

leche, o en el aumento de la solubilidad y la capacidad de formación de espuma en algunos productos que así lo requieran (Jambrak et al, 2009; Jambra et al., 2008).

Otra aplicación común es el uso del ultrasonido para la despolimerización del almidón. Se ha demostrado que la aplicación de sondas ultrasónicas a 20 KHz proporciona una ruta de despolimerización más eficiente en términos de mejores tasas, que los procedimientos de despolimerización realizados químicamente (Zuo et al., 2009).

**3.1.3.6. Ultrasonido y cocción.** Se ha comprobado que la aplicación de ultrasonido en el proceso de cocción genera una mayor retención de la humedad de los productos tratados así como una mayor eficiencia energética, lo que optimiza los tratamientos convencionales solo con temperatura. Esta combinación de tecnologías podría considerarse como una nueva, rápida y energéticamente eficiente técnica que puede mejorar los atributos de textura de productos como la carne cocida (McClements, 1995).

**3.1.3.7. Ultrasonido y corte.** El corte de productos alimenticios mediante la aplicación de ondas de vibración ultrasónica, se ha convertido en un procedimiento de gran impacto a nivel industrial que compite directamente con las tecnologías tradicionales como el corte de alta velocidad y las técnicas comunes como el uso de sierras y cuchillos (Chemat et al., 2011). Se ha comprobado que mediante el proceso ultrasónico se obtiene mayor precisión en los cortes y se produce un menor porcentaje de desperdicios. La aplicación más difundida es en el corte de alimentos frágiles como tartas, pasteles y otros productos de panadería, así como productos grasos (quesos) o viscosos como las gelatinas (Arnold et al., 2009).

Se ha encontrado también que la técnica de corte por ultrasonido permite versatilidad en el tipo de productos que pueden ser procesados, ya que las condiciones de frecuencia y potencia se pueden ajustar a las características de cada alimento y al estado en el que se éstos se encuentren. Por ejemplo, la técnica de corte debe ser diferente para alimentos congelados y descongelados (Brown et al., 2005).

**3.1.3.8 Ultrasonido para mejorar viscosidad y textura.** En la industria alimentaria, el ultrasonido está siendo cada vez más utilizado para la emulsificación de productos como jugos de frutas, mayonesas y salsas de tomate (Chemat et al., 2011), en la homogeneización de la leche (Wu et al., 2000) y en la encapsulación de aromas (Mongenot et al., 2000), así como en la emulsión de aceites comestibles (Chemat et al., 2004). Esta predilección por el método ultrasónico se debe a que esta tecnología requiere menos energía para producir una emulsión, por lo cual es más económica que los métodos convencionales.

**3.1.3.9 Ultrasonido en el proceso de congelación y cristalización.** Bajo la influencia del ultrasonido, la congelación proporciona un tamaño final de los cristales de hielo menor y el daño celular se reduce significativamente (Sun y Li, 2003) ya que el enfriamiento acelerado se logra mediante la mejora de la transferencia de calor, lo cual protege en mayor proporción la estructura del alimento tratado (Li y Sun, 2002a).

El mecanismo de cavitación acústica que produce el ultrasonido actúa como un núcleo de crecimiento de los cristales, por lo que en la congelación, este fenómeno podría dar lugar a cristales de hielo fino y acortar el tiempo entre el inicio de la cristalización y la formación completa de hielo (Roberts, 1993; Chow et al., 2005), reduciendo así los daños a la estructura celular. Adicionalmente el uso de ultrasonido ayuda a prevenir la incrustación de cristales en los elementos de refrigeración, lo que asegura la transferencia de calor eficiente en todo el proceso de enfriamiento.

**3.1.3.10. Ultrasonido en el proceso de descongelación.** Trabajos con ultrasonido para la descongelación de carnes y pescados indican que métodos ultrasónicos son más eficientes que los métodos comunes para la descongelación, ya que se ha logrado disminuir el tiempo de descongelación, lo que reduce las pérdidas por goteo y genera una mejora de la calidad del producto final (Li y Sun 2002b).

**3.1.3.11. Ultrasonido en el proceso de secado.** El secado acústicamente asistido ha sido un tema de interés por muchos años (Cohen et al., 1995) Los métodos tradicionales para la desecación o deshidratación de alimentos por una corriente forzada de aire caliente son bastante económicos, pero la eliminación de la humedad interior toma un tiempo relativamente largo.

Adicionalmente, en el secado, las altas temperaturas pueden dañar propiedades del alimento, tales como el color, el sabor y el valor nutricional del producto rehidratado (Fernandes et al., 2008).

La tecnología ultrasónica de deshidratación osmótica utiliza temperaturas más bajas solucionando el problema de una mayor pérdida de agua y las tasas de ganancia de soluto (Simal et al., 1998). Debido a las bajas temperaturas durante la deshidratación y los tiempos de tratamiento más cortos, cualidades de los alimentos, tales como sabor, color y valor nutritivo se mantienen inalteradas.

Por otro lado, el ultrasonido también se ha utilizado como tratamiento previo antes de la deshidratación de una amplia gama de hortalizas (Jambrak et al., 2007), obteniéndose así una reducción en los tiempos convencionales posteriores como la liofilización y también mejorando las propiedades de rehidratación.

**3.1.3.12. Inactivación microbiana y de enzimas.** La pasteurización térmica convencional y la esterilización son las técnicas más comunes en la actualidad para inactivar los microorganismos y las enzimas en productos alimenticios. Sin embargo, las intensidades de temperatura de tratamiento y el tiempo del proceso también son proporcionales a la cantidad de pérdida de nutrientes, el desarrollo de sabores indeseables y el deterioro de las propiedades funcionales de los alimentos. De esta manera, el ultrasonido proporciona un método para mejorar dichos procesos en virtud de los efectos de la cavitación.

El uso de ultrasonido en la pasteurización continúa siendo de gran interés para la industria láctea. Ha demostrado ser eficaz para la destrucción de *Escherichia. coli*, *Pseudomonas fluorescens* y *Listeria monocytogenes*, sin efectos perjudiciales sobre el total de proteínas o contenido de caseína de la leche pasteurizada (Cameron et al., 2009). El mecanismo de muerte microbiana se debe principalmente al efecto del ultrasonido sobre la envoltura celular, causando adelgazamiento de las membranas celulares, poros en las membranas y producción de radicales libres. Se ha demostrado también que la cavitación puede generar inactivación de enzimas como la pectinmetilesterasa, polifenoloxidasas y peroxidasas, responsables del deterioro de jugos de frutas y vegetales, así como de enzimas diferentes asociadas a la calidad de la leche (O'Donnell et al.,

2010; Tiwari et al., 2009). En combinación con el calor, el ultrasonido puede acelerar el ritmo de la esterilización de los alimentos, disminuyendo así la duración y la intensidad del tratamiento térmico y por ende, el daño resultante. Las ventajas del ultrasonido en la pasteurización por calor incluyen la minimización de la pérdida de sabor, mayor homogeneidad del tratamiento y ahorro de energía (Vercet et al., 2001).

En el capítulo 4 (Estado del arte) se profundiza más acerca de la aplicación de ultrasonido de alta intensidad para reducir carga microbiana en diferentes matrices alimentarias.

### **3.2. MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN ALIMENTOS**

Los microorganismos desempeñan un papel importante en la industria de alimentos. Cada año se pierden enormes cantidades de dinero debido al deterioro o contaminación de los alimentos. Hoy en día las industrias de alimentos envasados, alimentos congelados y alimentos secos o deshidratados, se dedican a preparar alimentos de modo que no sufran deterioro por microorganismos. No todos los microorganismos tienen efectos dañinos sobre los alimentos, ya que se encuentran productos lácteos como el queso, yogurt y suero de leche en los cuales la actividad microbiana interviene de manera benéfica (Madigan et al., 2008; Chemat et al., 2011). Sin embargo, uno de los más grandes desafíos de la industria de alimentos es sacar al mercado productos inocuos y de larga vida útil, para lo que se requiere controlar el crecimiento de microorganismos indeseados. Muchos microorganismos además de acelerar los procesos de deterioro en los alimentos, producen efectos perjudiciales sobre la salud humana, produciendo daños a nivel gastro-intestinal e incluso alteraciones en las respuestas inmunológicas, razón por la cual se hace de gran importancia estudiar técnicas, procesos y procedimientos nuevos para eliminar o inactivar microorganismos de este tipo.

La inactivación de microorganismos patógenos como *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*, así como de levaduras *Sacharomyces cerevisiae* que están asociadas a disminución de la vida útil de diferentes alimentos (Madigan et al., 2008), resulta de gran importancia a la hora de ofrecer al consumidor alimentos inocuos, seguros y de una mayor vida útil. A continuación se describen los aspectos más importantes de algunos de estos

microorganismos con el fin de exponer su importancia a nivel industrial, ya sea por sus efectos nocivos para la salud o deteriorativos en los alimentos.

### **3.2.1. *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* fue reconocido como uno de los microorganismos patógenos transmitidos por alimentos desde 1980. Esta bacteria es un bacilo Gram-positivo, formador de biopelículas, que puede ser aislado de diferentes fuentes alimenticias como la carne, el pollo, huevos, comida de mar, lácteos y vegetales (Golberg et al., 2012). Su temperatura óptima de crecimiento es de 35 a 37°C, pero también puede crecer bajo condiciones de refrigeración (1 a 45°C), y con rangos de pH entre 4,1 a 9,6. Además de esto puede competir con otras bacterias presentes en el medio, ya que sobrevive a temperaturas de refrigeración y altas concentraciones de sal (>10%) (Barbosa et al., 2009; Bermúdez-Barbosa, 2008).

La presencia de *L. monocytogenes* en productos que previamente fueron sometidos a altas temperaturas, podría indicar que el producto presentó una contaminación post-proceso ya que un exceso de tratamiento térmico, elimina la microflora acompañante del medio lo que favorece el crecimiento desinhibido del patógeno (D'Amico et al., 2006). Adicional a esto, en los últimos años se ha demostrado que la resistencia térmica de *L. monocytogenes* ha se ha incrementado significativamente (Pagán et al., 1999). La patología asociada a este microorganismo se conoce como listeriosis, la cual afecta el sistema nervioso central de diferentes animales (incluyendo al hombre), generando meningoencefalitis y hasta la muerte. Se ha reportado que no solo la listeriosis es considerado como un serio problema de salud pública, sino que también se encuentra relacionada con importantes pérdidas económicas debido al alto número de alimentos que se tienen que desechar a causa de su contaminación y a la gran cantidad de cabezas de ganado infectadas que deben ser sacrificadas (Carrasco et al., 2006).

### **3.2.2. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es una bacteria Gram-negativa, no esporulada, flagelada y anaerobia facultativa, cuyo rango óptimo de temperatura es de 22 a 37°C. Normalmente esta bacteria hace parte de la microbiota del tracto intestinal de humanos y animales, por lo que la mayoría de las



cepas son consideradas inocuas. Sin embargo, algunas patogénicas son responsables de causar enfermedades diarreicas que pueden conllevar también a serias complicaciones como deshidratación severa y síndrome urémico hemolítico (Boone,2001).

*Escherichia coli* puede sobrevivir en medios ácidos como los de los jugos de frutas cítricas y también bajo condiciones de refrigeración (D'Amico, 2006). Los límites de crecimiento de esta bacteria se encuentran en rangos aproximados de pH entre 3,4 y 3,6 y de actividad de agua entre 0,955 y 0,965 (Presser et al., 1998). La supervivencia de *E. coli* en medios no entéricos es muy limitada por lo que su presencia en alimentos listos para el consumo se relaciona directamente con la mala manipulación del producto final y contaminación fecal por malas prácticas higiénicas (Presser et al., 1998).

### **3.2.3. *Saccharomyces cerevisiae***

*Saccharomyces cerevisiae* es un hongo levaduriforme que presenta células alargadas, globosas a elipsoidales con gemaciones o blastoconidios multilaterales (de 3,0-10,0 x 4,0-5,1  $\mu\text{m}$ ), de pared lisa en su interior, cuya temperatura óptima de crecimiento es 25°C aproximadamente (Madigan et al., 2008).

*Saccharomyces cerevisiae* (“levadura de la cerveza”) es un hongo ambiental común, componente transitorio de la microbiota intestinal y cutánea humana. Se utiliza ampliamente en la elaboración de vino, cerveza, pan y otros alimentos. Sin embargo, puede llegar a ser un microorganismo que en vez de ofrecer un beneficio, puede causar pérdidas en el sector de alimentos por su propiedad deteriorativa.

*Saccharomyces cerevisiae*, tradicionalmente es considerada como una cepa de uso industrial y se considera segura y puede colonizar el tracto respiratorio, genitourinario y gastrointestinal de los seres humanos de una manera inocua (De Llanos et al., 2006). En estas condiciones, las levaduras pueden crecer sin causar enfermedad. Sin embargo, *S. cerevisiae* puede llegar a ser patógeno en pacientes inmunodeprimidos en los que la infección sistémica puede resultar mortal (Eng et al. 1984; Murphy y Kavanagh, 1999; Smith et al. 2002).

### **3.3. FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO MICROBIANO**

Por lo general, se ha observado que la resistencia de los microorganismos al ultrasonido en cada producto alimenticio es diferente cuando son comparados a nivel experimental. La resistencia microbiana a los tratamientos ultrasónicos aumenta en los alimentos. Este efecto protector depende de la composición del producto y en otros casos de los factores medio ambientales o externos.

Hace más de 40 años Mossel e Ingram, dividieron estos factores en tres grupos: Propiedades físico-químicas del propio alimento (factores intrínsecos), condiciones del ambiente del procesamiento y el almacenamiento (factores extrínsecos) y propiedades e interacciones de los microorganismos presentes (factores implícitos). A continuación se explican con detalle cada uno de estos factores (Madigan et al., 2008).

#### **3.3.1. FACTORES INTRÍNSECOS**

Los factores intrínsecos se refieren a las cualidades inherentes al medio, ya sea una solución tampón, un medio nutritivo (caldo tripticasa de soya) o un alimento. En el caso de los alimentos, los microorganismos son capaces de utilizar sus componentes como fuente de nutrientes y de energía (Gabriel y Nakano, 2010).

Entre los factores intrínsecos se encuentran: pH,  $a_w$  (actividad de agua), nutrientes, sustancias antimicrobianas, estructura biológica. Dentro de los nutrientes se encuentran las vitaminas, las proteínas, los minerales, los azúcares, las grasas, entre otros (Madigan et al., 2008).

El pH de un alimento es la medida de su acidez o alcalinidad, teniendo en cuenta que la escala de pH comienza en cero y termina en 14.0, una solución de pH de 7.0 es considerada como neutra, mientras que los pH menores que 7.0 son considerados como ácidos y los valores mayores a 7.0 como alcalinos. Cada microorganismo tiene un rango de pH dentro del cual es posible el crecimiento y normalmente posee un pH óptimo muy bien definido. De esta manera los microorganismos que crecen a pH bajos se llaman acidófilos, siendo los hongos más tolerantes al ácido que las bacterias. Por otro lado, los microorganismos que son resistentes a pH básicos son

llamados alcalófilos o basófilos y por lo general este tipo de microorganismos se encuentran en suelos altamente carbonatados (Madigan et al., 2008).

Frecuentemente se emplean soluciones tampón o buffer para mantener estable el pH del medio de cultivo, así para pH neutros (pH 6,0-7,5), el tampón fosfato, es uno de los buffer más utilizado (Madigan et al., 2008).

La disponibilidad de agua ( $a_w$ ), es definida como la razón entre la presión de vapor del aire en equilibrio con una sustancia o solución y la presión de vapor, a la misma temperatura del agua pura. Los valores para esta propiedad varían entre 0,0 y 1,0. Esta propiedad es relevante debido a que la mayoría de las veces, el citoplasma celular de los microorganismos posee una mayor concentración de solutos que el medio exterior, de modo que el agua se difunde hacia el interior celular, lo que se conoce como un balance de agua positivo. Sin embargo, cuando una célula está en un ambiente con baja actividad de agua, existe una tendencia de salida del líquido intracelular, hacia el medio externo. Es por eso, que el contenido del medio y la concentración de azúcar y sal, adquiere importancia, ya que al bajar la actividad de agua en el medio, la célula pierde agua y se produce plasmólisis (Madigan et al., 2008). Es aquí donde también entra a ser parte de los factores que afectan el crecimiento, la estructura biológica de la célula, ya que ésta depende de la presión osmótica que puede soportar la pared celular de cada microorganismo.

Por otro lado, factores como la grasa, las proteínas, las sustancias antimicrobianas tienen un gran campo de estudio, ya que cada microorganismo tiene respuestas diferentes a los factores intrínsecos en condiciones de stress o simplemente a los rangos manejados por cada alimento.

### **3.3.2. FACTORES EXTRÍNSECOS**

Los factores extrínsecos se refieren a las cualidades inherentes al medio ambiente como la temperatura de procesamiento, humedad relativa, presencia y concentración de gases atmosféricos.

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que afectan el crecimiento y la supervivencia microbiana. Puede afectar a los microorganismos vivos de dos

maneras: a medida que sube la temperatura, se aumenta la velocidad de las reacciones enzimáticas, y por tanto se aumenta el crecimiento, sin embargo por encima de cierta temperatura las células pueden tener un daño irreversible. Por tanto, para cada microorganismo existe una temperatura mínima por debajo de la cual no existe crecimiento, una temperatura óptima en la cual el crecimiento es más rápido y una temperatura máxima, la cual si se sobrepasa no existe crecimiento y por el contrario si puede haber muerte celular.

Factores como la humedad y los gases concentrados en el ambiente, ayudan a deteriorar las condiciones de crecimiento de los microorganismos, e inclusive llevar a contaminaciones cruzadas entre los mismos.

### **3.3.3. FACTORES IMPLÍCITOS**

Se refieren a la naturaleza biológica de los microorganismos como la tasa de crecimiento, la simbiosis (relación entre dos microorganismos), las interacciones microorganismo-medio, microorganismo-microorganismo, el tamaño del inóculo (concentración inicial para su crecimiento óptimo), entre otros.

Por ejemplo, los microorganismos que son capaces de crecer en ambientes con altas concentraciones de azúcar se llaman osmófilos y los que crecen en alta concentración salina (15-30% de sal) se llaman halófilos extremos (Madigan et al., 2008).

Igualmente, dependiendo de su capacidad de resistencia y adaptación al medio, los microorganismos se pueden clasificar en cuatro grupos en relación con su temperatura óptima: Psicrófilos (temperaturas bajas), mesófilos (temperaturas medias, por lo general 37°C), termófilos (temperaturas altas) e hipertermófilos (con temperaturas muy altas) (Madigan et al., 2008).

En definitiva, los microorganismos crecen mejor cuando todas las condiciones son óptimas. Debajo o por encima de sus condiciones óptimas, su crecimiento se hace más lento.

### 3.4. MICROBIOLOGIA PREDICTIVA

La microbiología predictiva comprende el estudio cuantitativo del comportamiento de los microorganismos en función de factores determinantes (intrínsecos, extrínsecos, de tratamiento), y describe el crecimiento, inhibición e inactivación del microorganismo, lo cual permite predecir su comportamiento durante el proceso, distribución y almacenamiento de alimentos mediante modelos matemáticos (Geeraerd et al., 2000).

Los requerimientos por parte de la industria de alimentos y los consumidores exigen un mayor conocimiento acerca del comportamiento de los microorganismos en los diferentes sistemas alimenticios, por tal razón se hace necesaria la implementación de estrategias rápidas y seguras para evaluar el riesgo microbiológico como los modelos de predicción.

#### 3.4.1. MODELOS PREDICTIVOS

Estudiar la cinética de crecimiento y sus respuestas (parámetros de crecimiento/inactivación), provee información que puede ser utilizada para predecir la seguridad microbiológica de los alimentos o la vida útil de los mismos.

La clasificación de los modelos predictivos aún no tiene un único esquema (McDonald y Sun, 1999). Sin embargo, el esquema propuesto por Whiting y Buchanan (1993) de modelos primarios, secundarios y terciarios, constituye una base sólida para comprender los alcances y limitaciones de cada uno de ellos. Adicional a esto, los modelos predictivos también se han clasificado según su finalidad en modelos cinéticos o probabilísticos y según su base matemática en empíricos o mecanísticos. La disponibilidad de muchos y diferentes modelos, puede hacer que la selección del mejor modelo para un uso particular sea complicada.

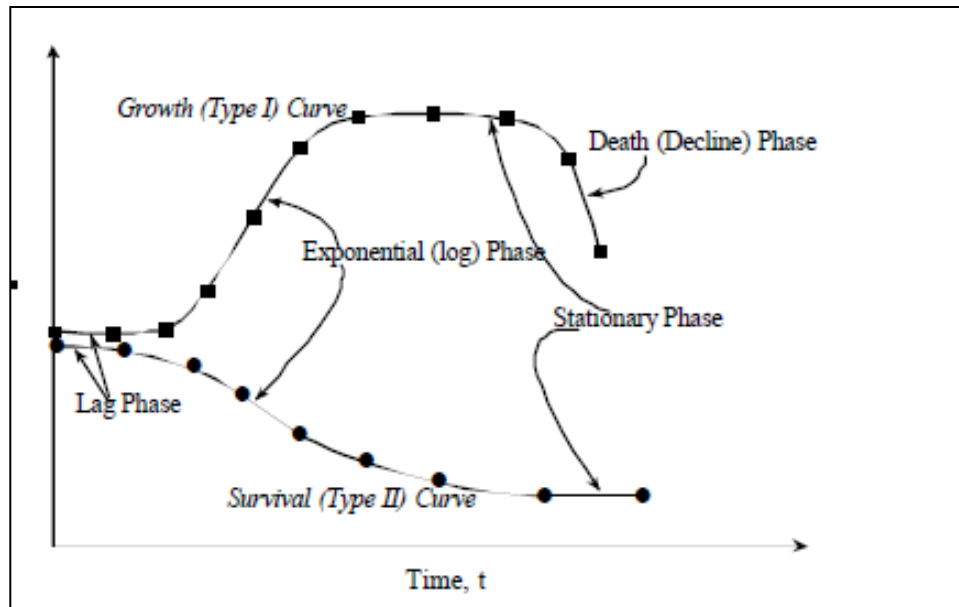
Los **modelos primarios** son aquellos que describen el cambio del número de microorganismos con relación al tiempo, bajo unas condiciones particulares del entorno y de cultivo. La respuesta se puede medir directamente por recuento total, formación de toxinas, nivel de substrato o productos del metabolismo, o bien indirectamente, por medida de densidad óptica o impedancia. Se puede generar información acerca de los parámetros de crecimiento

microbianos, como el tiempo de generación, duración de la fase de adaptación, velocidad o tasa de crecimiento exponencial y densidad máxima de población (Whiting y Buchanan, 1993). Para modelar las curvas de crecimiento e inactivación no térmica, un número de modelos de primer orden se han propuesto. Entre estos modelos se encuentran los que describen el crecimiento y la inactivación como lo son el modelo de Weibull, el modelo log-lineal y sus diferentes adaptaciones.

Los **modelos secundarios** están compuestos por ecuaciones que describen cómo varían los parámetros de crecimiento de los modelos primarios (tasa de crecimiento, duración fase de adaptación, etc.) con cambios en uno o más factores ambientales como la temperatura, el pH, el aw, entre otros. Ejemplos de estas ecuaciones son las basadas en las fórmulas de Arrhenius (Skinner et al., 1994).

Finalmente, **los modelos terciarios** son aplicaciones de uno o más modelos primarios y secundarios, que incorporados a un software informático, facilitan la aplicación de ecuaciones matemáticas para describir comportamientos de este tipo.

Partiendo de un modelo primario y de un microorganismo en un medio nutritivo no limitado, el crecimiento es graficado versus el tiempo como se muestra en la Figura 3, en donde la curva de tipo I, representa el crecimiento microbiano general y la curva de tipo II, muestra una curva de sobrevivencia o de inactivación microbiana.



**Figura 3.** Fases de curva de crecimiento microbiano (Tipo I) y curva de sobrevivencia (Tipo II) (Hajmeer et al., 2002).

La curva tipo I representa el ambiente deseado para el crecimiento bacteriano, y es caracterizada por 4 fases:

- **Fase lag o de latencia:** Cuando una población microbiana se inocula en un medio fresco, el crecimiento de este no ocurre inmediatamente, sino después de cierto tiempo, lo cual se conoce como fase de latencia. Es decir, es una fase en la cual las células se adaptan a la fisiología y bioquímica del medio para explotar sus propiedades cuando encuentren las condiciones adecuadas (Madigan et al., 2008).
- **Fase exponencial:** Es la consecuencia de que una célula se divida en dos, éstas en otras dos y así sucesivamente. De esta manera, cuando se da una adaptación en la fase lag, las células crecen en su ambiente tan rápido como es posible y su tasa es relativamente constante (Madigan et al, 2008; Hajmeer et al., 2002).
- **Fase estacionaria:** En un cultivo donde no ocurre renovación del medio, el crecimiento exponencial se detiene y es donde la tasa de producción es igual a la tasa de mortalidad. En esta fase hay una acumulación de metabolitos, que se encuentran relacionados con la reducción en la tasa de crecimiento de los

microorganismos (Hajmeer et al., 2002). Lo que habitualmente sucede en esta fase es que, o bien un nutriente esencial del medio de cultivo se acaba, o algún producto de desecho se acumula en el medio hasta alcanzar concentraciones inhibitorias del crecimiento exponencial (Madigan et al., 2008).

- **Fase de muerte:** Si la incubación continúa después de que la población alcance la fase estacionaria, las células deben permanecer vivas y metabólicamente activas, pero también deben morir. Si esto último ocurre se dice que las células entran en fase de muerte (Madigan et al., 2008). Esto puede ocurrir cuando hay un incremento en la acumulación de toxinas y se genera un aumento en la lisis bacteriana, y así la tasa de muerte celular excede la tasa a la cual las células se dividen.

Por otro lado la curva tipo II, es caracterizada por 3 fases: La fase lag, la fase exponencial y la fase estacionaria.

Los modelos de crecimiento (modelos predictivos), desarrollados a partir de datos experimentales, incluyen un número de parámetros cinéticos que se explican a continuación:

- **Duración de la fase Lag:** este parámetro mide la cantidad de tiempo que tarda el microorganismo para ajustarse al medio de crecimiento, es decir es el tiempo que tarda la fase lag.
- **Tasa de crecimiento:** Es la velocidad a la cual la población crece y llega a la tasa de crecimiento exponencial, que al analizarlo gráficamente (Figura 3), este parámetro se encuentra relacionado con la pendiente correspondiente a la curva de crecimiento tipo I.
- **Tiempo de generación:** Es el tiempo que se toma la población en el crecimiento exponencial para llegar a la fase estacionaria.



El modelo de Geeraerd et al. (2000), parte de la Ecuación 1., la cual tiene en cuenta las siguientes fases: **(1) fase de adecuación**, la cual ocurre cuando no se presenta una inactivación instantánea a través del tiempo luego de aplicar un tratamiento y gráficamente se refleja en la aparición de un "hombro"; **(2) fase de inactivación**, que se explica por lo general con el modelo lineal y por último **(3) fase final**, que posee información acerca de la **población residual**, lo que se llama en este modelo "la cola".

$$\text{Log}_{10}(\text{N}) = \frac{\text{Log}_{10}((10^{\text{Log}_{10}(\text{N}_0)} - 10^{\text{Log}_{10}(\text{N}_{\text{res}})}) * e^{(-k_{\text{max}} * t)} * e^{k_{\text{max}} * \text{SI}})}{1 + (e^{(k_{\text{max}} * \text{SI})} - 1) * e^{(-k_{\text{max}} * t)} + 10^{\text{Log}_{10}(\text{N}_{\text{res}})}}$$

**Ecuación 1.** Modelo de crecimiento de Geeraerd et al (2000) - Log línea + Shoulder + tail.

En donde:

**Log<sub>10</sub>(N<sub>0</sub>)** se refiere a la población microbiana en el tiempo 0,

**k<sub>max</sub>** es la tasa máxima de inactivación específica,

**t** es el tiempo,

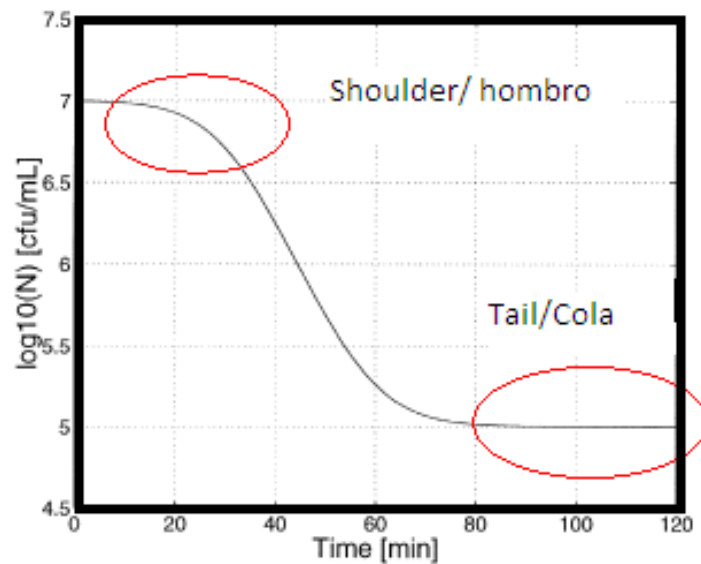
**SI** es la distancia del hombro y

**Log<sub>10</sub>(N<sub>res</sub>)** se refiere a la subpoblación microbiana existente después del tratamiento.

En el modelo, la longitud del hombro, la tasa de inactivación y el nivel de asimetría no deben depender el uno del otro. Esta característica implica que el modelo debe incluir una inactivación log-lineal. Adicionalmente, el modelo debe de ser dinámico, es decir que el modelo no debe depender de la población inicial explícitamente y debe describir la población microbiana absoluta (no la población relativa a la población inicial).

Los modelos de inactivación microbiana se desarrollan por lo general, a partir de la curva tipo II (Figura 3) o utilizando el modelo más sencillo planteado que sería de tipo lineal.

Con base en modelos de primer orden, se han realizado ajustes y variaciones al modelo lineal, al que se le han incluido por ejemplo, los conceptos de hombro y cola (Figura 4), como es el caso de los modelos de Weibull y Double-Weibull (Corroler et al., 2006, Geeraerd et al., 2000), entre otros.



**Figura 4.** Modelo Log-linear+Shoulder+Tail (Geeraerd et al., 2000).

De acuerdo con las cinéticas de crecimiento o inactivación que se obtengan a partir de los datos experimentales, es importante seleccionar un modelo que tenga la capacidad de describir el comportamiento microbiano. Para esto, es necesario evaluar su ajuste.

### 3.4.2. AJUSTE DE MODELOS PREDICTIVOS

El ajuste del modelo a los datos experimentales, se relaciona con la capacidad de un modelo matemático determinado, para describir el comportamiento de un microorganismo de interés en condiciones previamente establecidas. Los criterios a evaluar para saber si el modelo se ajusta adecuadamente a los datos experimentales son: La medida del error o residuo, el coeficiente de determinación, el análisis de residuos y la estimación de los parámetros cinéticos. De estas medidas, el coeficiente de determinación es el más utilizado, ya que se interpreta como el porcentaje de la variabilidad de la variable dependiente explicada por el modelo (Sarabia et al., 2005).

Estas medidas de calidad y ajuste explican en gran medida en qué porcentaje el modelo explica la variabilidad del experimento y si el ajuste es bueno. Por ejemplo, si para un experimento se obtuvo un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) del 0.99, esto indica que tal modelo explica el 99% de la variabilidad del experimento y que por tanto es posible concluir preliminarmente que en caso de existir otra fuente de variación que afecte la respuesta, su efecto sobre esta variable de respuesta será muy pequeño. Es decir, la respuesta del experimento depende en un 99% de los factores evaluados en el experimento (Sarabia et al., 2005).

En el caso que existan dos modelos que se ajusten adecuadamente, similares en varios aspectos, se debe preferir el más sencillo, el que requiera de menos supuestos para su construcción, ya que de ello depende su comprensión, aplicabilidad y facilidad de uso (Baranyi et al., 1999).

### **3.4.3 HERRAMIENTAS DE MODELACIÓN**

Actualmente se encuentran disponibles a nivel comercial varios paquetes informáticos de modelización microbiana, los cuales varían en complejidad, desde una sencilla ecuación en una hoja de cálculo, a sistemas expertos o programas de simulación de estimación del riesgo. En general, los usuarios de estos programas no necesitan estar preparados en las técnicas de modelización predictiva y como consecuencia, hacen de la microbiología predictiva una herramienta fácilmente accesible y poderosa para todas las áreas de la investigación e industria de alimentos (Buchanan, 1993).

Entre los paquetes informáticos predictivos se encuentran programas como el Pathogen Modeling Program (PMP). Este software utiliza modelos con múltiples variables, basados en el uso de la función de Gompertz (Ecuación 2), en combinación con análisis de respuesta en superficie y fue desarrollado usando gran cantidad de datos experimentales del comportamiento de microorganismos patógenos en medios líquidos (Buchanan, 1993).

$$L(t) = A + C * e^{(-e^{-B*(t-M)})}$$

**ECUACIÓN 2.** Ecuación de Gompertz modificada (Zwietering et al., 1990).

**En donde:**

**L(t)**= Logaritmo del número de bacterias en el tiempo t ( en horas).

**A**= Número de bacterias cuando el tiempo disminuye indefinidamente.

**C**= Cantidad de crecimiento que ocurre cuando el tiempo aumenta indefinidamente.

**M**= Tiempo en el que el valor absoluto de crecimiento es máximo.

**B**= Tasa relativa de crecimiento a M.

Por otro lado se encuentran herramientas como el Food Spoilage Predictor (FSP) y el Seafood Spoilage Predictor (SSP), los cuales predicen e ilustran el efecto de la temperaturas y/o de los niveles de CO<sub>2</sub> sobre el crecimiento bacterias alterantes de productos y sobre la vida comercial de dichos productos (Dalgaard et al., 2002), e interfaces más sencillas de manejar como Ginafit®.

**3.4.3.1 GINAFIT® (Geeraerd and Van Impe inactivation model fitting tool).** Esta herramienta es útil para modelar la supervivencia microbiana a partir de datos experimentales sobre la evolución de la población microbiana versus el tiempo. Este programa presenta diez tipos de modelos, entre los cuales se encuentran los siguientes: (1) curvas clásicas log-lineales (2) curvas modificadas con un hombro, (3) curvas de una cola, (4) curvas de supervivencia mostrando los hombros y cola, (5) curvas cóncavas, (6) curvas convexas, (7) curvas convexas / cóncavas seguidas por una cola, (8) curvas de inactivación bifásica, (9) cinéticas de inactivación bifásica precedidas por un hombro y (10) curvas con un doble cóncavo / convexo en su forma. Estos modelos fueron publicados originalmente como Bigelow y Esty (1920), Cerf (1977), Geeraerd et al. (2000), Mafart et al. (2002), Albert y Mafart (2005), Geeraerd et al. (2005) y Coroller et al. (2006).

Adicionalmente, el programa reporta junto a los valores de parámetros obtenidos, medidas estadísticas, entre la cuales se encuentran: el error estándar de los valores de los parámetros, la suma de errores cuadrados, la media de la suma de errores cuadrados, el R<sup>2</sup> y el R<sup>2</sup> ajustado. Además de un valor llamado T4D, que es el tiempo necesario para una reducción de 4 log de la población microbiana inicial, como originalmente fue propuesto por Buchanan et al. (1993).

## 4. ESTADO DEL ARTE

### 4.1. APLICACIONES DEL ULTRASONIDO EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

La aplicación de ultrasonido para mejorar productos y procesos es mucho menos popular en la industria de alimentos que en otras industrias. Sin embargo, recientemente los grandes avances de investigación en este campo han permitido detectar un gran número de potenciales aplicaciones de importancia para la industria de alimentos. Así, los tratamientos con ultrasonido de alta intensidad se utilizan para afectar la permeabilidad de los tejidos acelerando los procesos de transferencia de masa y facilitando los procesos de extracción de sustancias como enzimas de animales, plantas, levaduras y bacterias. Una de las principales ventajas que presenta esta técnica es la posibilidad de separar la fase líquida de la matriz sólida a baja temperatura sin forzar un cambio de fase (Mason, 1998). Otros estudios relacionados con deshidratación asistida en vegetales, han mostrado pérdidas de peso de hasta el 40%, en muestras sometidas a tratamientos de ultrasonido durante 30 min., lo que ha logrado incrementar el nivel de extracción de sustancias flavonoides hasta en un 95% (De la Fuente Blanco et al., 2004).

Del mismo modo, procesos de ultrasonido son utilizados en la industria alimentaria para: peeling, desintegración de células, extracción (Vilkhu et al., 2008), deshidratación (Deng y Zhao, 2008), activación (aceleración de reacciones enzimáticas), aceleración de fermentación microbiana, mezclado, homogenización (Czank et al., 2010, Ertugay et al., 2004), dispersión de sólidos en líquidos, emulsiones, desgasificación, inspección (Dukhin et al., 2005; Elvira et al., 2005), cristalización de grasas y azúcares, maduración de carnes, limpieza y descontaminación de superficies, tratamientos efluentes, humidificación, estimulación de células vivas y aceleración de procesos de oxidación (Demirdoven et al., 2009).

Como ejemplo de las aplicaciones se encuentran sensores de tipo ultrasónico que han sido explorados para medir propiedades fundamentales y empíricas de alimentos, a nivel de laboratorio y de plantas de procesamiento (Coupland, 2004) y también equipos de ultrasonido para tratamiento de productos en el caso de preservación, desinfección e inactivación. De esta

manera el ultrasonido ha sido considerado solo o en combinación con otros métodos una técnica efectiva para análisis y preservación, ya que su uso puede reducir temperaturas de procesamiento, tiempos de procesamiento, o ambos en la pasteurización de alimentos líquidos como la leche, el vino, jugos de naranja, jugos de manzana, entre otros.

## **4.2. INACTIVACION MICROBIANA POR ULTRASONIDO**

La inactivación microbiana se relaciona con el fenómeno de cavitación cuya intensidad se afecta con la temperatura y características fisicoquímicas del medio de propagación de las ondas ultrasónicas (Pagán et al., 1999, Villamiel et al., 2000). Soh et al. (2003), reportaron que la implosión de burbujas durante la cavitación acelera las partículas que se encuentran alrededor (sólidos inmersos), aumentando su choque e incrementando el efecto de cavitación. En otro trabajo, Ince et al. (2001) encontraron que la concentración de *Escherichia coli* en agua desionizada sometida a tratamiento de ultrasonido (20 KHz), se redujo notoriamente después de adicionar sólidos (gránulos de cerámica, partículas metálicas de zinc y carbón activado) al medio, posiblemente a causa de un aumento en el fenómeno de cavitación. También se ha argumentado que el contenido graso presente en la leche podría estar ejerciendo un efecto protector contra el efecto del ultrasonido para *Listeria innocua*, siendo más efectiva la inactivación en leches con menor contenido de grasa (Bermúdez et al., 2008).

Igualmente, el ultrasonido de alta intensidad ha sido utilizado para reducir la carga microbiana en varios tipos de alimentos debido a la alteración de la membrana celular de los microorganismos lo cual afecta los procesos homeostáticos y por lo tanto su integridad (Tabla 2). El uso del ultrasonido para el rompimiento de células es un método de laboratorio estandarizado, cuya eficiencia de lisis es de casi el 100%. El efecto bactericida del ultrasonido se atribuye generalmente a la cavitación intracelular. Estos shocks micro-mecánicos alteran componentes estructurales y funcionales de la célula hasta el punto de generar lisis celular. Sin embargo, este tratamiento de sonicación se lleva a cabo para volúmenes pequeños y en condiciones controladas de temperatura. Para condiciones industriales de procesamiento de alimentos aparecen factores que previenen se alcance tal eficiencia.

Lee et al. (1989) obtuvieron mediante tratamiento ultrasónico durante 10 minutos, una reducción de aproximadamente 4,0 ciclos y 0,8 ciclos logarítmicos para *Salmonella* en agua de peptona y leche achocolatada, respectivamente. Lilliard (1994) reportó la reducción de la concentración en *Salmonella* en piel de pollo sumergida en agua clorinada en un rango de 2,5 a 4,0 ciclos logarítmicos. Ordoñez et al. (1987) estudiaron el uso del ultrasonido asistido por temperaturas inferiores a 62°C logrando una reducción del valor de D para *S. aureus* del 63% en buffer de fosfato y del 43% en leche UHT. Según Knorr et al. (2004), tratamientos de ultrasonido durante 300 segundos a potencias de 24,6 W y 42,0 W reducen la concentración de *E. coli* en 1.0 y 2.0 ciclos logarítmicos, respectivamente.

En la Tabla 2, se presentan otros estudios en los que se ha comprobado la efectividad de tratamientos con ultrasonido de alta intensidad para reducir carga microbiana en alimentos. Sin embargo, en estos estudios no se ha relacionado el efecto de los factores implícitos y extrínsecos con las cinéticas de inactivación microbiana, por lo cual es necesario todavía profundizar más acerca del efecto combinado de la frecuencia y el tiempo del tratamiento ultrasónico sobre la carga microbiana, además de los efectos que pueda tener la composición del medio.

**Tabla 2.** Efecto del ultrasonido en microorganismos (Fuente: Autor).

MICROORGANISMO	CONDICIONES DE TRATAMIENTO	RESULTADOS	REFERENCIAS
<i>Pichia fermentans</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Frecuencia: 20KHz,</li> <li>- Amplitud: 24.4 a 61.0µm,</li> <li>- Tiempo: 2 a 10 minutos.</li> </ul>	Se observaron reducciones de crecimiento significativas: 5 ciclos logarítmicos a la mayor amplitud utilizada y con el máximo tiempo aplicado durante el tratamiento.	Adekunte et al.(2010, b)
<i>Listeria monocytogenes</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Frecuencia: 20 KHz,</li> <li>- Potencia: 100W,</li> <li>- Temperatura: 20 a 57°C.</li> </ul>	El tratamiento ultrasónico a 20°C generó una reducción significativa de 1,93 log UFC/ml (98.8%), comparada con un control, que fue leche UHT inoculada pero sin tratar.	D'Amico et al. (2006).
<i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Escherichia coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Frecuencia: 24KHz,</li> <li>- Amplitudes: 0, 40, 72 y 120µm,</li> <li>- Temperatura: 20 a 57°C,</li> <li>- Tiempo: 30 minutos.</li> </ul>	Los resultados mostraron un decrecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> mayor a 5,0 ciclos logarítmicos para el tratamiento de termosonicación luego de un periodo de 10 a 20 minutos de tratamiento. Por otro lado para la bacteria Gram-negativa se obtuvo una reducción de 3,0 ciclos logarítmicos en los 10 minutos de tratamiento.	Bermúdez-Aguirre et al. (2009).
<i>Escherichia coli</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Lactobacillus acidophilus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Frecuencia: 20KHz,</li> <li>- Amplitud de 24µm para diferentes intervalos de tiempo.</li> </ul>	<i>Escherichia coli</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , tuvieron una reducción mayor al 99% en ambos medios (solución salina y leche UHT), mientras que <i>Lactobacillus acidophilus</i> , tuvo una reducción del 72% y del 84% en solución salina y leche, respectivamente.	Cameron et al. (2008).
<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Frecuencia: 20 KHz,</li> <li>- Potencia: 100W,</li> <li>- Temperatura: 20 y 57°C.</li> </ul>	No hubo diferencias significativas entre tratamientos ultrasónicos y térmicos (20°C y 57°C). El tratamiento ultrasónico logró una reducción de 5,00 log UFC/ml para <i>Escherichia coli</i> y de 2,96 log UFC/ml para <i>Staphylococcus aureus</i> .	D'Amico et al. (2006).



**Tabla 2.** Efecto del ultrasonido en microorganismos (continuación).

MICROORGANISMO	CONDICIONES DE TRATAMIENTO	RESULTADOS	REFERENCIAS
<i>Escherichia coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Frecuencia: 20KHz,</li> <li>- Amplitud: 124µm,</li> <li>- Temperatura: 61°C.</li> </ul>	La población de <i>Escherichia coli</i> tuvo una reducción de 4 ciclos logarítmicos en un tiempo de 4 minutos.	Lee et al. (2009).
<i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Frecuencia: 20KHz,</li> <li>- Amplitud: 120µm,</li> <li>- Temperatura: 72°C.</li> </ul>	La reducción fue de 4,1 ciclos logarítmicos para <i>Pseudomonas fluorescens</i> y de 2,7 ciclos logarítmicos para <i>Streptococcus thermophilus</i> .	Villamiel et al. (2000).
<i>Cronobacter sakazakii</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella serovar</i> Enteritidis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Frecuencia: 20KHz,</li> <li>- Amplitud de 34 a 145µm,</li> <li>- Temperatura: 35°C,</li> <li>- Presión: 0-300kPa.</li> </ul>	El pH y la temperatura de crecimiento no tuvieron influencia significativa en la resistencia de la bacteria, y se presentó una relación exponencial entre la amplitud de las ondas ultrasónicas y las reducciones encontradas.	Arroyo et al. (2011).
<i>Salmonella serovar</i> Enteritidis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Frecuencia: 20KHz,</li> <li>- Amplitud: 117µm,</li> <li>- Temperatura: 35°C,</li> <li>- Presión: 200kPa.</li> </ul>	La concentración de <i>Salmonella serovar</i> Enteritidis por manosonicación y a bajas actividades de agua no presentó cambios significativos después de los tratamientos.	Alvarez et al. (2003).
<i>Listeria monocytogenes</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Frecuencia: 20KHz,</li> <li>- Amplitud: 117µm,</li> <li>- Temperatura: 40°C,</li> <li>- Presión: 200kPa.</li> </ul>	La tasa de inactivación por tratamiento de manotermosonicación aumentó exponencialmente con la amplitud de las ondas ultrasónicas en un rango de 62 a 150 µm.	Pagán et al. (1999).
<i>Escherichia coli</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Frecuencia: 20KHz,</li> <li>- Potencia: 17.6W.</li> </ul>	<i>Escherichia coli</i> resultó tener mayor sensibilidad al ser comparada con <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , al responder en menor tiempo al tratamiento, aunque los estudios indican que la membrana citoplasmática no fue considerablemente afectada por el tratamiento.	Ananta et al. (2005).

**Tabla 2.** Efecto del ultrasonido en microorganismos (continuación).

MICROORGANISMO	CONDICIONES DE TRATAMIENTO	RESULTADOS	REFERENCIAS
<i>Listeria innocua</i>	- Frecuencia: 24KHz, - Amplitud: 120µm, - Potencia: 400W, - Temperatura: 63°C.	Tratamientos de 30 minutos produjeron una reducción de 5 ciclos logarítmicos, y la inactivación generada fue típica de un modelo Weibulliano.	Bermúdez-Aguirre et al. (2009).
<i>Salmonella serovar Enteriditis</i>	- Frecuencia: 24KHz, - Amplitud: 60µm, - Potencia: 400W, - Volumen: 100 a 1200mL.	A mayor volumen de muestra tratada se presentó un mayor decrecimiento en la energía aplicada y aumentó el tiempo para el tratamiento de reducción.	Cabeza et al. (2010).
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- Frecuencia: 20KHz, - Amplitud: 124µm, - Potencia: 750W.	<i>Escherichia coli</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tuvieron reducciones mayores al 99% luego del tratamiento ultrasónico, mientras que <i>Lactobacillus acidophilus</i> presentó reducciones del 72% en solución salina y del 84% en leche.	Cameron et al. (2008).
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Escherichia coli</i>	- Frecuencia: 20KHz, - Amplitud: 95µm, - Flujo continuo (0.2L/min), - Temperatura: 40°C, - Combinación con Luz UV.	Se observaron efectos favorables a nivel de inactivación microbiana cuando se utilizaron los tratamientos combinados, no seriados.	Char et al. (2010).
<i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i>	- Frecuencia: 20KHz, - Potencia: 150W.	El tratamiento ultrasónico fue efectivo para inactivar <i>Escherichia coli</i> (D=5.94 min), sin embargo <i>Staphylococcus epidermidis</i> mostró resistencia al tratamiento (D=16.01 min).	Czank et al. (2010).
<i>Pseudomonas spp.</i> <i>Clostridium perfringes</i>	- Frecuencia: 24KHz, - Potencia: 1500W/L, - Tiempo: 60 minutos.	La destrucción de <i>Pseudomonas spp.</i> fue del 99.7%, pero la destrucción de <i>Clostridium perfringes</i> (bacteria Gram-positiva) fue del 66%.	Drakopoulou et al. (2009).

### **4.3. CONDICIONES INTRÍNSECAS, EXTRÍNSECAS E IMPLÍCITAS QUE AFECTAN LA INACTIVACIÓN MICROBIANA POR ULTRASONIDO**

Como se ha descrito anteriormente, la inactivación microbiana por ultrasonido depende de diversos factores que pueden ser clasificados de acuerdo con las condiciones de tratamiento, las características microbianas y los factores ambientales. En la Tabla 3 se presentan algunos de los estudios encontrados en los que se hace una aproximación al análisis de estos factores luego de aplicar tratamientos ultrasónicos. Sin embargo no se han encontrado estudios sistemáticos que involucren la interacción de varios de estos factores y su relación con las cinéticas de inactivación microbiana. Por el contrario, la mayoría de los reportes encontrados se han enfocado en estudiar el efecto de los tratamientos sobre las propiedades fisicoquímicas de los alimentos como se presenta a continuación.

**Tabla 3.** Efecto del ultrasonido en productos alimenticios (Fuente: Autor).

PRODUCTO	CONDICIONES	EFECTOS DEL ULTRASONIDO	REFERENCIAS
Jugo de tomate	- Frecuencia: 20KHz, - Amplitud: 24.4 y 61.0µm, - Tiempo: 2 a 10 minutos.	Entre el control y las muestras sonicadas, independientemente del nivel de amplitud o del tiempo del tratamiento. no se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para variables como pH, °Brix y acidez.	Adekunte et al. (2010, a).
Procesamiento de alimentos	- Frecuencias: 20 a 35KHz.	Esta investigación mostró que reacciones no deseadas entre los radicales libres generados por el ultrasonido y los ingredientes de un alimento pueden ser minimizadas seleccionando bajas frecuencias de ultrasonido para el procesamiento del alimento.	Ashokkumar et al. (2008).
Leche	- Frecuencia: 24KHz, - Amplitudes: 0, 40, 72 y 120µm, - Temperatura: 20-57°C, - Tiempo: 30 minutos.	Para el color se observó, que se produjeron cambios de luminosidad importantes a medida que la intensidad del ultrasonido aumentaba. Así mismo se encontró mayor nivel de homogenización de los glóbulos de grasa, cuando se aplicaron tratamientos más prolongados.	Bermúdez-Aguirre et al. (2009).
Leche	- Frecuencia: 24KHz, - Amplitudes: 0, 40, 72 y 120µm, - Temperatura: 20-57°C, - Tiempo: 30 minutos.	Para un contenido graso de 1% y 2%, la inactivación fue de 4.5 y 3.2 log UFC/ml, indicando que a medida que el contenido graso iba decreciendo, la inactivación aumentaba, por lo cual se plantea la hipótesis de que la presencia de glóbulos grasos crea un efecto protector en las células.	Bermúdez-Aguirre et al. (2008).
Fresa (fruta)	- Frecuencias: 25, 28, 40 y 59 KHz, - Temperatura: 20°C, - Tiempo: 10 minutos.	El tratamiento no generó efectos desfavorables en cuanto a firmeza, acidez titulable, contenido de sólidos solubles y vitamina C del producto tratado.	Cao et al. (2010).
Leche	- Frecuencia: 24KHz, - Microtip: 22mm de Diámetro, - Tiempos: 2, 4, 8 y 16 minutos.	Se observaron reducciones de hasta 2.1 ciclos logarítmicos para tres tipos de leche diferente.	Chouliara et al. (2010).

**Tabla 3.** Efecto del ultrasonido en productos alimenticios (continuación).

PRODUCTO	CONDICIONES	EFFECTOS DEL ULTRASONIDO	REFERENCIAS
Leche y cidra de manzana	- Frecuencia: 20 KHz, - Potencia: 100W, - Temperatura: 20 a 57°C.	Independientemente del nivel de amplitud o el tiempo del tratamiento, para las variables pH, °Brix y acidez, no se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las muestras sonicadas y el control.	D'Amico, et al. (2006).
Jugo de naranja sonicado y fortificado con sodio	- Frecuencia: 20KHz, - Amplitudes: 59.5, 71.4 y 89.25µm, - Tiempo: 2, 4, 6, 8 y 10 minutos.	Independientemente del nivel de amplitud o el tiempo del tratamiento, para las variables pH, °Brix y acidez, entre las muestras sonicadas y el control no se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).	Gómez-López et al. (2010).
Fresa (fruta)	- Frecuencia: 40KHz, - Potencias: 250 a 450W, - Tiempo: 5 a 15 minutos.	Tratamientos ultrasónicos de 9.8 minutos a 250W de potencia, fueron efectivos para aumentar significativamente la vida útil de la fresa.	Cao et al. (2009).
Jugo de naranja y jugo de manzana	- Frecuencia: 20KHz, - Amplitud: 95µm, en flujo continuo (0.2 L/min), - Temperatura: 40°C.	Los tratamientos aplicados no generaron cambios desfavorables en las propiedades intrínsecas y nutricionales de los jugos.	Char et al. (2010).
Leche	- Frecuencia: 20KHz, - Potencia: 150W.	Se obtuvo un alto nivel de homogenización de las muestras al aplicar tratamientos entre 2 y 5 minutos.	Czank et al. (2010).
Agua	- Frecuencia: 24KHz, - Potencia: 1500W/L, - Tiempo: 60 minutos.	Se inactivaron bacterias Gram-negativas totales, coliformes y <i>Pseudomonas spp.</i> en un 99.5%, 99.2% y 99.7%, respectivamente. Y para <i>Clostridium perfringens</i> (bacteria Gram-positiva) la inactivación fue del 66%.	Drakopoulou et al. (2009).

#### 4.3.1. TIEMPO DE TRATAMIENTO ULTRASÓNICO

Se ha reportado que por lo general, la inactivación microbiana aumenta con el tiempo de tratamiento. De acuerdo con un estudio desarrollado por Álvarez et al. (2000), se encontró una relación exponencial entre la fracción de supervivencia microbiana y el tiempo de tratamiento ultrasónico. Sin embargo, en otros estudios, el tiempo de tratamiento necesario para obtener un

nivel determinado de inactivación microbiana, decrece drásticamente a medida que el nivel ultrasonido y las temperaturas aumentan.

En un estudio realizado por Adekunle et al., (2010), se observó que el cultivo de *C. sakasakii* ATCC 11467 fue reducido 6,86 ciclos logarítmicos en su concentración celular, bajo tratamientos de ultrasonido de 2,5 minutos, con 61µm de amplitud, 20 KHz de frecuencia y temperatura de 50°C. Esto sugiere que aunque el tiempo es un factor que afecta la tasa de inactivación, también se encuentra influenciado por otros factores como temperatura, amplitud, frecuencia y potencia del tratamiento ultrasónico.

En un estudio de Gomez-López et al. (2010), se encontró también que tratamientos ultrasónicos a 20KHz y amplitudes de 59,5, 71,4 y 89,25µm, aplicados de manera continua a jugo de naranja fortificado con calcio, durante 2, 4, 6, 8 y 10 minutos, generaron reducciones de hasta 1,5 ciclos logarítmicos a medida que aumentaba el tiempo, haciendo de esta variable parte relevante en el proceso de tratamiento.

#### **4.3.2. PRESIÓN HIDROSTÁTICA**

De acuerdo con resultados reportados por Álvarez et al. (2000), la inactivación microbiana por ultrasonido de alta intensidad, se potencializa con la presión hidrostática. Por esto, los tratamientos de manosonicación podrían llegar a ser más efectivos que los tratamientos donde solo se aplican ondas ultrasónicas. Al parecer, la presión hidrostática ejerce un efecto sinérgico en este tipo de tratamientos, ya que al aumentar la intensidad de la presión, la implosión de las burbujas durante la cavitación también aumenta, así como el número de burbujas que implosionan por unidad de tiempo.

#### **4.3.3. FRECUENCIA Y AMPLITUD**

En estudios previos realizados por el grupo de investigación en Procesos Agroindustriales de la Universidad de La Sabana y la empresa Productos Naturales de la Sabana Alquería S.A, se observó que tanto la frecuencia, como la potencia ultrasónica transmitida al medio tuvieron un efecto significativo ( $\alpha=0,05$ ) sobre la respuesta de inactivación microbiana presentada por

microorganismos estudiados como *E. coli* y *L. monocytogenes* en leche entera, siendo los tratamientos de mayor intensidad y de mayor potencia, los más efectivos con reducciones entre 2 y 6 ciclos logarítmicos a 5 minutos de tratamiento.

#### **4.3.4. TEMPERATURA**

Se ha demostrado que el ultrasonido en combinación con tratamientos térmicos tiene una efectividad mayor a la encontrada en tratamientos en los cuales sólo se utiliza el poder ultrasónico (Bermudez et al., 2009).

Adicionalmente, es bien conocido que la temperatura juega un papel importante como factor extrínseco que afecta el crecimiento y viabilidad de los microorganismos, por lo que este factor es muy utilizado para potencializar el efecto de inactivación de diferentes tipos de tecnologías. Es por eso que los tratamientos térmicos menos drásticos en combinación con ultrasonido se perfilan como una nueva alternativa para la conservación de alimentos sin afectar significativamente sus propiedades nutricionales.

#### **4.3.5. MICROORGANISMOS**

Se ha generalizado el hecho de que células de mayor tamaño son más sensibles a tratamientos físicos, en los que además de los térmicos se puede incluir los ultrasónicos. Así mismo, se ha reportado que bacterias Gram-positivas son más resistentes que las bacterias Gram-negativas a este tipo de tratamientos. Lo anterior se puede deber a que las bacterias Gram-positivas pueden ser más resistentes por la naturaleza de su pared celular, debido al grosor y complejidad de su capa de peptidoglicano más fuertemente adherida que la de las bacterias Gram-negativas. De igual forma, se ha sugerido que entre más grande sea la superficie de la célula, es más factible que se generen mayor cantidad de poros durante el proceso de cavitación y por ende haya una pérdida de estabilidad celular con mayor rapidez (Cameron et al., 2008).

Por esta razón, la naturaleza y estructura de los microorganismos, determinarán la resistencia o sensibilidad a los tratamientos con ultrasonido, y deben considerarse como un factor

importante para definir las condiciones de tratamiento (frecuencia, potencia, tiempo, etc.) para asegurar su efectividad.

#### **4.3.6. pH**

El efecto del pH sobre la resistencia de los microorganismos al ultrasonido, también puede ser considerado como un factor importante para asegurar la efectividad en los tratamientos. Aunque algunos autores sugieren que el pH no afecta la cinética de inactivación microbiana por ultrasonido, otros autores han encontrado que a pH ácidos la resistencia de ciertos microorganismos se reduce significativamente, lo que por ende favorece la efectividad de los tratamientos (Earnshaw et al., 1995). Es así como también se ha reportado que normalmente, la resistencia microbiana al calor decrece en medios ácidos. Sin embargo, autores como Barbosa-Canovas et al. (2008), han observado que la resistencia al ultrasonido de los microorganismos es independiente de las condiciones de acidez del medio.

#### **4.3.7. COMPOSICIÓN DEL MEDIO**

Se ha observado que la respuesta de los microorganismos a los tratamientos con ultrasonido es dependiente del tipo de medio utilizado en los tratamientos. Se han encontrado diferencias significativas en la resistencia de los microorganismos cuando se tratan en matrices alimentarias y cuando se tratan en caldos microbiológicos (Earnshaw et al., 1995).

En general, la resistencia microbiana a los tratamientos ultrasónicos aumenta en los alimentos. Sin embargo, este efecto protector depende de la composición del producto. Por ejemplo *L. monocytogenes* mostró la misma resistencia al tratamiento ultrasónico en leche, que al tratamiento aplicado en buffer McIlvaine. Pero por el contrario, *Salmonella senftenberg* mostró una resistencia dos veces más grande en clara de huevo que en el buffer McIlvaine (Alvarez et al., 1999).

En otros estudios se ha observado que la adición de sacarosa al medio aumenta de 25 a 30 veces la resistencia térmica de *Salmonella* y *L. monocytogenes* (Álvarez et al., 2000). Esta



resistencia es influenciada por factores como la actividad de agua del medio (Fletcher et al., 1998), ya que el efecto protector a tratamientos térmicos es mayor en  $a_w$  reducidos (Alvarez et al., 2003).

Por otro lado, altas concentraciones de sal en el medio pueden mostrar un incremento en la resistencia del microorganismo al calor y al mismo tiempo el contenido graso de la leche puede ser también una barrera para la inactivación de bacterias (Bermudez y Barbosa, 2008). Se piensa que hay una resistencia de acuerdo al contenido graso de los alimentos, ya que crean una especie de capa protectora para algunos microorganismos presentes, evitando el efecto de cavitación e implosión de las burbujas en la pared de la célula y disminuyendo así el efecto del tratamiento con ultrasonido.

En uno de los estudios encontrados, se observó que después de un tiempo de 30 minutos de tratamiento con ultrasonido, la leche entera (3,47% en grasa) presentó un bajo nivel de inactivación celular (2,5 log UFC/ml), comparado con los tratamientos realizados en matrices con contenidos graso más bajos (de 1% y 2%), en donde la inactivación fue de 4,5 y 3,2 log UFC/ml, respectivamente (Bermudez y Barbosa, 2008).

Existe una hipótesis de que la presencia de glóbulos grasos crea un efecto protector en las células. Se sabe que algunos factores que afectan la resistencia al calor de los microorganismos son los altos niveles de proteínas y grasa presentes en un medio y el contenido de sólidos totales (Gaze, 2005; Bermudez et al., 2009). Sin embargo, el efecto de la grasa sobre la efectividad de los tratamientos con ultrasonido aún no se ha elucidado.

## 5. MATERIALES Y METODOS

### 5.1. MICROORGANISMOS

El estudio de inactivación microbiana se realizó con tres especies diferentes de importancia a nivel de industria de alimentos: una bacteria Gram-positiva (*Listeria monocytogenes* LM026), una bacteria Gram-negativa (*Escherichia coli* ATCC 25922) y una levadura (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754). La cepa de *L. monocytogenes* fue aislada de productos lácteos de la región e identificada mediante análisis moleculares y las cepas de *E. coli* y *S. cerevisiae* fueron adquiridas de la colección de cepas de referencia ATCC y fueron aisladas a partir de muestras clínicas y productos de panadería, respectivamente.

Para el mantenimiento y conservación de las cepas, éstas fueron almacenadas en crioviales (CRYOBANK®) a -20,0°C. Antes de cada ensayo las cepas fueron activadas inoculando una de las perlas de los crioviales en 5,0mL de caldo TSB (caldo tripticasa de soya, Scharlau ref. 02-200). Estos cultivos se incubaron a 37,0°C en aerobiosis por un tiempo de 24 horas (para el caso de las bacterias) y a 25°C por 48 horas (para la levadura). Después del periodo de incubación, los cultivos se homogenizaron durante 30 segundos con vórtex y se transfirieron 200,0µL de cada cultivo a un nuevo tubo con 5,0mL de caldo TSB, que se incubó bajo las mismas condiciones iniciales.

### 5.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Se prepararon soluciones con PBS (phosphate buffered saline, Sigma-aldrich® ref.4417-100TAB) (Anexo 1), ajustadas de manera independiente y controlada con diferentes condiciones intrínsecas (Glucosa, NaCl, grasa, pH, ácido cítrico). Las concentraciones para cada uno de estos factores fueron estandarizadas y seleccionadas de acuerdo con un estudio preliminar que se realizó para evaluar el efecto de dichas concentraciones sobre la viabilidad de los tres microorganismos y de esta manera asegurar que las condiciones seleccionadas por sí solas, no

afectaran el comportamiento de los microorganismos. En el Anexo 2, se presentan los resultados obtenidos de estos ensayos preliminares.

A partir de los resultados del ensayo descrito en el Anexo 2, se seleccionaron las siguientes condiciones de tratamiento para la aplicación de ultrasonido en las muestras:

- Glucosa (0,0; 8,0; 12,0 y 16,0%)
- NaCl (0,0; 1,0; 4,0 y 7,0%).
- Grasa (0,0; 5,0; 10,0 y 20,0%).
- Ácido cítrico (pH 2,5 y 4,0).
- pH ajustado con HCL (4,0; 5,0 y 6,0).

Las soluciones de glucosa al 8,0%, 12,0% y 16,0% y de NaCl al 1,0%, 4,0% y 7,0% fueron preparadas con glucosa (Sigma-Aldrich® (D-(+)-Glucose, ref.50-99-7, grado ACS, Reag) y NaCl (Merck®, ref. 7647-14-5 grado ACS, Reag.), respectivamente, pesando la cantidad necesaria para obtener cada una de las concentraciones propuestas. Así por ejemplo, para una concentración al 8,0% de glucosa y del 1,0% de NaCl se realizaron los siguientes cálculos:

$$[\text{Glucosa } 8,0\%] = \frac{8,0g \text{ Glucosa R.A.}}{100,0mL \text{ PBS}}$$

$$[\text{NaCl } 1,0\%] = \frac{1,0g \text{ NaCl R.A.}}{100,0mL \text{ PBS}}$$

De la misma manera, las soluciones de ácido cítrico (Merck®, ácido cítrico monohidrato, ref.201-069-1, grado ACS, ISO, Reag.) se prepararon con ayuda de un potenciómetro. A medida que se adicionaba ácido cítrico a la solución de PBS, se observaron los valores reportados en el potenciómetro hasta obtener las condiciones planteadas para su evaluación (pH 2,5 y 4,0).

El contenido graso fue modificado diluyendo crema de leche de un lote conocido de una marca comercial (contenido de 35,0g de grasa por 100,0g de crema de leche) en la solución de PBS de la siguiente manera:

$$[\text{Grasa } 5,0\%] = \frac{100,0g \text{ crema de leche}}{35,0g \text{ grasa}} \times \frac{5,0g \text{ grasa}}{100,0mL \text{ PBS}} = \frac{14,28g \text{ crema de leche}}{100,0mL \text{ PBS}}$$

$$[\text{Grasa } 10,0\%] = \frac{100,0g \text{ crema de leche}}{35,0g \text{ grasa}} \times \frac{10,0g \text{ grasa}}{100,0mL \text{ PBS}} = \frac{28,57g \text{ crema de leche}}{100,0mL \text{ PBS}}$$

$$[\text{Grasa } 20,0\%] = \frac{100,0g \text{ crema de leche}}{35,0g \text{ grasa}} \times \frac{20,0g \text{ grasa}}{100,0mL \text{ PBS}} = \frac{57,14g \text{ crema de leche}}{100,0mL \text{ PBS}}$$

Por otro lado, el pH fue modificado con HCL 1,0N (Merck®, ref.2806-10-00, grado ACS) y NaOH 1,0N (Merck®, ref.2815-12-00 grado ACS), con ayuda de un potenciómetro.

Para estudiar el efecto de los factores intrínsecos sobre la cinética de inactivación microbiana por ultrasonido y luego de preparar las soluciones, inicialmente se evaluó la viabilidad de los tres microorganismos (*L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. cerevisiae*) sobre los diferentes tipos de sustrato, para verificar que dichos factores no tuvieran un efecto inhibitorio directo antes de los tratamientos con ultrasonido. Para esto, poblaciones microbianas de aproximadamente  $10^7$  UFC/ml se inocularon sobre las diferentes soluciones preparadas en PBS, y posteriormente los cultivos bacterianos se incubaron durante 24 horas a 37,0°C y durante 48 horas a 25°C para el caso de la levadura. Recuentos en placa sobre agar tripticasa de soya (TSA), sirvieron para determinar la viabilidad de las cepas. En total se realizaron tres ensayos diferentes cada uno con tres réplicas. Los datos experimentales se analizaron mediante ANOVA ( $P < 0.05$ ) con el programa estadístico SPSS (versión 13.0, SSPS Inc, Chicago) (Anexo 2).

### 5.3. TRATAMIENTO ULTRASÓNICO

Después de revisar diferentes protocolos de inactivación microbiana utilizados en investigaciones previas con ultrasonido de alta intensidad (Anexo 3), se seleccionaron las condiciones de tratamiento que arrojaron los mejores resultados para definir el protocolo de

experimentación en el proyecto. De esta manera, se definió el siguiente protocolo de experimentación:

Los ensayos de ultrasonido de alta intensidad se realizaron con sonda de ultrasonido Misonix (S-4000), microtip de 3,2mm, amplitud de 120 $\mu$ m (58%) y frecuencia de 24KHz. Los experimentos fueron llevados a cabo a 20,0°C para estudiar el efecto del ultrasonido sin la influencia del tratamiento térmico. En este caso, la cavidad ultrasónica fue inmersa en un baño de hielo, para evitar aumento significativo de la temperatura por la aplicación del tratamiento. Durante todos los ensayos se controló la temperatura, que en ninguno de los casos sobrepasó los 30,0°C.

Muestras de 10,0mL de las diferentes soluciones de PBS previamente inoculadas de manera independiente y controlada en tubos de ensayo, con concentraciones microbianas iniciales aproximadas de 10<sup>7</sup> UFC/mL, se sometieron a tratamientos durante 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 y 10,0 minutos a las condiciones seleccionadas para determinar el efecto inhibitorio del ultrasonido. Como controles se utilizaron las muestras sin aplicación de tratamiento ultrasónico (tiempo cero).

#### **5.4. RECUENTO MICROBIANO**

Se realizaron recuentos en placa sobre agar tripticasa de soya (TSA, Scharlau ref. 01-200) a 37,0°C (bacterias) y 25°C (levadura) para verificar la concentración inicial de cada muestra. Luego de los tratamientos con ultrasonido se realizó nuevamente recuento en placa sobre bajo las mismas condiciones anteriores con lecturas a 24 y 48 horas, para evaluar la población de sobrevivientes.

#### **5.5. GENERACIÓN DE LAS CURVAS DE INACTIVACIÓN**

La cantidad de microorganismos sobrevivientes, se obtuvo de la diferencia entre la concentración celular inicial de las muestras sin tratamiento (controles) y la concentración final de las mismas (muestras sonicadas). Cada concentración residual se pasó a términos de ciclos

logarítmicos, graficando de esta manera la reducción versus el tiempo y obteniendo así las curvas de inactivación.

## 5.6. OBTENCIÓN DE LOS MODELOS DE INACTIVACIÓN

La obtención de los modelos de inactivación se realizó utilizando el programa GInaFIT® versión 1.5. Para ello, los datos resultantes de las curvas de inactivación fueron introducidos en el software, en donde se modelaron y se obtuvieron los parámetros cinéticos para cada uno de los microorganismos bajo las diferentes condiciones evaluadas.

En el programa, inicialmente se evaluó el ajuste de tres modelos (Figura 5) que fueron seleccionados teniendo en cuenta las características de las curvas de inactivación obtenidas. Estos modelos fueron: (1) log-lineal (Bigelow and Esty, 1920), (2) Log-linear+shoulder+tail (Geeraerd et al., 2000) y (3) Double weibull (Corroler et al., 2006).

Los siguientes fueron los criterios empleados para evaluar la bondad de ajuste y de desempeño de los modelos predictivos: error cuadrado medio (MSE), error estándar (SE) análisis de residuos, coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) y análisis de los estimados de los parámetros cinéticos.

1. **Error cuadrado medio (MSE):** El modelo ajusta mejor a los datos experimentales entre más pequeño el valor de MSE. Donde n es el número de observaciones y p es el número de parámetros a estimar.

$$MSE = \frac{\sum(\text{predicted} - \text{observed})^2}{n - p}$$

2. **Error estándar (SE):** Es una medida de dispersión que corresponde a la raíz cuadrada de la varianza de la distribución de todos los datos.

$$SE = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

- 3. Análisis de residuos:** Los valores de los residuos permiten determinar si se cumplen las hipótesis para el correcto uso de los modelos. Las gráficas de residuales permiten evaluar desviaciones sistemáticas entre valores observados y predichos, “clustering” de residuales del mismo signo y autocorrelación.
- 4. Coeficiente de determinación ( $R^2$ ):** Es la proporción de variación explicada por el modelo. Entre más alto sea su valor mejor será el ajuste del modelo.

$$R^2 = 1.0 - \frac{SS_{reg}}{SS_{tot}}$$

Donde  $SS_{reg}$  es la suma de las distancias entre los puntos y la curva de mejor ajuste determinada por regresión no lineal y  $SS_{tot}$  es la suma de los cuadrados de las distancias entre los puntos de la línea horizontal por el valor medio de todos los valores de Y.

- 5. Análisis de los parámetros cinéticos estimados:** El propósito de este análisis es evaluar los estimados de los parámetros de los modelos bajo los criterios de precisión y de ajuste a la realidad.

Para los tres modelos se obtuvieron los valores del  $R^2$ , que en todos los casos estuvo por encima del 70%. Para el modelo Log-Linear se obtuvo un  $R^2$  de 0,70, para el modelo Double-Weibull de 0,96 y para el modelo Log linear+Shoulder+Tail un  $R^2$  de 0,99.

Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionó el modelo Log linear+Shoulder+Tail propuesto por Geeraerd et al. (2000), por ser el de mejor ajuste a los datos experimentales (99%), cuya ecuación se presenta a continuación:

$$\text{Log}_{10}(N) = \frac{\text{Log}_{10}((10^{\text{Log}_{10}(N_0)} - 10^{\text{Log}_{10}(N_{res})}) * e^{(-k_{max} * t)} * e^{k_{max} * SI})}{1 + (e^{(k_{max} * SI)} - 1) * e^{(-k_{max} * t)} + 10^{\text{Log}_{10}(N_{res})}}$$

En donde,  $\text{Log}_{10}(N_0)$  se refiere a la población microbiana en el tiempo 0,  $k_{\text{max}}$  es la tasa máxima de inactivación específica,  $t$  es el tiempo,  $S_1$  es la distancia del hombro y  $\text{Log}_{10}(N_{\text{res}})$  se refiere a la subpoblación microbiana existente después del tratamiento.

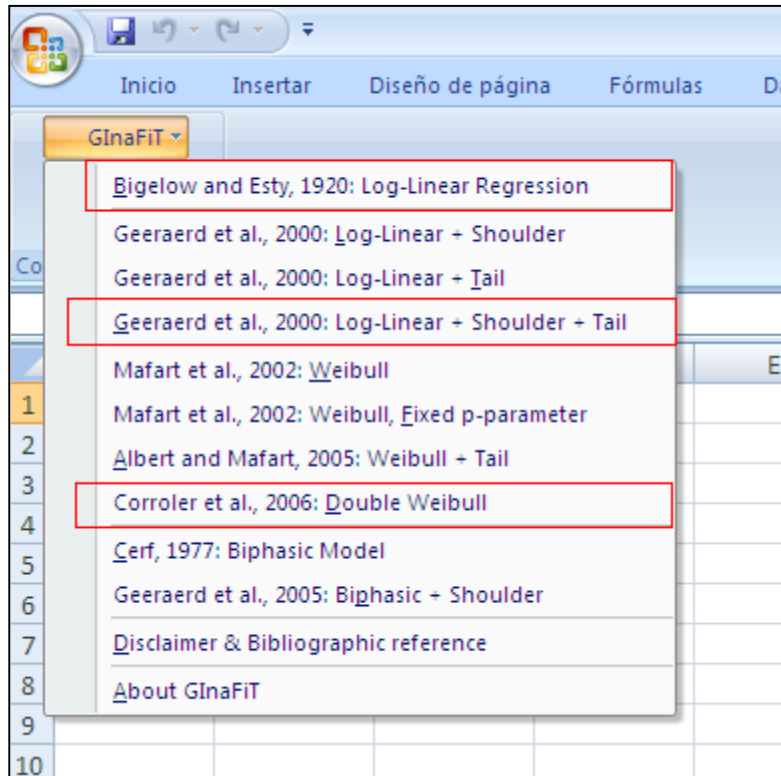


Figura 5. Interfase de modelos en GInaFit® (Fuente: Autor)

## 5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En todos los casos se realizaron tres ensayos independientes cada uno con tres réplicas. Como controles se utilizaron muestras sin tratar. Los datos experimentales se analizaron mediante ANOVA ( $P < 0,05$ ) y test de Tukey (nivel de significancia de 5%) con el programa estadístico SPSS (versión 13.0, SSPS Inc, Chicago).

En la Figura 6 se presenta un resumen de la metodología empleada para la realización de los ensayos.



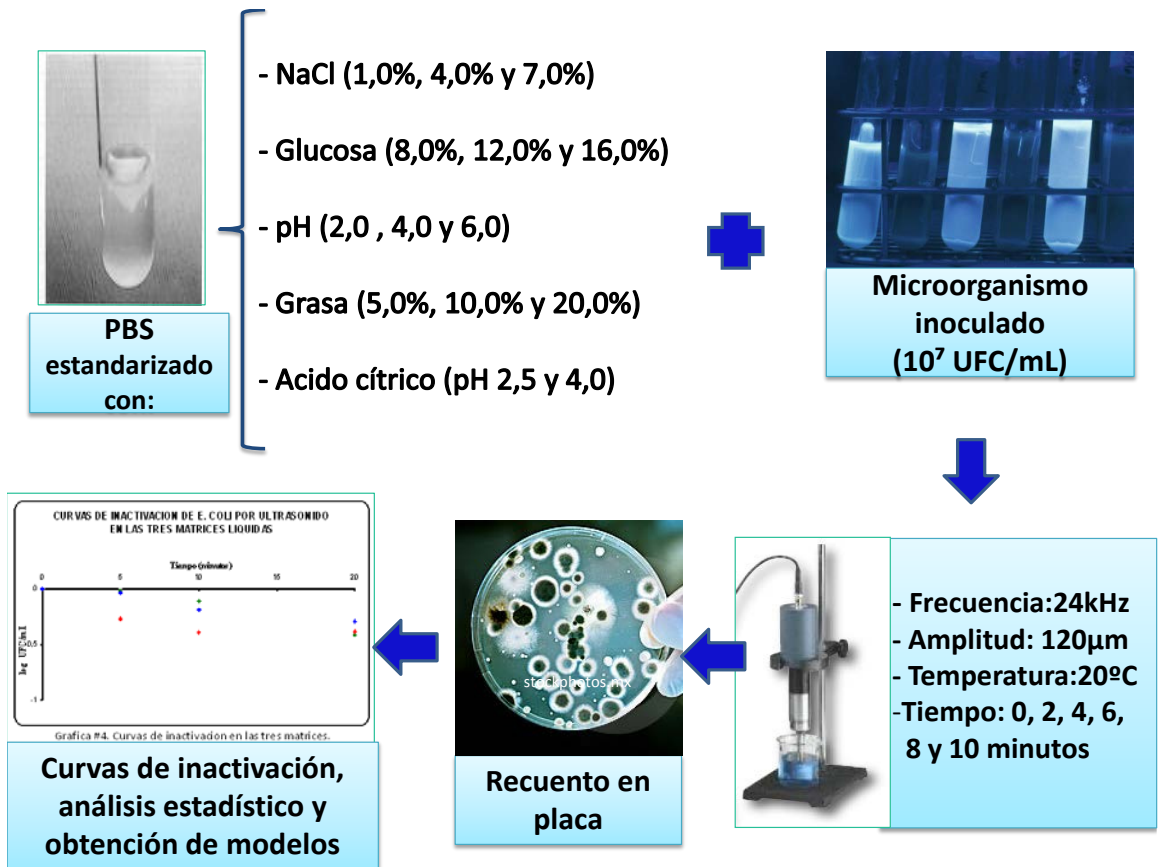


Figura 6. Resumen de la metodología utilizada. (Fuente: Autor).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. CINÉTICA DE INACTIVACIÓN EN TRATAMIENTOS ULTRASÓNICOS DE ALTA INTENSIDAD EN SOLUCIÓN TAMPÓN

Los resultados obtenidos demostraron que para las tres cepas evaluadas, a mayor tiempo de tratamiento se generó un mayor nivel de inactivación, siendo el tiempo de 10,0 minutos el más efectivo para lograr mayores reducciones logarítmicas en la concentración celular. En todos los casos se obtuvieron diferencias significativas ( $\alpha=0,05$ ) con respecto al tiempo de control ( $t=0$ ) como se presenta en la Figura 7.

Adicionalmente se evidenció que *L. monocytogenes* fue la cepa más resistente a los tratamientos con ultrasonido, lográndose un máximo de reducción de 0,5 ciclos log después de 10,0 minutos. Por otro lado, la cepa más sensible fue *S. cerevisiae*, que presentó una reducción de más de 1,0 ciclo logarítmico después de los tratamientos, seguida por la cepa de *E. coli*, que después de 10,0 minutos de sonicación redujo su concentración en 0,9 ciclos log.

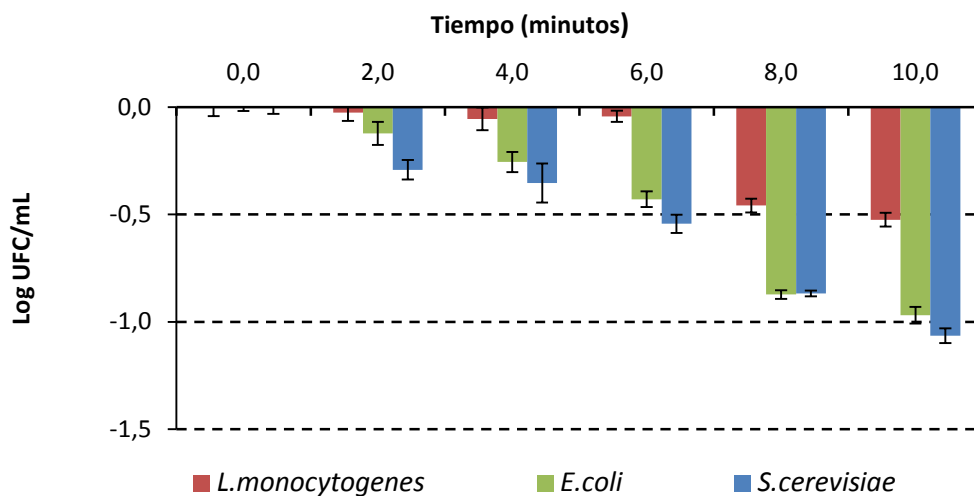


Figura 7. Cinética de inactivación microbiana en solución tampón mediante ultrasonido.

Los resultados obtenidos sugieren que la efectividad de los tratamientos, así como el mecanismo de inactivación por ultrasonido, podrían estar relacionados con la naturaleza de los microorganismos tratados ya que en los ensayos se observó que el grado de inactivación fue diferente para cada uno de ellos. Álvarez et al. (1999) y Cameron et al. (2008) coinciden en que generalmente es admitida la hipótesis de que células de mayor tamaño son más sensibles al ultrasonido que las células pequeñas. En este caso se cumplió la hipótesis, ya que las células de *S. cerevisiae* que tienen un tamaño aproximado de 3,0-15,0µm de largo por 2,0-8,0µm de ancho (Chemat et al., 2011), fueron más sensibles que las células de *E. coli* y *L. monocytogenes* que manejan tamaños menores (de 1,5 µm de ancho por 6,0 µm de largo y de 0,5 µm por 2,0 µm, respectivamente), siendo *Listeria monocytogenes* la cepa más resistente de las tres. Estos resultados también concuerdan con Alliger et al. (1975), quienes encontraron que las bacterias más pequeñas presentan una mayor resistencia a la acción de tratamientos de ultrasonido. Las primeras al ser más pequeñas tienen una menor superficie expuesta para la acción de las ondas, por lo que pueden llegar a ser más resistentes que las de mayor tamaño, por consiguiente a mayor superficie se presenta una mayor capacidad de absorción de la onda y por ende, un resultado más letal.

De la misma manera, con los resultados de estos ensayos se cumplió el supuesto de que las bacterias Gram-positivas son más resistentes que las bacterias Gram-negativas a los tratamientos físicos. Lo anterior se puede deber a que las bacterias Gram-positivas poseen una pared celular de mayor grosor y una capa de peptidoglicano más fuertemente adherida que la de las bacterias Gram-negativas (Cameron et al., 2008). Esto se evidencia en la figura 7, donde se observa un mayor efecto de los tratamientos ultrasónicos para la bacteria Gram-negativa (*E. coli*) que para la bacteria Gram-positiva (*L. monocytogenes*).

## **6.2. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DEL SUSTRATO SOBRE LA CINÉTICA DE INACTIVACIÓN MICROBIANA EN LOS TRATAMIENTOS DE ULTRASONIDO DE ALTA INTENSIDAD**

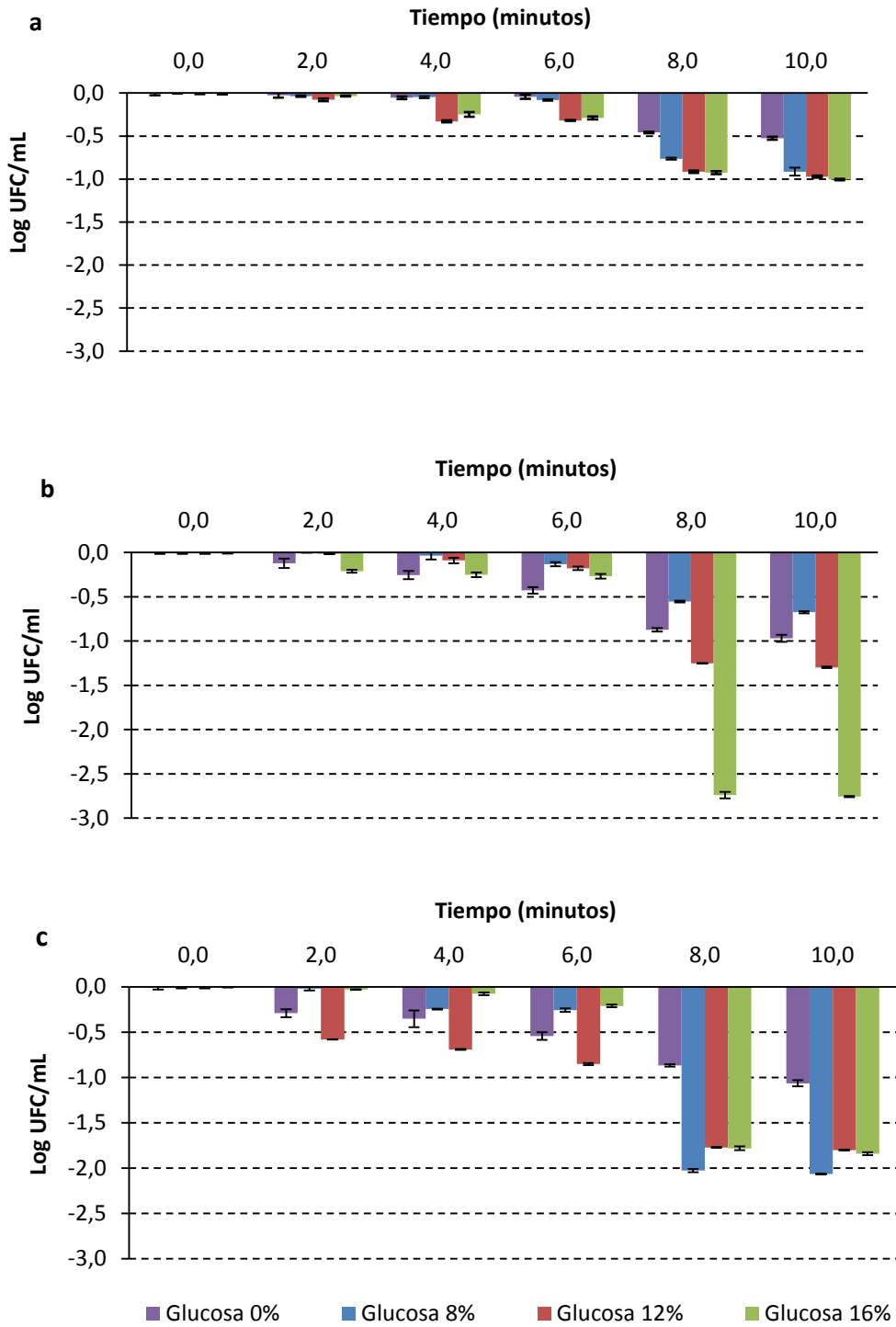
Los resultados obtenidos para este objetivo mostraron también que en la mayoría de los casos a mayor tiempo de sonicación se presentaron mayores reducciones logarítmicas. Se observó

que después de seis minutos de tratamiento se presentaron las mayores reducciones en la concentración microbiana, mientras que por debajo de este tiempo solo se obtuvieron reducciones de aproximadamente 1,0 ciclo log (Figuras 8 a 12).

**En cuanto a los ensayos realizados con soluciones de glucosa**, los resultados obtenidos mostraron un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) de la concentración de glucosa en el medio, sobre la cinética de inactivación microbiana. Se logró determinar que en general para las tres cepas en estudio, se obtuvo un mayor nivel de inactivación cuando el medio tenía mayor concentración de glucosa (Figura 8). Sin embargo este efecto fue más evidente después de los seis minutos de tratamiento, donde aparentemente se logró un mayor efecto ultrasónico. Así, de acuerdo a los datos obtenidos podría plantearse *a priori* un nivel crítico del 12% en contenido de glucosa para *E.coli* y *S. cerevisiae*.

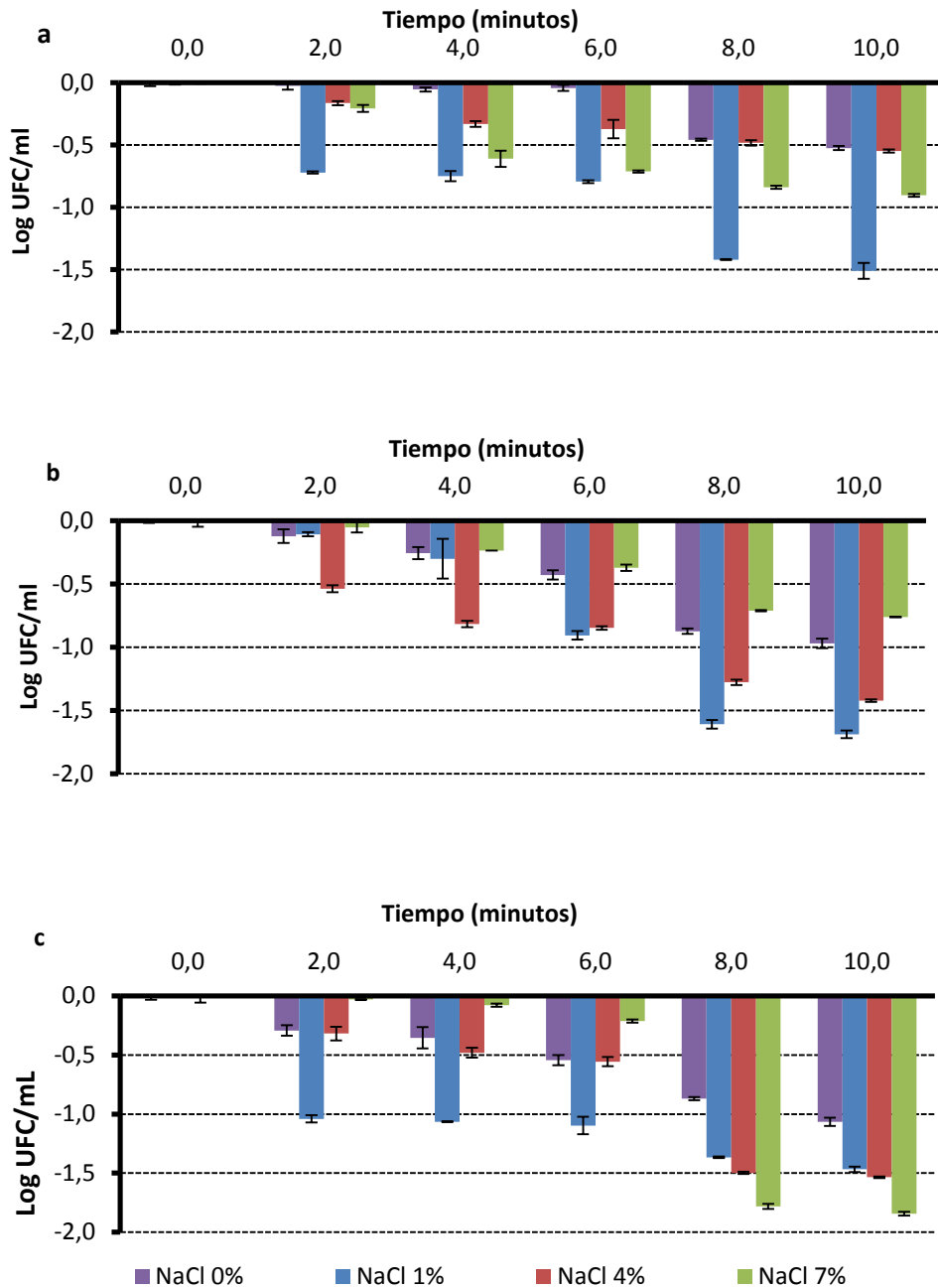
Estos resultados podrían sugerir que la glucosa no representa un factor significativamente protector para las células y que por el contrario podría hacerlas más sensibles a los tratamientos con ultrasonido. Sin embargo, algunos autores afirman que la potencia del ultrasonido tiende a no ser tan efectiva a medida que la viscosidad del medio aumenta, ya que puede crear una resistencia parecida a la encontrada en sólidos. Acerca de esta resistencia, Álvarez et al. (2000) reportaron en un estudio que la adición de sacarosa al medio aumentó 30 veces la resistencia térmica de *L. monocytogenes*, efecto que podría presentarse de igual manera en los tratamientos con ultrasonido. Contrario a esto, dicha resistencia no presentó en los ensayos que se realizaron en este trabajo

En otro estudio Fletcher et al. (1998), reportaron que la actividad de agua del medio es uno de los factores más importantes a nivel de ecología microbiana y encontraron que durante tratamientos térmicos, el nivel de inactivación microbiana fue mayor cuando se trataron muestras con un  $a_w$  reducido. Aparentemente, entre mayor  $a_w$  tenga una muestra, mayor será el efecto protector de este factor para el microorganismo. Estos hallazgos podrían extrapolarse para tratamientos ultrasónicos y podrían explicar también los resultados que se obtuvieron a partir de los ensayos realizados en los que se obtuvieron mayores reducciones microbianas cuando el  $a_w$  fue menor.



**Figura 8.** Efecto del contenido de glucosa sobre la inactivación microbiana por ultrasonido.  
**a:** *L. monocytogenes*. **b:** *E. coli*. **c:** *S. cerevisiae*.

En los ensayos realizados con soluciones ajustadas a diferentes concentraciones de sal, se encontró que al evaluar el efecto de la concentración de NaCl sobre la inactivación microbiana por ultrasonido se presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tres tipos de microorganismos evaluados y las diferentes concentraciones de NaCl (Figura 9).



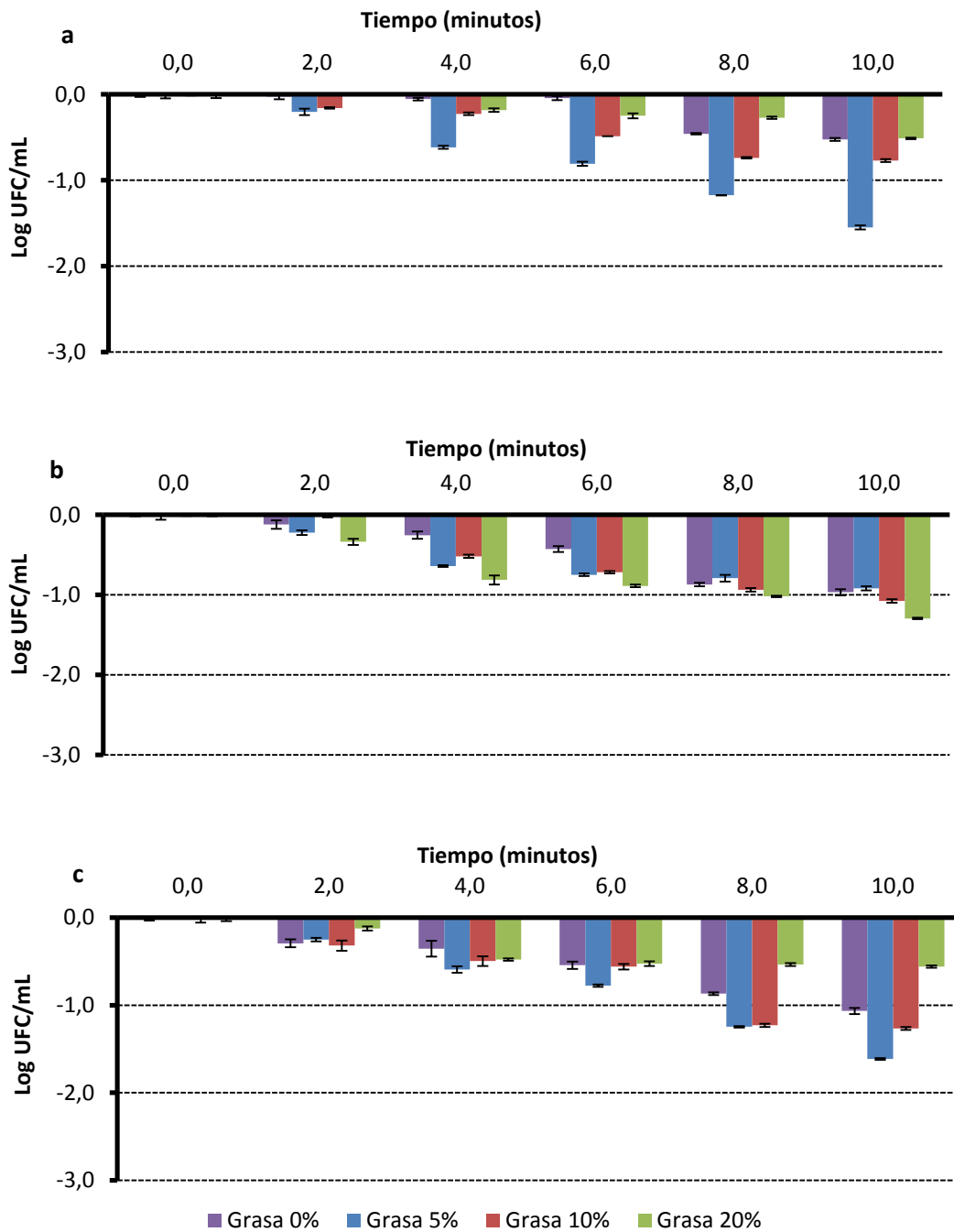
**Figura 9.** Efecto del contenido de NaCl sobre la inactivación microbiana por ultrasonido.  
**a:** *L. monocytogenes*. **b:** *E. coli*. **c:** *S. cerevisiae*.

Para las tres cepas estudiadas se observó que una concentración de NaCl del 1,0% en el medio, favorece en la mayoría de los casos el efecto del tratamiento, porque bajo estas condiciones se obtuvieron mayores reducciones logarítmicas (de aproximadamente 1,5 ciclos log). Mientras que la concentración del 7,0% de NaCl aparentemente tuvo un efecto protector para las dos bacterias, ya que los valores de reducción logarítmica fueron mucho menores que en los otros casos (entre 0,5 y 0,8 ciclos log). Para el caso de la levadura se puede plantear un nivel crítico de NaCl sobre el 4%.

Lo anterior puede deberse a la capacidad de osmoregulación de las células y las diferencias encontradas a nivel de inactivación celular entre los tres tipos de cepas, podrían deberse a diferencias en la estructura de su pared celular. Se esperaría que una concentración de NaCl cercana a una concentración isotónica permita más fácilmente el daño en la membrana ya que el citoplasma celular de los microorganismos posee una mayor concentración de solutos que el medio exterior, de modo que el agua se difunde hacia el interior célula. Pero por otro lado, cuando una célula está en un ambiente con baja actividad de agua, existe una tendencia a la salida del líquido intracelular, y es así como los contenidos del medio como el azúcar o la sal adquieren importancia, ya que al bajar la actividad de agua en el medio, la célula pierde agua y se produce plasmólisis (Madigan et al., 2008). Barbosa et al. (2008) proponen una hipótesis que explica que altas concentraciones de sal en el medio pueden mostrar un incremento en la resistencia del microorganismo al calor, y si se presenta esta resistencia a la temperatura, es posible que en este caso se genere una resistencia similar al ultrasonido.

Pasando a otro punto, **el efecto del contenido de grasa sobre la inactivación microbiana** por ultrasonido fue significativo ( $P < 0,05$ ) entre los tres tipos de microorganismos evaluados (Figura 10). Se observó para las tres cepas que una concentración de grasa del 5,0% en el medio, favorece el efecto del tratamiento, porque se obtuvieron mayores reducciones: 1,5, 0,9 y 1,7 Log, para *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. cerevisiae*, respectivamente. Sin embargo, parece ser que el contenido de grasa es un obstáculo que reduce la tasa de inactivación en algunos microorganismos, ya que para un contenido de grasa mayor al 10,0% los efectos fueron disímiles para cada uno de los microorganismos evaluados, evidenciándose un efecto protector para la bacteria Gram-positiva (*L. monocytogenes*) y la levadura (*S. cerevisiae*), aunque más marcado en la bacteria. Por otro lado, para la bacteria Gram-negativa (*E. coli*) no se presentaron diferencias significativas

( $P < 0,05$ ) entre las concentraciones de grasa del 5,0%, 10,0% y 20,0%, en las que se obtuvieron reducciones de 1,1, 1,3 y 1,0 ciclos logarítmicos, respectivamente.



**Figura 10.** Efecto del contenido de Grasa sobre la inactivación microbiana por ultrasonido.  
**a:** *L. monocytogenes*. **b:** *E. coli*. **c:** *S. cerevisiae*.



Lo anterior puede deberse a que la presencia de glóbulos de grasa en algunos medios, crea un efecto protector en las células, así como ocurre durante los tratamientos térmicos, donde algunos de los factores que afectan la resistencia al calor de los microorganismos son los altos contenidos proteínicos y grasas o el alto contenido de sólidos totales (Barbosa et al., 2009).

Barbosa et al. (2006) proponen que las bacterias pueden adherirse a los glóbulos de grasa contenidos en el medio y los tratamientos ultrasónicos pueden alterar la membrana lipídica de estos glóbulos generándoles un tamaño más pequeño. Algunos de estos glóbulos de menor tamaño quedan como "huecos" y con una rugosidad diferente en su superficie. Aparentemente, estas nuevas condiciones les permiten a los microorganismos adherirse con mayor fuerza y ocultarse en el interior de los glóbulos, lo que representa un efecto protector contra el calor y la cavitación. Otros estudios también evidencian que el efecto de cavitación puede ser menor a medida que aumenta la viscosidad del medio, ya que disminuye la facilidad de penetración de las ondas de ultrasonido (Hülsemann; 1999; Earnshaw et al., 1995).

Sin embargo, en trabajos realizados por Gaze (2005) y Bermudez et al. (2009), se encontró que el contenido de grasa de la leche parece ser una limitación que reduce la tasa de inactivación microbiana. Algunos de los reportes encontrados muestran que después de 30 minutos de tratamiento, leche con contenido de grasa del 3,4% de grasa presentó un bajo grado de inactivación de células (2,5 log) comparada con contenidos grasos del 1,0% y 2,0%, en los cuales se obtuvieron reducciones de 4,5 y en 3,2 ciclos log, respectivamente.

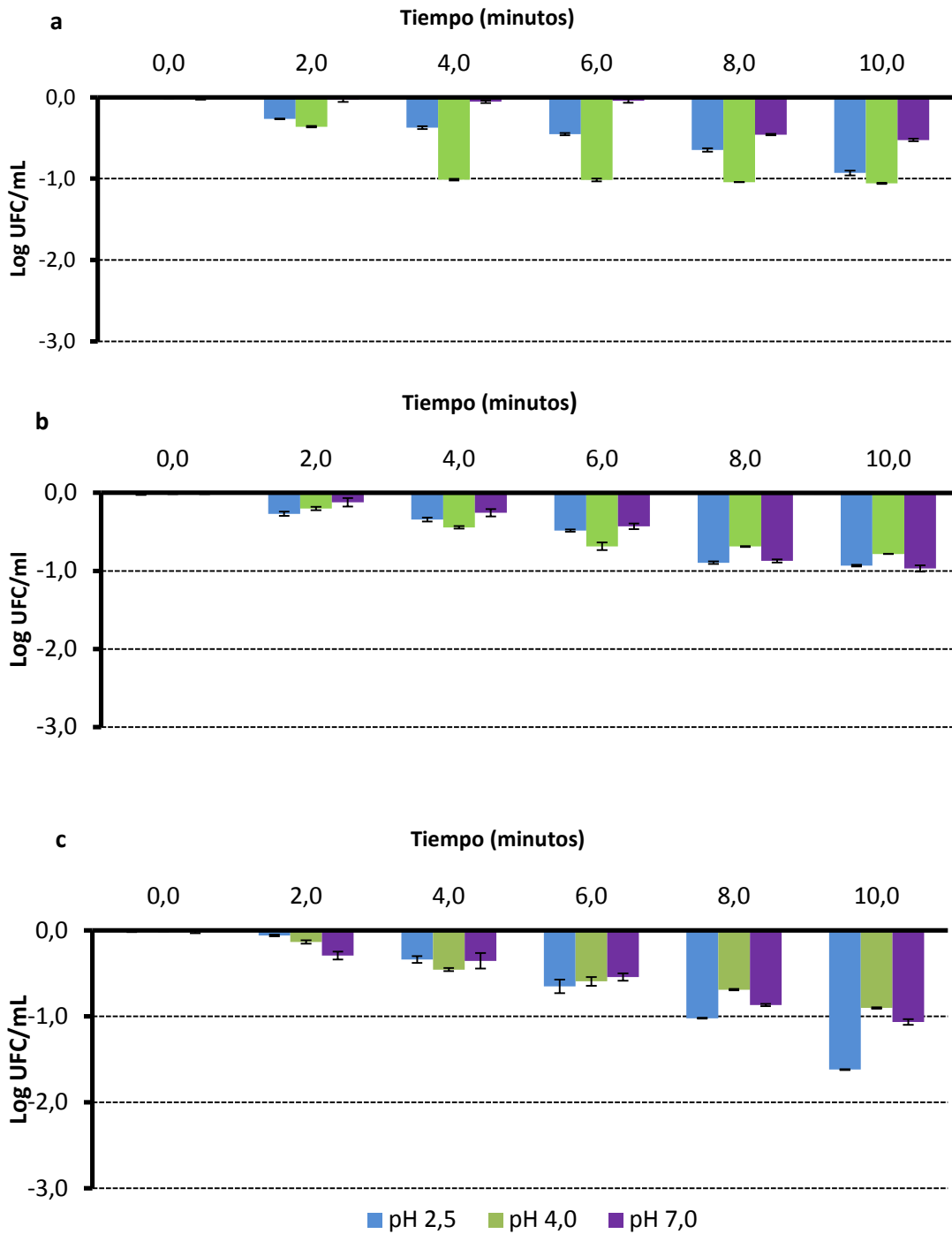
Esto podría deberse a que el ultrasonido de alta intensidad dispersa y reduce el tamaño de glóbulos de grasa, así como lo hace con las micelas de caseína que almacenan la mayoría del calcio de la leche (Villamiel et al., 2000; Taylor y Richardson 1980; Philippe et al., 2007). Este calcio posee un efecto estabilizador de las biomembranas y por tanto, protege las células ante los tratamientos físicos (Hauben et al., 1998). Es así como un mayor contenido de grasa en la leche, estaría reduciendo la cantidad de calcio liberado a la fase de suero, ya que la presencia de un mayor número de glóbulos de grasa, incide directamente sobre una menor desagregación de micelas de caseína. Por esto, en este tipo de leche, que posee menos concentración de calcio libre, el efecto bioprotector es mucho menor, presentándose una proporción mayor de células afectadas ante los tratamientos ultrasónicos.

### **6.3. EFECTO DEL PH DEL MEDIO SOBRE LA CINÉTICA DE INACTIVACIÓN MICROBIANA EN TRATAMIENTOS DE ULTRASONIDO DE ALTA INTENSIDAD**

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos realizados para evaluar el efecto del pH modificado por ácidos inorgánicos (HCl) y ácidos orgánicos (ácido cítrico) sobre las cinéticas de inactivación microbiana, mostraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los tres tipos de microorganismos estudiados. Pero en todos los casos se observó que las soluciones ajustadas a valores de pH más ácidos que el control (pH 7,0), presentaron mayor nivel de reducción microbiana después de la aplicación de los tratamientos con ultrasonido.

En los ensayos realizados con ácido cítrico (Figura 11) se observó en términos generales para la levadura y la bacteria Gram-positiva, una mayor resistencia ultrasónica a valores de pH altos, mientras que para la bacteria Gram-negativa no se pudo establecer una relación directa entre el pH y el nivel de inactivación, ya que en muchos casos no se presentaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los diferentes niveles de pH.

Luego de 10,0 minutos de tratamiento, a pH 4,0 se obtuvieron reducciones de 1,2 ciclos log para *L. monocytogenes*, de 0,9 log UFC/ml para *S. cerevisiae* y de 0,7 para *E. coli*. Mientras que a pH de 2,5, luego de este mismo tiempo de tratamiento se obtuvieron reducciones logarítmicas de 0,9, 0,9 y 1,6 ciclos log en la concentración celular de *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. cerevisiae*, respectivamente. Para el caso de la levadura, el pH de 2,5 fue el que generó mayor nivel de inactivación, mientras que para la Gram-positiva fue el pH de 4,0.



**Figura 11.** Efecto del pH modificado con ácido cítrico sobre la inactivación microbiana por ultrasonido. **a:** *L. monocytogenes*. **b:** *E. coli*. **c:** *S. cerevisiae*.

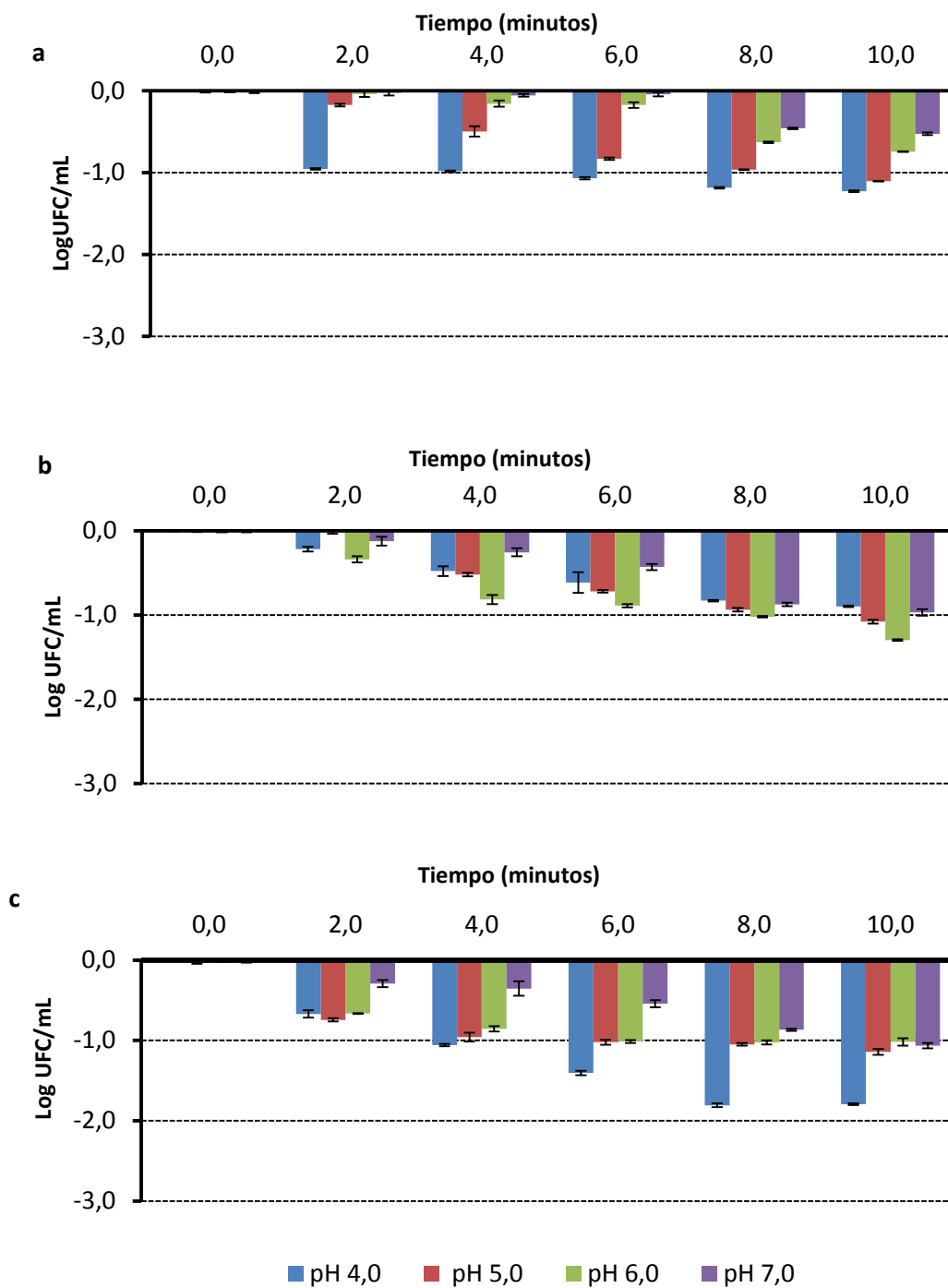
En los ensayos realizados con ácido inorgánico (Figura 12) se encontró que para *L. monocytogenes* el pH más ácido evaluado (4,0), fue el que generó mayor nivel de inactivación con una reducción máxima de 1,2 ciclos log después de 10 minutos de tratamiento y esta misma tendencia se mantuvo con relación a los otros niveles de pH evaluados, porque a pH más básico (7,0) las reducciones fueron menores. Una tendencia similar se observó para *S. cerevisiae* que presentó mayores niveles de inactivación también a pH de 4,0, con reducciones de 1,8 ciclos log luego de 10 minutos de tratamiento. Para este microorganismo no se presentaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los valores de pH de 5,0 y 6,0.

Para *E. coli*, se presentó un efecto contrario al observado con los otros dos microorganismos. El pH que generó mayor sensibilidad durante los tratamientos con ultrasonido fue el pH de 6,0, con reducciones celulares de 1,3 ciclos log.

Estos resultados, tan diferentes para cada uno de los tres microorganismos, pueden deberse al tipo de pared celular que presenta cada uno de ellos y a su nivel de sensibilidad a factores como el pH. El efecto de este factor intrínseco sobre la cinética de inactivación microbiana se discutirá con mayor detalle en la siguiente sección donde los modelos matemáticos obtenidos describen mejor el comportamiento de los microorganismos bajo estas condiciones.

Reportes encontrados acerca del efecto del pH sobre la efectividad del ultrasonido parecen ser también contradictorios, ya que mientras algunos autores no han encontrado ninguna influencia del pH sobre la resistencia microbiana (Earnshaw et al., 1995), otros han comprobado que a pH ácido la resistencia de ciertos microorganismos es menor (Sala et al., 1995; Guerrero et al., 2001). Por otro lado, estos resultados apuntan a que el tratamiento combinado de ultrasonido con soluciones ácidas podría mejorar en gran medida la eficacia del tratamiento, aumentando la inhibición de patógenos en alimentos, tal como lo sugiere Sagong et al. (2011) en su investigación de ultrasonido combinado con ácidos orgánicos para la conservación de vegetales.

Algunos de estos resultados, que describen el efecto de factores intrínsecos sobre la cinética de inactivación microbiana, fueron socializados y publicados en eventos científicos (Anexo 4).



**Figura 12.** Efecto del pH modificado con ácido inorgánico sobre la inactivación microbiana por ultrasonido. **a:** *L. monocytogenes*. **b:** *E. coli*. **c:** *S. cerevisiae*.

## **6.4. MODELACIÓN DEL EFECTO DE TRATAMIENTOS ULTRASÓNICOS SOBRE LA CARGA MICROBIANA DE SOLUCIONES AJUSTADAS CON DIFERENTES FACTORES INTRÍNSECOS**

A partir de la ecuación de Geeraerd et al. (2000) se obtuvieron los modelos de inactivación microbiana por ultrasonido para *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. cerevisiae* en PBS ajustado con diferentes concentraciones de glucosa, NaCl, grasa y pH. Así mismo se obtuvo la estimación de los parámetros cinéticos de inactivación microbiana para cada uno de los tratamientos ultrasónicos realizados. Con estos datos se analizó la distancia del hombro (SL), la cual ocurre cuando no se presenta una inactivación instantánea a través del tiempo luego de aplicar un tratamiento, la tasa de velocidad de inactivación (Kmax), la población residual (Log10\_Nres), después de aplicar los tratamientos o concentración de sobrevivientes, la población inicial (Log10\_No) y los parámetros de ajuste: sumatoria de cuadrados (MSE) y coeficiente de correlación y ajuste ( $R^2$ ).

### **6.4.1 EFECTO DE LA GLUCOSA SOBRE LA CINÉTICA DE INACTIVACIÓN MICROBIANA POR ULTRASONIDO**

A partir de la ecuación de Geeraerd et al. (2000) se obtuvieron los modelos de inactivación microbiana por ultrasonido para *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. cerevisiae* en PBS ajustado con diferentes concentraciones de glucosa (Figura 13). Así mismo, se analizaron los parámetros cinéticos que sirvieron para explicar el comportamiento de los microorganismos en cada uno de los casos (Tabla 4). En todos los casos, el  $R^2$  más bajo que se obtuvo fue de 0,92, lo que indica que los modelos que se generaron presentaron un buen ajuste a los datos experimentales.

Para *L. monocytogenes* se observó que a mayor concentración de glucosa en el medio los parámetros correspondientes a la distancia del hombro (SL) y a la velocidad de inactivación (Kmax), se redujeron.

Los resultados sugieren que posiblemente existe un efecto protector de este factor hacia el microorganismo, lo que indica que la efectividad de los tratamientos con ultrasonido para esta bacteria, podría potencializarse en productos con baja concentración de glucosa, lo que reduciría

también el tiempo de aplicación. Estos resultados concuerdan con lo que se había discutido anteriormente acerca de que el tratamiento con ultrasonido tiende a no ser tan efectivo a medida que la viscosidad del medio aumenta, ya que esta condición puede afectar la propagación de la onda en el medio. Álvarez et al. (2000) encontraron que la adición de sacarosa al medio, aumentó 30 veces la resistencia térmica de *L. monocytogenes*, efecto que podría extrapolarse a esta tecnología.

Para *E. coli* se observó que a mayor concentración de glucosa en el medio el  $K_{max}$  aumentó significativamente (Tabla 4), lo que sugiere que a mayor contenido de azúcar se obtuvo una tasa de inactivación microbiana mayor. Sin embargo, al analizar el parámetro del hombro (SL) no se observó una relación directa entre la concentración de glucosa y el tiempo requerido para iniciar una inactivación microbiana efectiva. Se encontró que el tratamiento más efectivo fue el realizado a los 8,0 minutos de tratamiento con una concentración de glucosa del 16,0% (Figura 13b), sin embargo se encontró que a una concentración del 16% de glucosa, el parámetro  $K_{max}$  sobreestima los datos experimentales porque no se observó ese grado de inactivación en los ensayos correspondientes. Estos resultados pueden explicarse con la hipótesis de Madigan et al. (2008), la cual sugiere que cuando una célula está en un ambiente con baja actividad de agua, existe una tendencia de salida del líquido intracelular y es así como al bajar la actividad de agua en el medio la célula pierde agua y se produce plasmólisis.

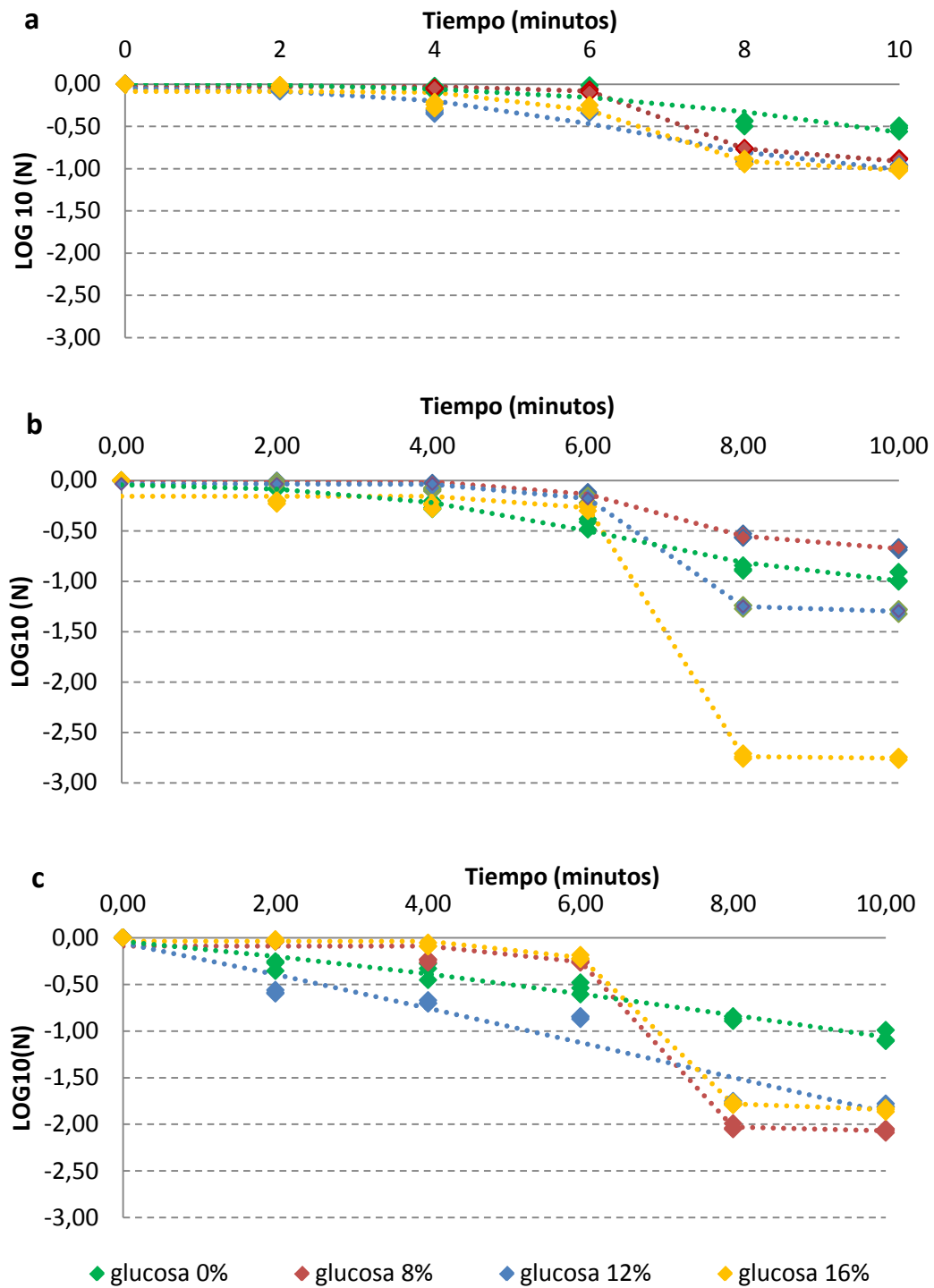
Para *S. cerevisiae* se observó que a una concentración de glucosa del 16,0% se obtuvo el mayor  $K_{max}$ . Aunque se esperaría que la tendencia fuera decreciente a medida que el contenido de glucosa es menor, los resultados mostraron que al 8,0% el  $K_{max}$  es incluso mayor que para un contenido de glucosa del 12,0%. (Figura 13c). En este caso, al analizar el parámetro del hombro (SL) tampoco se observó una relación directa entre la concentración de glucosa y el tiempo requerido para iniciar una inactivación microbiana efectiva. Estos resultados sugieren que para este microorganismo existen unos rangos en contenido de glucosa que deben tenerse en cuenta para el diseño de tratamientos ultrasónicos más efectivos.

**Tabla 4.** Parámetros para modelo de inactivación en medio PBS modificado con glucosa.

Microorganismo	Parámetros	Contenido de Glucosa (%)			
		0,00%	8,00%	12,00%	16,00%
<i>Listeria monocytogenes</i>	SI (Shoulder length) (min)	7,49 (SE=2,25)	6,82 (SE=0,10)	4,96 (SE=0,61)	6,11 (SE=0,21)
	kmax (1/min)	0,42 (SE=0,38)	2,3 (SE=0,19)	0,74 (SE=0,24)	1,7 (SE=0,39)
	LOG10(N_res) (cfu/ml)	-6,12	-0,92	-1,11	-1,02
	LOG10(N0) (cfu/ml)	0,02	0,00	0,00	0,00
	MSE	0,01	0,00	0,01	0,01
	RMSE	0,09	0,03	0,11	0,09
	R <sup>2</sup>	0,87	1,00	0,93	0,96
<i>Escherichia coli</i>	SI (Shoulder length) (min)	4,69 (SE= 0,4)	6,46 (SE=0,12)	6,29 (SE=0,07)	6,23 (SE=0,14)
	kmax (1/min)	0,71 (SE=0,15)	1,47 (SE=0,15)	2,94 (SE=0,35)	5,2 (SE=2,16)
	LOG10(N_res) (cfu/ml)	-1,08	-0,69	-1,30	-2,76
	LOG10(N0) (cfu/ml)	0,04	0,00	0,00	0,00
	MSE	0,00	0,00	0,00	0,01
	RMSE	0,07	0,03	0,04	0,09
	R <sup>2</sup>	0,97	0,99	1,00	1,00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SI (Shoulder length) (min)	1,98 (SE=2,27)	6,19 (SE=0,11)	0,44 (SE=2,39)	6,20 (SE=0,04)
	kmax (1/min)	0,29 (SE=0,17)	3,81 (SE=0,96)	0,44 (SE=0,19)	3,35 (SE=0,21)
	LOG10(N_res) (cfu/ml)	-4,89	-2,07	-3,35	-1,84
	LOG10(N0) (cfu/ml)	0,00	0,00	0,00	0,00
	MSE	0,01	0,01	0,04	0,00
	RMSE	0,08	0,09	0,21	0,03
	R <sup>2</sup>	0,96	0,99	0,92	1,00

SL= Distancia del Hombro; Kmax= tasa de velocidad de inactivación; Log10\_Nres= población residual; Log10\_No= Población inicial; SE= Error estándar, MSE= Sumatoria de cuadrados y R<sup>2</sup>=coeficiente de correlación y ajuste.





**Figura 13.** Modelos de inactivación microbiana por ultrasonido en medio PBS modificado con glucosa. **a)** *Listeria monocytogenes*; **b)** *Escherichia coli* y **c)** *Saccharomyces cerevisiae*. **Símbolos sólidos:** Datos observados. **Líneas punteadas:** Modelo de Geeraerd et al. (2000)

#### 6.4.2 EFECTO DEL NaCl SOBRE LA CINÉTICA DE INACTIVACIÓN MICROBIANA POR ULTRASONIDO

Los parámetros de inactivación microbiana obtenidos a partir de la ecuación de Geeraerd et al. (2000) para los ensayos realizados con soluciones ajustadas a diferentes concentraciones de NaCl se presentan en la Tabla 5. En la Figura 14 se presentan también los modelos obtenidos para este caso.

Todos los modelos que se generaron presentaron un ajuste adecuado a los datos experimentales, siendo 0,94 el valor de  $R^2$  más bajo que se obtuvo.

Para *L. monocytogenes* se observó que a mayor concentración de sal en el medio la velocidad de inactivación ( $K_{max}$ ), se redujo, lo que sugiere que posiblemente existe un efecto protector de este factor hacia el microorganismo y que la efectividad de los tratamientos con ultrasonido para esta bacteria, podría potencializarse en productos con baja concentración de sal. Adicionalmente, al analizar el parámetro del hombro (SL) no se observó una relación directa entre la concentración de sal y el tiempo requerido para iniciar una inactivación microbiana efectiva.

La cinética de inactivación para *Escherichia coli* bajo diferentes concentraciones de NaCl, muestra que no existe una tendencia definida entre los diferentes niveles de concentración de este factor y la velocidad de inactivación microbiana ( $K_{max}$ ), lo que también ocurre al analizar el parámetro del hombro (SL). Así mismo se pudo establecer que la concentración de sal al 1,0% generó los mejores resultados a nivel de inactivación microbiana, presentando el mayor de los  $K_{max}$  (1,22) y el menor de las SI (4,27).

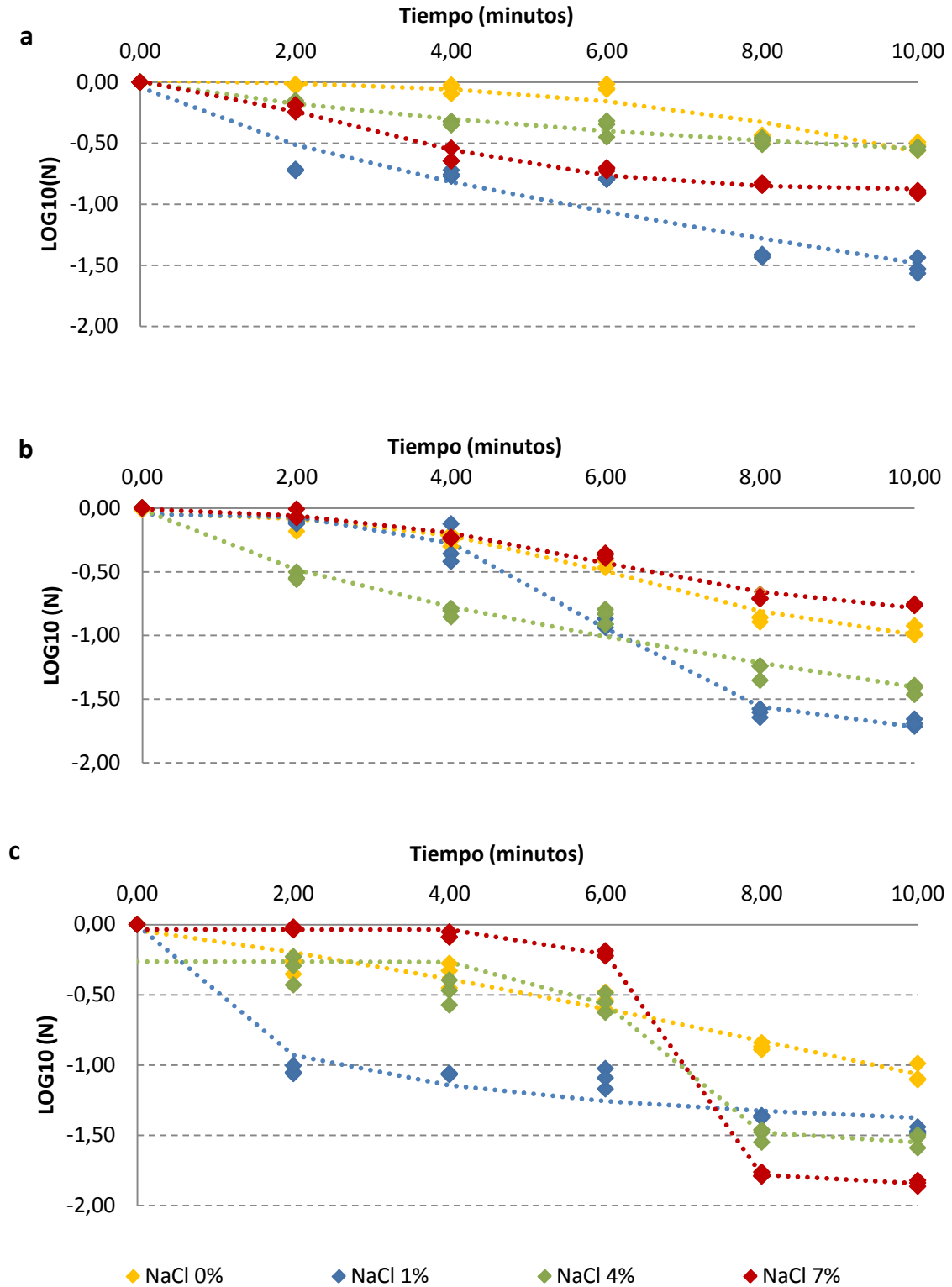
En el caso de *S. cerevisiae*, se observó una tendencia casi generalizada que consiste en que el parámetro de hombro (SL) y el parámetro de velocidad ( $K_{max}$ ) aumentan a medida que el contenido de NaCl en el medio es mayor (Figura 14c). Esto sugiere que este microorganismo podría inactivarse con mayor efectividad cuando se tratan medios con altas concentraciones de sal. Sin embargo, el comportamiento observado a concentraciones del 1,0 % de sal no coincide con esta tendencia.

Estos resultados sugieren que para los tres microorganismos estudiados existen unos rangos en contenido de sal que deben tenerse en cuenta para el diseño de tratamientos ultrasónicos más efectivos.

**Tabla 5.** Parámetros para modelo de inactivación en medio PBS modificado con NaCl.

Microorganismo	Parámetros	Contenido de NaCl (%)			
		0,00%	1,00%	4,00%	7,00%
<i>Listeria monocytogenes</i>	SI (Shoulder length) (min)	7,49 (SE=2,25)	0 (SE=21,43)	0 (SE=250,28)	1,57 (SE=0,45)
	kmax (1/min)	0,42 (SE=0,38)	0,21 (SE=0,36)	0,07 (SE=0,55)	0,69 (SE=0,12)
	LOG10(N_res) (cfu/ml)	-6,12	-5,48	-0,97	-0,88
	LOG10(N0) (cfu/ml)	0,02	0,00	0,00	0,01
	MSE	0,01	0,03	0,00	0,00
	RMSE	0,09	0,18	0,04	0,05
	R <sup>2</sup>	0,87	0,91	0,97	0,98
<i>Escherichia coli</i>	SI (Shoulder length) (min)	4,69 (SE= 0,4)	4,27 (SE=0,22)	0 (SE=16,89)	4,44 (SE=0,34)
	kmax (1/min)	0,71 (SE=0,15)	1,22 (SE=0,13)	0,19 (SE=0,22)	0,64 (SE=0,11)
	LOG10(N_res) (cfu/ml)	-1,08	-1,74	-5,28	-0,85
	LOG10(N0) (cfu/ml)	0,04	0,00	0,00	0,00
	MSE	0,00	0,01	0,01	0,00
	RMSE	0,07	0,08	0,10	0,05
	R <sup>2</sup>	0,97	0,99	0,97	0,98
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SI (Shoulder length) (min)	1,98 (SE=2,27)	0 (SE=2858,06)	5,95 (SE=0,25)	6,20 (SE=0,04)
	kmax (1/min)	0,29 (SE=0,17)	0,06 (SE=1,76)	2,27 (SE=1,07)	3,35 (SE=0,21)
	LOG10(N_res) (cfu/ml)	-4,89	-1,58	-1,55	-1,84
	LOG10(N0) (cfu/ml)	0,00	0,00	0,00	0,00
	MSE	0,01	0,01	0,03	0,00
	RMSE	0,08	0,11	0,17	0,03
	R <sup>2</sup>	0,96	0,96	0,93	1,00

SL= Distancia del Hombro; Kmax= tasa de velocidad de inactivación; SE= Error estándar; Log10\_Nres= población residual; Log10\_No= Población inicial; MSE= Sumatoria de cuadrados y R2=coeficiente de correlación y ajuste.



**Figura 14.** Modelos de inactivación microbiana por ultrasonido en medio PBS modificado con NaCl.   
**a) *Listeria monocytogenes*; b) *Escherichia coli* y c) *Saccharomyces cerevisiae*.**   
**Símbolos sólidos:** Datos observados. **Líneas punteadas:** Modelo de Geeraerd et al. (2000).

### 6.4.3 EFECTO DE LA GRASA SOBRE LA CINÉTICA DE INACTIVACIÓN MICROBIANA POR ULTRASONIDO

A partir de la ecuación de Geeraerd et al. (2000) se obtuvieron los modelos de inactivación microbiana por ultrasonido para *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. cerevisiae* en PBS ajustado con diferentes concentraciones de grasa (Figura 15). Así mismo, se analizaron los parámetros cinéticos que sirvieron para explicar el comportamiento de los microorganismos en cada uno de los casos (Tabla 6).

**Tabla 6.** Parámetros para modelo de inactivación en medio PBS modificado con grasa.

Microorganismo	Parámetros	Contenido de Grasa (%)			
		0,00%	5,00%	10,00%	20,00%
<i>Listeria monocytogenes</i>	SI (Shoulder length) (min)	7,49 (SE=2,25)	1,13 (SE=1,0)	4,13 (SE= 0,31)	5,65 (SE=3,08)
	kmax (1/min)	0,42 (SE=0,38)	0,40 (SE=0,08)	0,69 (SE=0,11)	0,23 (SE=0,47)
	LOG10(N_res) (cfu/ml)	-6,12	-5,81	-0,83	-6,26
	LOG10(N0) (cfu/ml)	0,02	0,01	0,00	0,05
	MSE	0,01	0,00	0,00	0,01
	RMSE	0,09	0,07	0,04	0,09
	R <sup>2</sup>	0,87	0,99	0,98	0,84
<i>Escherichia coli</i>	SI (Shoulder length) (min)	4,69 (SE= 0,4)	1,74 (SE=0,48)	2,26 (SE=0,55)	0 (SE=25,57)
	kmax (1/min)	0,71 (SE=0,15)	0,88 (SE=0,21)	0,70 (SE=0,14)	0,16 (SE=0,25)
	LOG10(N_res) (cfu/ml)	-1,08	-0,85	-1,07	-4,07
	LOG10(N0) (cfu/ml)	0,04	0,01	0,05	0,01
	MSE	0,00	0,01	0,01	0,01
	RMSE	0,07	0,07	0,08	0,08
	R <sup>2</sup>	0,97	0,96	0,96	0,97
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SI (Shoulder length) (min)	1,98 (SE=2,27)	1,67 (SE=0,63)	2,23 (SE=1,90)	2,36 (SE=0,18)
	kmax (1/min)	0,29 (SE=0,17)	0,44 (SE=0,06)	0,42 (SE=0,21)	1,63 (SE=0,27)
	LOG10(N_res) (cfu/ml)	-4,89	-6,21	-1,79	-0,54
	LOG10(N0) (cfu/ml)	0,00	0,00	0,00	0,00
	MSE	0,01	0,00	0,02	0,00
	RMSE	0,08	0,06	0,15	0,04
	R <sup>2</sup>	0,96	0,99	0,92	0,98

SL= Distancia del Hombro; Kmax= tasa de velocidad de inactivación; Log10\_Nres= población residual; Log10\_No= Población inicial; MSE= Sumatoria de cuadrados y R<sup>2</sup>=coeficiente de correlación y ajuste

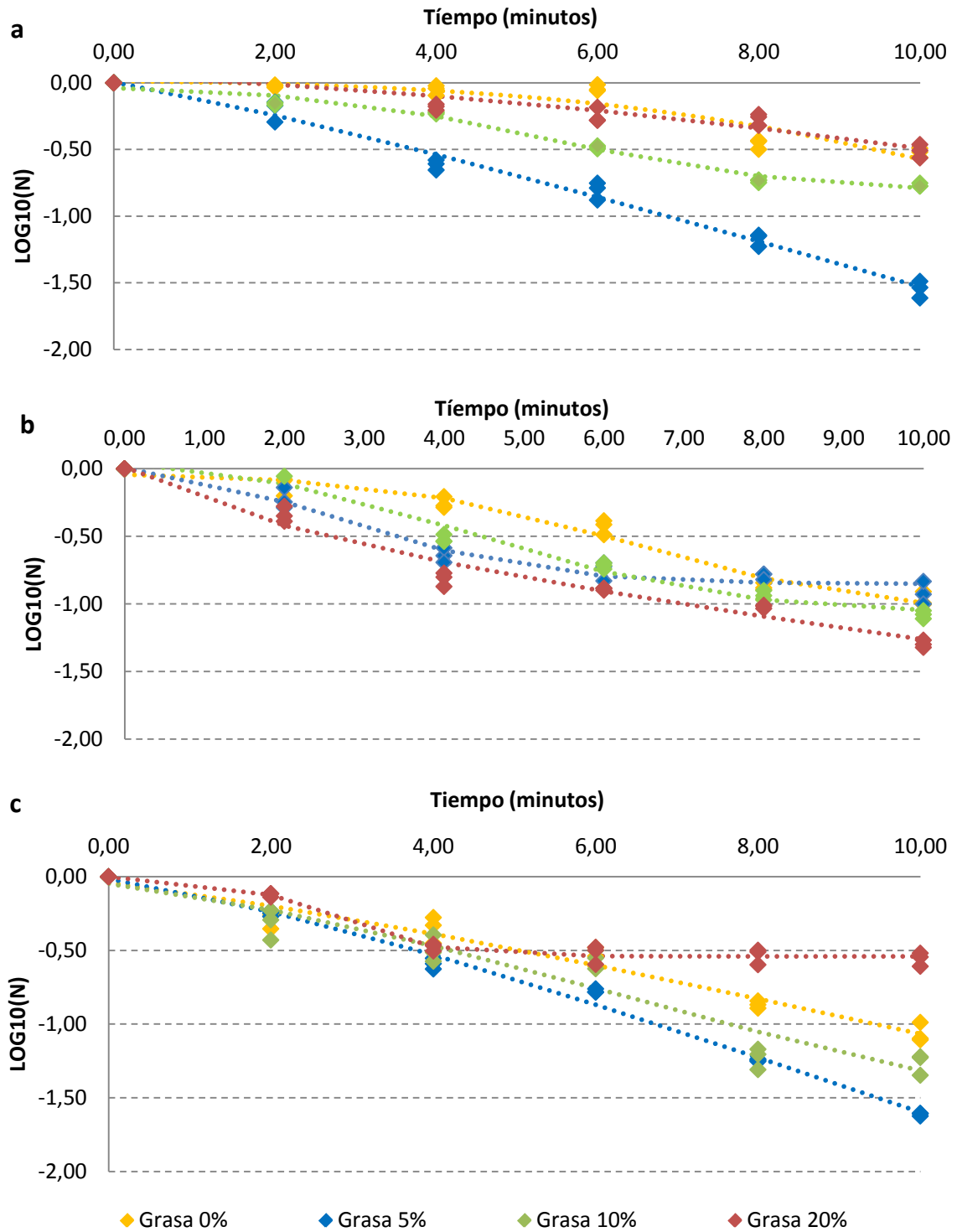
En todos los casos, el  $R^2$  más bajo que se obtuvo fue de 0,84, lo que indica que los modelos que se generaron presentaron un buen ajuste a los datos experimentales.

Los modelos obtenidos para *L. monocytogenes* mostraron que en las soluciones ajustadas con diferentes porcentajes de grasa, el parámetro SL (distancia del hombro) aumenta a mayor contenido de este factor (Figura 15a). Esto indica que durante los primeros minutos de tratamiento se presenta una resistencia microbiana al ultrasonido que se incrementa cuando el medio tiene una mayor concentración de grasa. Probablemente esto pueda deberse a la hipótesis planteada por Barbosa et al. (2009) y que fue explicada en secciones anteriores, la cual propone que las bacterias pueden ocultarse en el interior de los glóbulos de grasa que fueron lisados durante los tratamientos y protegerse de factores como el calor y la cavitación.

Al analizar el parámetro del hombro (SL) y el Kmax obtenido para *E. coli*, no se observó una relación directa entre la concentración de grasa y el tiempo requerido para iniciar una inactivación microbiana efectiva y la velocidad de inactivación. Sin embargo, se puede decir en términos generales que los resultados para el contenido de grasa para las dos bacterias muestran la siguiente tendencia: a medida que aumenta la concentración de la misma en el medio, la velocidad de inactivación (Kmax) disminuye (Tabla 6), sin embargo el parámetro que representa el hombro (SL), muestra que a mayor contenido graso, más rápidamente procede el efecto del ultrasonido, pero el grado de inactivación es menor (Figuras 15a y 15b).

Por otro lado, en el caso de la levadura (Figura 15c), se observó que el nivel de inactivación aumentó a medida que la concentración de grasa fue mayor, de esta manera el mayor valor para el Kmax se obtuvo con tratamientos de ultrasonido a soluciones con un 20,0% de grasa, mientras que el menor valor se presentó para tratamientos realizados a 5,0% de grasa.

Estos resultados sugieren que para los tres microorganismos estudiados existen unos rangos en contenido de grasa que deben tenerse en cuenta para el diseño de tratamientos ultrasónicos más efectivos.



**Figura 15.** Modelos de inactivación microbiana por ultrasonido en medio PBS modificado con grasa. **a)** *Listeria monocytogenes*; **b)** *Escherichia coli* y **c)** *Saccharomyces cerevisiae*. **Símbolos sólidos:** Datos observados. **Líneas punteadas:** Modelo de Geeraerd et al. (2000).

#### 6.4.4 EFECTO DEL pH SOBRE LA CINÉTICA DE INACTIVACIÓN MICROBIANA POR ULTRASONIDO

Los parámetros cinéticos de inactivación obtenidos para *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. cerevisiae* en PBS a pH modificado con ácidos inorgánicos y orgánicos son presentados en las Tablas 7 y 8 respectivamente.

**Tabla 7.** Parámetros para modelo de inactivación en medio PBS con pH modificado.

Microorganismo	Parámetros	pH			
		7,00	4,00	5,00	6,00
<i>Listeria monocytogenes</i>	SI (Shoulder length) (min)	7,49 (SE=2,25)	0 (SE= 1534,9)	2,25 (SE=0,36)	6,5 (SE=0,21)
	kmax (1/min)	0,42 (SE=0,38)	0,07 (SE= 1,25)	0,64 (SE=0,08)	1,54 (SE=0,28)
	LOG10(N_res) (cfu/ml)	-6,12	-1,26	-1,12	-0,75
	LOG10(N0) (cfu/ml)	0,02	0,00	0,01	0,00
	MSE	0,01	0,00	0,00	0,00
	RMSE	0,09	0,05	0,05	0,06
	R <sup>2</sup>	0,87	0,99	0,99	0,97
<i>Escherichia coli</i>	SI (Shoulder length) (min)	4,69 (SE= 0,4)	0,68 (SE=1,53)	2,62 (SE=0,55)	0 (SE=25,57)
	kmax (1/min)	0,71 (SE=0,15)	0,36 (SE=0,13)	0,70 (SE=0,14)	0,16 (SE=0,25)
	LOG10(N_res) (cfu/ml)	-1,08	-1,03	-1,07	-4,07
	LOG10(N0) (cfu/ml)	0,04	0,00	0,05	0,01
	MSE	0,00	0,00	0,01	0,01
	RMSE	0,07	0,06	0,08	0,08
	R <sup>2</sup>	0,97	0,98	0,97	0,97
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SI (Shoulder length) (min)	1,98 (SE=2,27)	0 (SE=0,77)	0 (SE=82,19)	0 (SE=2,11)
	kmax (1/min)	0,29 (SE=0,17)	0,52 (SE=0,07)	0,15 (SE=0,42)	0,48 (SE=0,17)
	LOG10(N_res) (cfu/ml)	-4,89	-1,94	-1,20	-1,04
	LOG10(N0) (cfu/ml)	0,00	0,00	0,00	0,00
	MSE	0,01	0,00	0,00	0,00
	RMSE	0,08	0,07	0,05	0,04
	R <sup>2</sup>	0,96	0,99	0,99	0,99

SL= Distancia del Hombro; Kmax= tasa de velocidad de inactivación; SE= Error estándar; Log10\_Nres= población residual; Log10\_No= Población inicial; MSE= Sumatoria de cuadrados y R<sup>2</sup>=coeficiente de correlación y ajuste.

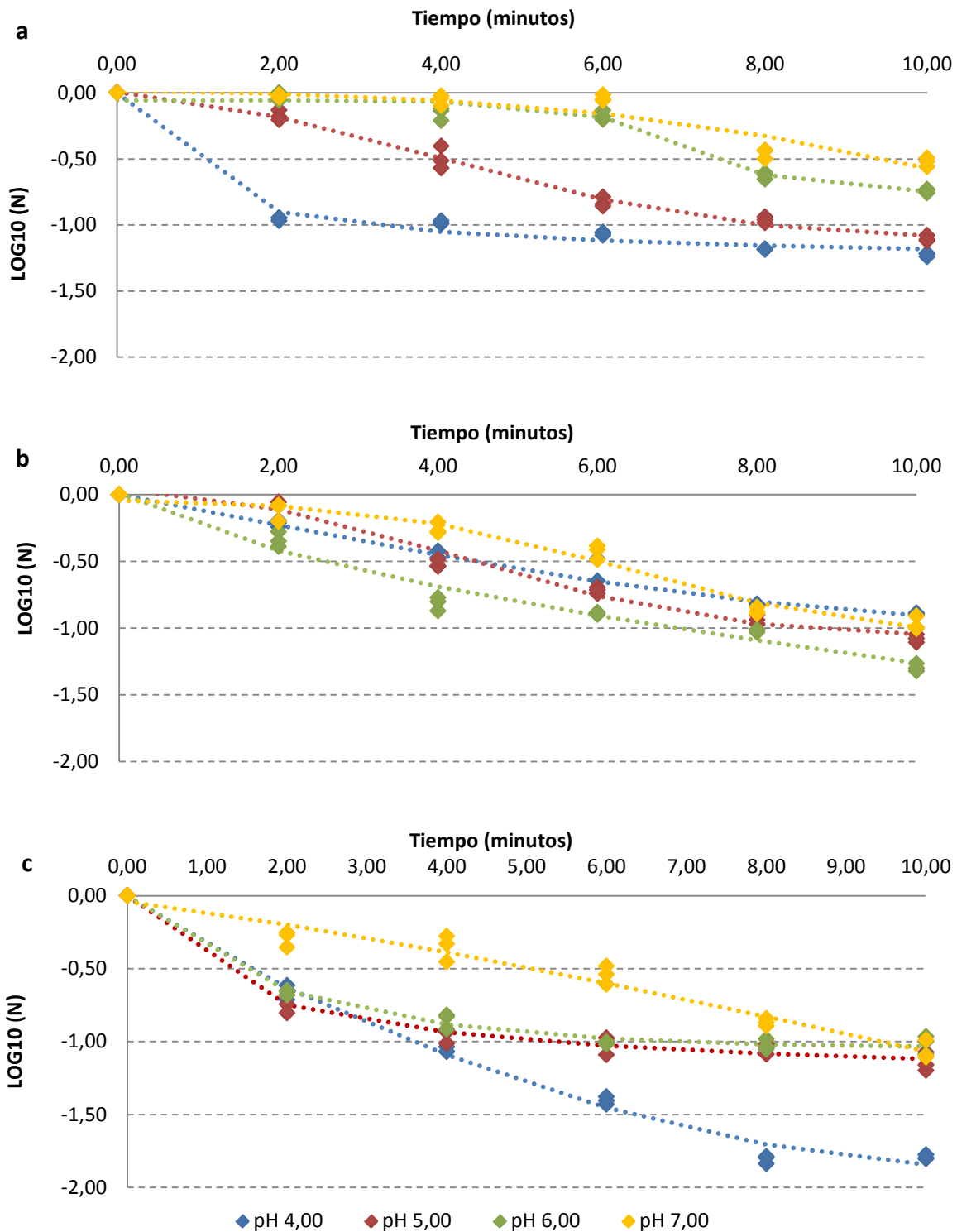


Todos los modelos que se generaron (Figuras 16 y 17) presentaron un ajuste adecuado a los datos experimentales, siendo 0,87 el valor de R<sup>2</sup> más bajo que se obtuvo.

**Tabla 8.** Parámetros para modelo de inactivación en medio PBS con pH modificado con ácido cítrico.

Microorganismo	Parámetros	pH		
		7,00	2,50	4,00
<i>Listeria monocytogenes</i>	SI (Shoulder length) (min)	7,49 (SE=2,25)	1,8 (SE=3,48)	1,78 (SE=0,04)
	kmax (1/min)	0,42 (SE=0,38)	0,23 (SE=0,20)	2,27 (SE=0,23)
	LOG10(N_res) (cfu/ml)	-6,12	-5,58	-1,04
	LOG10(N0) (cfu/ml)	0,02	0,00	0,00
	MSE	0,01	0,00	0,00
	RMSE	0,09	0,06	0,02
	R <sup>2</sup>	0,87	0,96	1,00
<i>Escherichia coli</i>	SI (Shoulder length) (min)	4,69 (SE= 0,4)	2,43 (SE=1,76)	1,95 (SE=0,41)
	kmax (1/min)	0,71 (SE=0,15)	0,35 (SE=0,19)	0,67 (SE=0,12)
	LOG10(N_res) (cfu/ml)	-1,08	-1,33	-0,77
	LOG10(N0) (cfu/ml)	0,04	0,00	0,00
	MSE	0,00	0,01	0,00
	RMSE	0,07	0,09	0,04
	R <sup>2</sup>	0,97	0,95	0,98
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SI (Shoulder length) (min)	1,98 (SE=2,27)	3,90 (SE=0,39)	0 (SE= 3,30)
	kmax (1/min)	0,29 (SE=0,17)	0,59 (SE=0,07)	0,25 (SE=0,15)
	LOG10(N_res) (cfu/ml)	-4,89	-7,10	-1,24
	LOG10(N0) (cfu/ml)	0,00	0,00	0,02
	MSE	0,01	0,00	0,00
	RMSE	0,08	0,06	0,05
	R <sup>2</sup>	0,96	0,99	0,98

SL= Distancia del Hombro; Kmax= tasa de velocidad de inactivación; SE= Error estándar; Log10\_Nres= población residual; Log10\_No= Población inicial; MSE= Sumatoria de cuadrados y R<sup>2</sup>=coeficiente de correlación y ajuste.



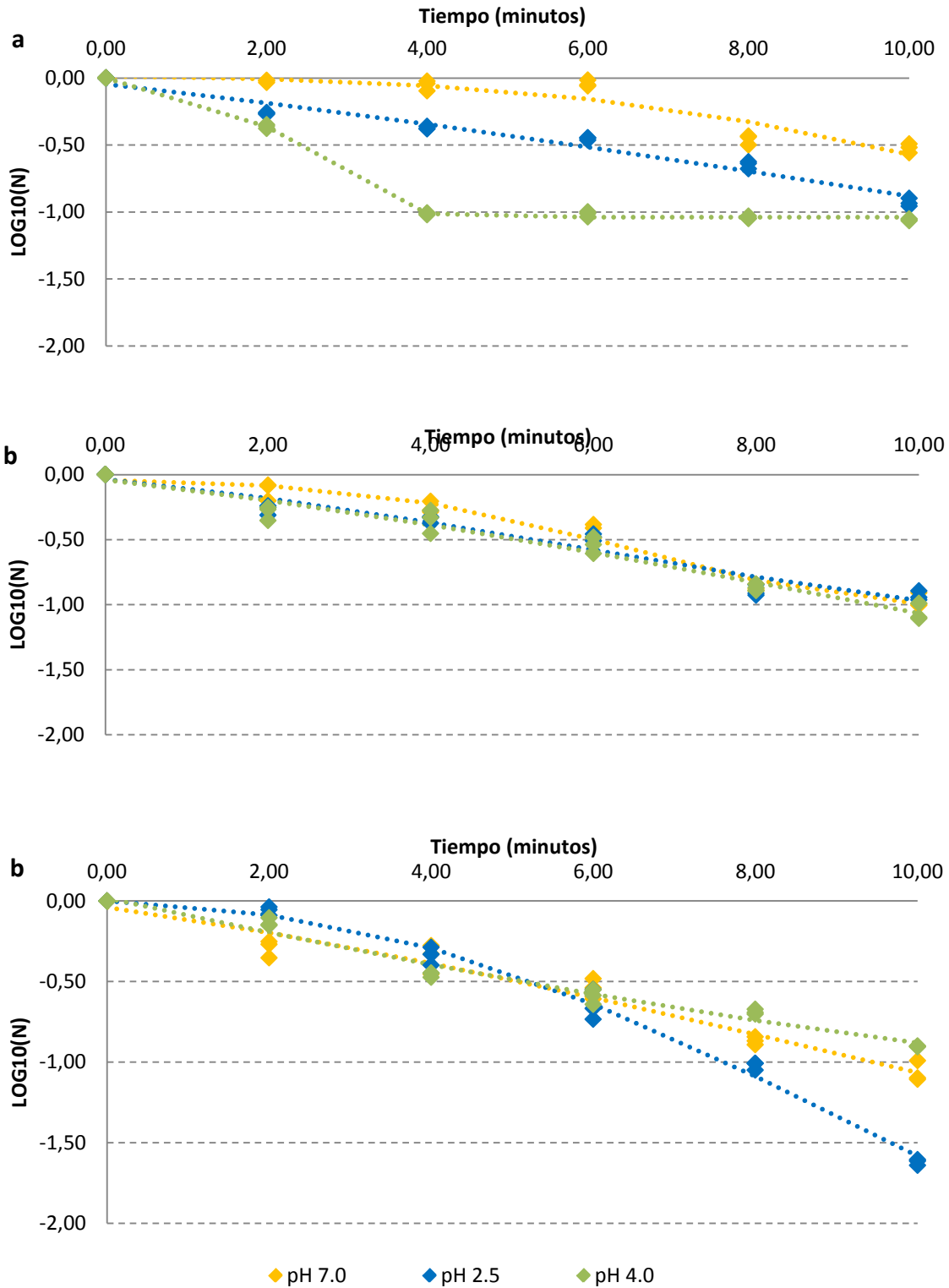
**Figura 16.** Modelos de inactivación microbiana por ultrasonido en medio PBS modificado con ácido inorgánico. **a)** *Listeria monocytogenes*; **b)** *Escherichia coli* y **c)** *Saccharomyces cerevisiae*. **Símbolos sólidos:** Datos observados. **Líneas punteadas:** Modelo de Geeraerd et al. (2000).

Los datos obtenidos para el medio con pH modificado con ácidos inorgánicos, mostraron para *L. monocytogenes* una disminución en el tiempo de respuesta (SL, distancia del hombro) a medida que el pH se aproximó a la neutralidad (pH 7,0). También se encontró que una mayor acidez en el medio generó velocidades de inactivación menores ( $K_{max}$ ), lo que indica que tratamientos ultrasónicos a pH no ácidos podrían tener un mejor efectividad para la inactivación de este tipo de microorganismos. Este mismo comportamiento se observó en los modelos desarrollados para las muestras de *L. monocytogenes* y *E. coli* tratadas en soluciones ajustadas con ácidos orgánicos (Figura 17a y Tabla 8).

Por otro lado, al analizar el parámetro del hombro (SL) y el  $K_{max}$  obtenido para *E. coli* en soluciones ajustadas con ácidos inorgánicos, no se observó una relación directa entre la acidez del medio y el tiempo requerido para iniciar una inactivación microbiana efectiva, ni una relación directa entre este factor intrínseco y la velocidad de inactivación. Se observó que a pH 7,0 tanto para el caso de las soluciones ajustadas con ácido inorgánico como para las ajustadas con ácido orgánico, se obtuvieron los mejores resultados de inactivación celular con valores de  $K_{max}$  mayores (Figuras 16b y 17b).

Para la levadura, tampoco se observó una relación directa entre la acidez del medio y el tiempo requerido para iniciar una inactivación microbiana efectiva, ni una relación directa entre este factor intrínseco y la velocidad de inactivación (Figuras 16c y 17c).

Adicionalmente, comparando los resultados obtenidos a pH 4,0, tanto en soluciones modificadas con ácidos orgánicos como inorgánicos, se encontró que en el primer caso se generó un mayor nivel de inactivación que lo ocurrido al tratar soluciones ajustadas con ácidos inorgánicos, lo que sugiere también que la naturaleza de los ácidos podría ejercer un efecto significativo sobre la cinética de inactivación microbiana por ultrasonido.



**Figura 17.** Modelos de inactivación microbiana por ultrasonido en medio PBS modificado con ácido cítrico. **a)** *Listeria monocytogenes*; **b)** *Escherichia coli* y **c)** *Saccharomyces cerevisiae*. **Símbolos sólidos:** Datos observados. **Líneas punteadas:** Modelo de Geeraerd et al. (2000).

Estos resultados apuntan, como ya se mencionó anteriormente, a que el tratamiento combinado de ultrasonido con soluciones ácidas puede mejorar en gran medida la efectividad del tratamiento, tal como lo sugiere Sagong et al. (2011) en su investigación de ultrasonido combinado con ácidos orgánicos para la conservación de vegetales, sin llegar a extremos como se evidenció con los resultados obtenidos a pH 2,5., donde no se obtuvieron buenos resultados.

En este caso también se puede decir que para los tres microorganismos estudiados existen unos rangos de pH que deben tenerse en cuenta para el diseño de tratamientos ultrasónicos más efectivos.

## 6.5. DISCUSIÓN FINAL

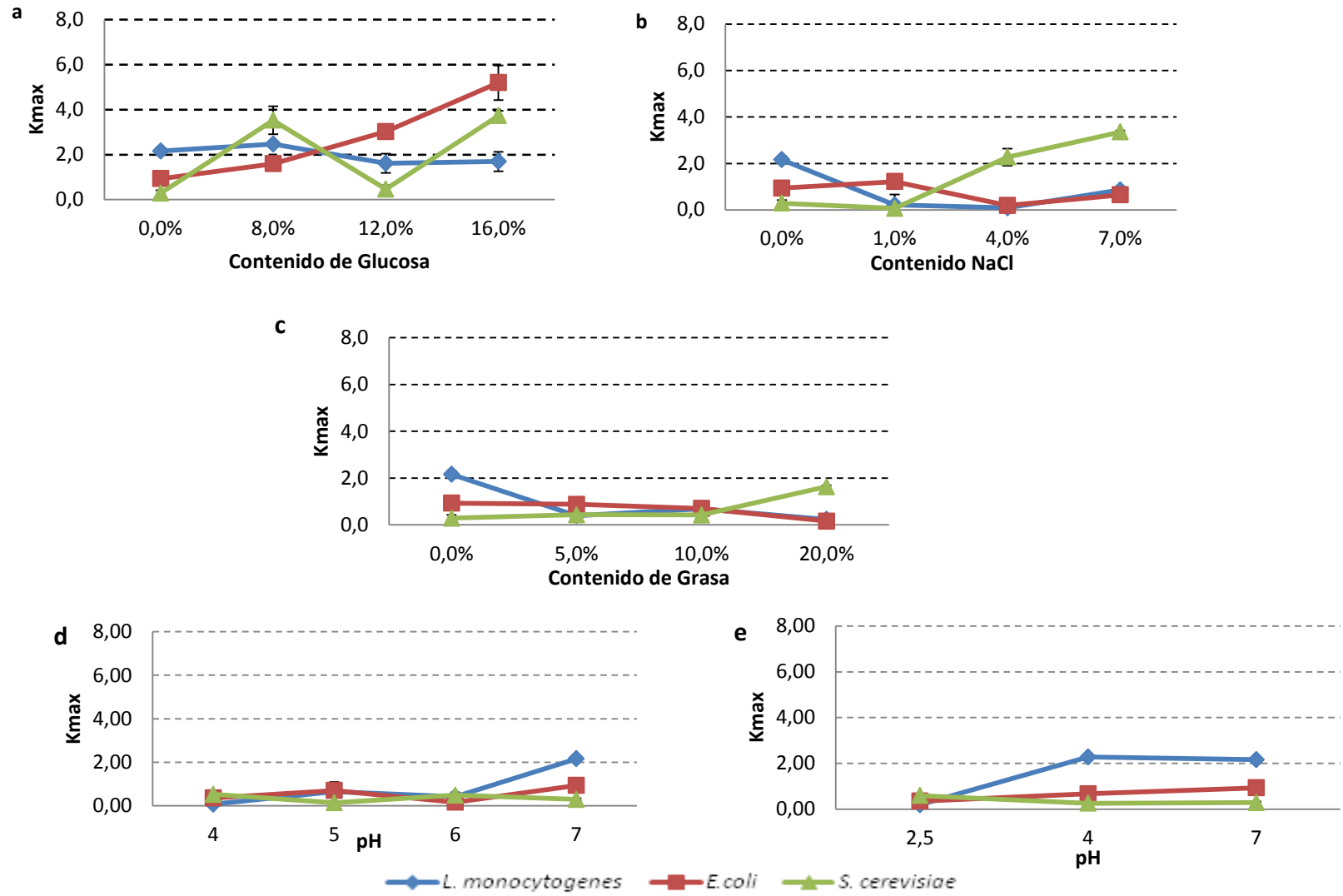
A nivel general, los modelos de inactivación microbiana obtenidos para los controles (PBS) mostraron un hombro pronunciado (SL=6,99) para *Listeria monocytogenes*, un hombro un poco menos marcado para *Escherichia coli* (SL=5,16) y un modelo que aunque posee un valor para el parámetro de distancia del hombro, muestra una inactivación de tipo lineal para *Saccharomyces cerevisiae* (SL=2,36).

De acuerdo con Mossel et al. (1995), existen posibles explicaciones para la aparición del hombro en la curva de inactivación microbiana. Una de ellas es que los organismos se encuentran acumulados en grupos, y cada grupo se encuentra representado por una sola colonia, por lo que el largo del hombro coincide con el tiempo que lleva matar un organismo en ese grupo. Otra de las explicaciones consiste en que el hombro representa un periodo durante el cual las células tienen la capacidad de re-sintetizarse y mueren cuando la tasa de destrucción sobrepasa la tasa de síntesis. Lo anterior puede sugerir que existe una resistencia de los microorganismos relacionada con su pared celular, donde las bacterias Gram-positivas son más resistentes al ultrasonido, por lo que tarda más en hacerse evidente el efecto del tratamiento. Esto concuerda con los resultados discutidos en el numeral 6.1., en donde se menciona la hipótesis, de que las células de *S. cerevisiae* por ser de mayor tamaño, son más sensibles que las células de *E. coli* y *L. monocytogenes* que manejan tamaños menores y donde se explican las diferencias en los niveles de inactivación logrados en relación a la naturaleza de la pared celular de cada uno de los microorganismos.

Por otro lado, teniendo en cuenta que la tasa de inactivación microbiana ( $K_{max}$ ) es uno de los parámetros más relevantes para evaluar la efectividad de los tratamientos, se realizó un análisis comparativo para establecer la relación de este parámetro con los diferentes factores cinéticos evaluados y para los tres microorganismos estudiados (Tabla 9 y Figura 18).

**Tabla 9.** Influencia de los factores intrínsecos evaluados sobre la tasa de inactivación microbiana ( $k_{max}$ )

<b>Microorganismo</b> <b>Característica</b>	<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	<b><i>Escherichia coli</i></b>	<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>
<b>A mayor concentración de Glucosa:</b>	No se presentaron diferencias significativas en la tasa de inactivación	Mayor tasa de inactivación	No se pudo establecer una relación directa entre el factor y la tasa de inactivación
<b>A mayor concentración de NaCl:</b>	No se pudo establecer una relación directa entre el factor y la tasa de inactivación	No se pudo establecer una relación directa entre el factor y la tasa de inactivación	Mayor tasa de inactivación
<b>A mayor porcentaje de Grasa:</b>	Menor tasa de inactivación	Menor tasa de inactivación	Mayor tasa de inactivación
<b>A menor pH (ácido inorgánico):</b>	Mayor tasa de inactivación	No se presentaron diferencias significativas en la tasa de inactivación	No se presentaron diferencias significativas en la tasa de inactivación
<b>A menor pH (ácido cítrico):</b>	Mayor tasa de inactivación	Mayor tasa de inactivación	No se presentaron diferencias significativas en la tasa de inactivación



**Figura 18.** Efecto de la composición del medio sobre el parámetro cinético  $k_{max}$ . **a:** Glucosa. **b:** NaCl. **c:** Grasa. **d:** pH y **e:** Ácido cítrico.

En todos los casos se encontró una respuesta cepa-dependiente, ya que no se logró establecer una tendencia generalizada del efecto de cada uno de los factores sobre la cinética de inactivación microbiana. Es importante tener en cuenta también que aparentemente cada microorganismo tiene unos rangos de glucosa, sal, grasa y pH, en los que presenta mayor sensibilidad a los tratamientos con ultrasonido. En la Tabla 10 se presentan las mejores condiciones seleccionadas para cada microorganismo, a las cuales el tratamiento ultrasónico fue más efectivo. Estas condiciones, así como las consideraciones a las que se llegó en la Tabla 9, pueden servir de aproximación para el diseño e implementación de este tipo de tecnologías a nivel industrial, ya que dan información relevante para comprender las limitaciones y los alcances del ultrasonido en diferentes matrices alimentarias.

**Tabla 10.** Condiciones óptimas de tratamiento por microorganismo y propiedad intrínseca evaluada.

<b>Microorganismo</b> <b>Propiedad</b>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>Glucosa</b>	8,0%	16,0%	16,0%
<b>NaCl</b>	7,0%	1,0%	7,0%
<b>Grasa</b>	10,0%	5,0%	20,0%
<b>pH</b>	6,0	5,0	4,0
<b>Ácido cítrico (pH)</b>	4,0	4,0	2,5



## 7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren que la efectividad de los tratamientos, así como el mecanismo de inactivación por ultrasonido, se encuentran relacionados con el tipo de pared celular de los microorganismos tratados, ya que cada uno de los microorganismos evaluados en este trabajo (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*), presentaron respuestas diferentes al tratamiento ultrasónico bajo las distintas condiciones intrínsecas evaluadas.

Se comprobó que los tratamientos ultrasónicos de alta intensidad aplicados, con frecuencia de 24KHz y amplitud de 120  $\mu\text{m}$ , fueron efectivos para reducir significativamente la concentración celular de los tres microorganismos estudiados, en solución tampón (PBS), siendo la bacteria Gram-positiva (*L. monocytogenes*) la más resistente a los tratamientos y la levadura (*S. cerevisiae*) la más sensible.

En todos los casos se observó que a mayor tiempo de tratamiento se obtuvieron mayores reducciones logarítmicas en la concentración celular de los tres microorganismos estudiados. Adicionalmente se evidenció que después de 8,0 minutos de tratamiento la efectividad del ultrasonido fue significativamente mayor.

Los modelos obtenidos a partir de la ecuación de Geeraerd presentaron un buen ajuste a los datos experimentales con un  $R^2$  mínimo de 0,84. Así mismo, los parámetros cinéticos de inactivación estimados sirvieron para explicar el comportamiento de los microorganismos en cada uno de los tratamientos aplicados. Sin embargo a pesar de los buenos ajustes, se observó en el caso de *Escherichia coli* (glucosa 16%), *Saccharomyces cerevisiae* (glucosa 8%) y *Listeria monocytogenes* (NaCl del 1%) que los valores del parámetro cinéticos  $K_{\text{max}}$  no describían completamente los datos experimentales debido a que sobreestimaban los resultados experimentales.

Se comprobó que a mayor concentración de glucosa en el medio, se presentó una menor tasa de inactivación para *L. monocytogenes*, una mayor tasa de inactivación para *E. coli* y no se pudo establecer una relación directa entre el factor y la tasa de inactivación para *S. cerevisiae*, cuando se aplicaron tratamientos ultrasónicos.

Aunque no se pudo establecer una relación directa entre la concentración de sal en el medio y la tasa de inactivación microbiana por ultrasonido para las dos bacterias evaluadas, sí se encontró que a mayor contenido de NaCl se obtuvo una mayor tasa de inactivación para la levadura.

Se evidenció que cuando se aplicaron tratamientos de ultrasonido sobre muestras con mayor contenido de grasa, la tendencia general fue de una menor tasa de inactivación para las dos bacterias y de una mayor tasa de inactivación para la levadura.

Los tratamientos ultrasónicos sobre muestras con bajo pH presentaron mejor efectividad a nivel de inactivación microbiana, siendo los medios ácidos los que favorecieron la sensibilidad de los microorganismos al efecto de los tratamientos.

En todos los casos se encontró una respuesta cepa-dependiente, ya que no se logró establecer una tendencia generalizada del efecto de cada uno de los factores sobre la cinética de inactivación microbiana.

Los resultados obtenidos sugieren que cada microorganismo tiene unos rangos de glucosa, sal, grasa y pH, en los que presenta mayor sensibilidad a los tratamientos con ultrasonido. Estos rangos deben ser tenidos en cuenta para el diseño e implementación de esta tecnología a nivel industrial.

Aunque no se presentó una tendencia clara en los resultados de inactivación de los microorganismos frente a los factores intrínsecos del medio, si es claro que estos factores ejercen un efecto significativo sobre la cinética de inactivación microbiana por ultrasonido y son determinantes para la efectividad de los tratamientos.

El ultrasonido de alta intensidad podría implementarse a nivel industrial, como una alternativa diferente a las tecnologías convencionales, o como complemento a las mismas, para la reducción de carga microbiana, cuya aplicación podría extrapolarse a diferentes tipos de productos.

## 8. RECOMENDACIONES

Es de gran importancia estudiar más a fondo el efecto de estos factores sobre la efectividad de los tratamientos ultrasónicos, no solo de manera individual, sino también sus interacciones, para lograr un acercamiento más real a lo que ocurre a nivel de la industria alimentaria.

Se recomienda validar estos resultados en diferentes matrices alimentarias, para poder establecer la respuesta de los microorganismos al tratamiento ultrasónico bajo condiciones más complejas.

Así mismo se recomienda estudiar la efectividad de los tratamientos de ultrasonido sobre la inactivación de más tipos de microorganismos, así como de consorcios microbianos, que es lo que normalmente se encuentra en los productos alimenticios.

Es relevante realizar ensayos que evalúen el posible daño subletal que podría generar el ultrasonido de alta intensidad, porque hasta el momento no se han encontrado reportes que hagan referencia a este tema, y esta información permitiría una implementación más segura de esta tecnología nivel industrial.

Entonces, si una empresa o está interesada en hacer innovaciones en tecnologías de procesamiento como el ultrasonido de alta intensidad, la implementación de esta tecnología a nivel industrial requiere estudiar ampliamente las características fisicoquímicas de cada matriz alimentaria y debe realizarse un análisis particular que potencie y optimice su uso, que defina sus límites y alcances, en el cual se tengan en cuenta consideraciones de costo, soporte técnico y otras variables importantes en un proceso tecnológico.

La necesidad de implementar tecnologías competitivas en los mercados internacionales para la producción de alimentos inocuos y de características organolépticas naturales, debe desencadenar la ejecución de políticas y acciones concretas por parte de los entes oficiales y privados además de un aseguramiento en la calidad de las mismas, por tanto se recomiendan

estudios acerca de efectos secundarios (sobre propiedades sensoriales y nutricionales) tratamientos que involucren nuevas tecnologías, como el ultrasonido de alta intensidad.

## REFERENCIAS

Adekunte, A., Tiwari, B.K., Scannell, A., Cullen, P.J. y O'Donnell, C. (2010). Modelling of yeast inactivation in sonicated tomato juice. *International Journal of Food Microbiology*, 137: 116–120.

Adekunte, A.O., Tiwari, B.K., Cullen, P.J., Scannell, A.G.M. y O'Donnell, C.P. (2010). Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chemistry* doi: [10.1016/j.foodchem.2010.01.026](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.026).

Adekunte, M. A., Valdramidis, V.P., Tiwari, B.K., Slone, N., Cullen, P.J., O'Donnell, C.P. y Scannell, A. (2010). Resistance of *Cronobacter sakazakii* in reconstituted powdered infant formula during ultrasound at controlled temperatures: A quantitative approach on microbial responses. *International Journal of Food Microbiology*, 142: 53–59.

Aleman, G., Farkas, D.F., Torres, J.A., Wilhelmsen, E. y McIntyre, S. (1994). Ultra high pressure pasteurization of fresh cut pineapple. *Journal of Food Protection*, **57**(10):931–934.

Alliger, H. (1975). Ultrasonic disruption. *American Laboratory*, 10:75-85.

Álvarez, I., Pagan, R., Raso, J., Codo, S. y Sala, F.J. (2000). Microbial Inactivation by Ultrasound. *Food Technology*, University of Zaragoza, Miguel Servet, 177. 50013.

Álvarez, I., Mañas, P., Sala, F. J. y S. Condón, S. (2003). Inactivation of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis by Ultrasonic Waves under Pressure at Different Water Activities. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 668–672.

Ananta, E., Voigt, D., Zenker, M., Heinz, V. y Knorr, D. (2005). Cellular injuries upon exposure of *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* to high-intensity ultrasound. *Journal of Applied Microbiology*. 99: 271–278.

Arroyo, C., Cebrián, G., Pagán, R. y Condón, S. (2011). Inactivation of *Cronobacter sakazakii* by ultrasonic waves under pressure in buffer and foods. *International Journal of Food Microbiology*, 144: 446–454.

Arnold, G., Leiteritz, S., Zahn, S. y Rohm, H. (2009). Ultrasonic cutting of cheese: composition affects cutting work reduction and energy demand. *International Dairy Journal*, 19: 314-320.

Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilku, K. y Versteeg, C. (2008). Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: A preliminary study on a model system. *Innovative Food Science and Emerging Technologic*s. 9, 155-160.

Baranyi, J., Pin, C., y Roos, T. (1999). Validating and comparing predictive models. *International Journal of Food Microbiology*, 48: 159-166.

Bermúdez-Aguirre, D. y Barbosa-Cánovas, G. V. (2006). Microstructure of fat globules in whole milk after thermo-sonication treatments. Presented at IFT Annual Meeting, Orlando, FL, 24–28.

Bermúdez-Aguirre, D. y Barbosa-Canovas, G.V. (2008). Study of butter fat content in milk on the inactivation of *Listeria innocua* ATCC 51742 by thermo-sonication. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9: 176-185.

Bermúdez-Aguirre, D., Mawson, R., Versteeg, K. y Barbosa-Canovas, G (2009). Composition Properties, Physicochemical Characteristics And Shelf Life Of Whole Milk After Thermal And Thermo-Sonication Treatments. *Journal Of Food Quality*, 32: 283–302.

Boone, D.R., 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacterology*: 2<sup>nd</sup> edition. Vol 1: 1208-1234.

Boistier-Marquis, E., Lagsir-Oulagal, N. y Callard, M. (1999). Applications Des ultrasons de puissances en industries alimentaires. *Industrial . Alimentary . Agriculture*, 116: 23-31.

Brown, T., James, S.J. y Purnell, G.L. (2005). Cutting forces in foods: experimental measurements. *Journal of Food Engineering*, 70: 165-170.

Buchanan, R. (1993). Predictive food microbiology. *Trends Food Science Technology*, 4: 6-11.

Cabeza, M.C., Cárcel, J.A., Ordóñez, J.A., Cambero, I., De la Hoza, L., Garcia, M.L. y Benedito, J. (2010). Relationships among selected variables affecting the resistance of *Salmonella enterica*, serovar Enteritidis to thermosonication. *Journal of Food Engineering*, 98: 71–75.

Cameron, M., McMaster y L., Britz, T. (2008). Electron microscopic analysis of dairy microbes inactivated by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 960:964.

Cameron, M., McMaster y L., Britz, T. (2009). Impact of ultrasound on dairy spoilage microbes and milk components. *Dairy Science Technology*, 89: 83-98.

Camino, N.A., Pérez, O.E. y Pilosof, A. (2009). Molecular and functional modification of hydroxypropylmethylcellulose by high-intensity ultrasound. *Food Hydrocolloids*, 23: 1089–1095.

Cao, S., Hu, Z. y Pang, B. (2010). Optimization of postharvest ultrasonic treatment of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 55: 150–153.

Cao, S., Hu, Z., Pang, B., Wang, H., Xie, H. y Wu, F. (2010). Effect of ultrasound treatment on fruit decay and quality maintenance in strawberry after harvest. *Food Control*, 21: 529–532.

Carrasco E., García-Gimeno, R., Seselovsky, R., Valero, A., Pérez, F., Zurera, G. y Todd, E. (2006). Predictive model of *Listeria Monocytogenes*' growth rate under different temperatures and acids. *Food Science Technology International*, 12(1):47–56.



Cartwright, D. (1998). "Off the-shelf" ultrasound instrumentation for the food industry. In *Ultrasound in food processing*. Povey, M. J. W. and T. J. Mason (ed.). Blackie Academic y Professional. London.

Cielo D. Char, C., Mitilinaki, E., Guerrero, S.N y Alzamora, S. (2010). Use of high-intensity ultrasound and UV-C Light to inactivate some microorganisms in fruit juices. *Food Bioprocess Technology*, 3:797–803.

Chemat, F., Huma, Z y Khan, M. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18: 813–835.

Chouliara, E., Georgogianni, K.G., Kanellopoulou, N. y Kontominas, M.G. (2010). Effect of ultrasonication on microbiological, chemical and sensory properties of raw, thermized and pasteurized milk. *International Dairy Journal*, in press: 1–7.

Coroller, L., Leguerinel, I., Mettler, E., Savy, N. y Mafart, P. (2006). General model, based on two mixed Weibull distributions of bacterial resistance, for describing various shapes of inactivation curves. *Applied and Environmental Microbiology*: 6493–6502.

Coupland, J.N. (2004). Low intensity ultrasound. *Food Research International*, 37: 537–543.

Cohen, J.S. y Yang, T.C.S. (1995). Progress in food dehydration. *Trend food Science Technology*, 6: 20-25.

Czank, C., Simmer, K y Hartmann, P. (2010). Simultaneous pasteurization and homogenization of human milk by combining heat and ultrasound: effect on milk quality. *Journal of Dairy Research*, 77: 183–189.

Chow, R., Blindt, R., Chivers, R. y Povey, M. (2005). A study on the primary and secondary nucleation of ice by power ultrasound. *Ultrasonics*, 43: 227-230.

D'Amico, D. J., Silk, T. M., Wu, J. y Mingruo, G. (2006). Inactivation of microorganisms in milk and apple cider treated with ultrasound. *Journal of Food Protection*, 69: 556-563.

De la Fuente Blanco, S., Riera-Franco de Sarabia, E., y Gallego Juárez, J. A. (2004). Estudio de los parámetros involucrados en el proceso de deshidratación ultrasónica de vegetales. *Revista de Acústica*, 35: 25-30.

De Llanos, R., Querol, A., Pemán, J., Gobernado, M. y Fernández-espinar, M.T. (2006). Food and probiotic strains from the *Saccharomyces cerevisiae* species as a possible origin of human systemic infections. *International Journal of Food Microbiology*, 110: 286–290.

Demirdöven, A. y Baysal, T. (2009). The Use of Ultrasound and Combined Technologies in Food Preservation. *Food Reviews International*, 25:1–11.

Deng, Y. y Zhao, Y. (2008). Effect of pulsed vacuum and ultrasound osmopretreatments on glass transition temperature, texture, microstructure and calcium penetration of dried apples (Fuji). *LWT - Food Science and Technology*, 41: 1575-1585.

Drakopoulou, S., Terzakis, S., Fountoulakis, M.S., Mantzavinos, D. y Manios, T. (2009). Ultrasound-induced inactivation of gram-negative and gram-positive bacteria in secondary treated municipal wastewater. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16: 629–634.

Dukhin, A. S., Goetz, P. J. y Travers, B. (2005). Use of Ultrasound for Characterizing Dairy Products. *J. Dairy Sci.* 88:1320–1334.

Earnshaw, R. G., Appleyard, J. y Hurst, R. M. (1995). Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 28, 197-219.

Elvira, L., Sampedro, L., Matesanz, J., Gómez-Ullate, Y., Resa, P., Iglesias J.R., Echevarría, F.J. y Montero de Espinosa, F. (2005). Non-invasive and non-destructive ultrasonic technique for the detection of microbial contamination in packed UHT milk. *Food Research International*, 38: 631–638.

Ensminger, D. (1988) Acoustic and electroacoustic methods of dewatering and drying. *Drying Technology*. 6: 473.

Eng, R.H.K., Drehmel, R., Smith, S.M., Goldstein, E.J.C., 1984. *Saccharomyces cerevisiae* infections in man. *Journal of Medical Veterinay Mycology*, 22: 403–407.

Ertugay, M.F., Sengül, M. y Sengül, M. (2004). Effect of ultrasound treatment on milk homogenisation and particle size distribution of fat. *Turkey Journal of Veterinary Animal Science.*, 28: 303-308

Factores que influyen en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos. Revisado el 9 de Noviembre de 2011 de: [http://www.ecured.cu/index.php/Factores\\_que\\_influyen\\_en\\_el\\_crecimiento\\_y\\_supervivencia\\_de\\_los\\_microorganismos](http://www.ecured.cu/index.php/Factores_que_influyen_en_el_crecimiento_y_supervivencia_de_los_microorganismos).

Fernandes, F.A.N., Linhares Jr., F.E. y Rodrigues, S. (2008). Ultrasound as pre-treatment for drying of pineapple. *Ultrasound sonochemistry*, 15: 1049-1054.

Floros, J. D., y Liang, H. (1994). Acoustically assisted diffusion through membranes and biomaterials: High-intensity ultrasound accelerates diffusion and can be used to improve food processes. *Food Technology*, 79.

Furuta, M., Yamaguchi, M. Tsukamoto, T., Yim, B., Stavarache, C.E., Hasiba, K. y Y. Maeda, Y. (2004). Inactivation of *Escherichia coli* by ultrasonic irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11: 57–60.

Gabriel, A. y Nakano, H. (2010). Responses of *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ½ c and salmonella enteritidis to pH,  $a_w$  and temperature stress combinations. *Food Control*, 21: 644-650.

Gallego-Juarez, J.A., Rodrigues-Corral, G., Acosta- Aparicio, V.M., Andres-Gallego, E., Blanco-Blanco, A. y Montoya-Vitini, F. (2002). Procedimiento y sistema ultrasónico de desespumación mediante emisores con placa vibrante escalonada . Sp. Patente, 2002 02113.

Gaze, J. (2005). A review: Microbiological aspects of thermally processed foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 1381–1386.

Geeraerd, A.H., Herremans, C.H. y Van Impe, J.F. (2000). Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 59 (3), 185-209

Golberg, A., Rae, S. y Rubinsky, B. (2012). *Listeria monocytogenes* cell wall constituents exert a charge effect on electroporation threshold. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1818: 689–694.

Gomez-López, V.M., Orsolani, L., Martínez Yepes, A. y Tapía, M.S. (2010). Microbiological and sensory quality of sonicated calcium-added orange juice. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 808–813

Gould, G.W. (1996). Methods for preservation and extension of shelf life. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 51-64.

Guerrero, S., López-Malo, S. y Alzamora, S.M. (2001). Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 2: 31-39.

Hajmeer, M.N. y Cliver D.O. (2002). Microbiology of food preservation and sanitation. foodborne diseases. 2<sup>nd</sup> Ed. Cliver, D.O. and Riemann, H. (Eds.) Academic Press, New York, NY. Chapter 22. Pp. 330-352.

Hauben, K. J. A., Bernaerts, K., Michiels, C. W. (1998). Protective effect of calcium on inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 678-684.

Horwitz, William (2005). [Official methods of analysis of AOAC International](#). 18th ed. Gaithersburg, Md.: AOAC International.

Hülsem, U. (1999). Alternative heat treatment processes. *European Dairy Magazine*, 3: 20-24.

Ince, N., Belen, R. (2001). Aqueous phase disinfection with power ultrasound: process kinetics and effect of solid catalysts. *Environmental Science and Technology*, 35 (9).

*International Journal of Food Microbiology* 110 (2006) 286–290 Sigma Aldrich: Material safety Data Sheet. Recuperado el 15 de Agosto de 2011 de: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/DisplayMSDSContent.do>

Jambrak., A.R., Lelas, V., Mason, T.J., Kresic, G. y Badanjak, M. (2009). Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of Food Engineering*, 93: 386-393.

Jambrak., A.R., Lelas, V., Mason, T.J., Herseg, Z. y Herseg, I.L (2008). Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, 86: 281-287.

Jambrak., A.R., Mason, T.J., Paniwnyk, L. y Lelas, V. (2007). Accelerated drying of button mushrooms, Brussels sprouts and cauliflower by applying power ultrasound and its rehydration properties. *Journal of Food Engineering*, 81: 88-97.

Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V. y Lee, D. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science y Technology*, 15: 261-266.

Kuldiloke, J. (2002). Effect of Ultrasound, Temperature and Pressure Treatments on Enzyme Activity and Quality Indicators of Fruit and Vegetable Juices. PhD Thesis. Technical University of Berlin. 118 Páginas.

Lee, H., Zhou, B., Liang, W., Feng, H. y Martin, S. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* cells with sonication, manosonication, thermosonication, and manothermosonication: Microbial responses and kinetics modeling. *Journal of Food Engineering*, 93: 354–364

Lee, D. U., Heinz, V., y Knorr, D. (2003). Effects of combination treatments of nisin and high-intensity ultrasound with pressure on the microbial inactivation in liquid whole egg. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4: 387-393.

Lida, Y., Tuziuti, T., Yasui, K., Towata, A. y Kosuka, T. (2008). Control of viscosity in starch and polysaccharide solutions with ultrasound after gelatinization. . *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9: 140-146.

Lilliard, H.S. (1994). Decontamination of poultry skin by sonication. *Food Technology*, 48 (12): 72-73.

Li, B. y Sun D.W. (2002a). Effect of power ultrasound on freezing rate during immersion freezing of potatoes. *Journal of Food Engineering*, 55: 277-282.

Li, B. y Sun D.W. (2002b). Novel methods for rapid freezing and thawing of foods-a review. *Journal of Food Engineering*, 54: 175-182.

López, P., Sala, F. J., Fuente, J. L., Condón, S., Raso, J., y Burgos, J. (1994). Inactivation of peroxidase, lipoxygenase, and polyphenol oxidase by manothermosonication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 252-256.

McClements, J. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science and Technology*. 6: 293-299.

Madigan M., Martinko, J. y Parker, J. (2008). Brock: *Biología de los microorganismos*. 12<sup>va</sup> Edición. Prentice Hall. Iberia. Madrid.

Mason T., Paniwnyk, L. y Lorimer, J. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3: 253-260.

Mason, I. L. (1996). *A world dictionary of livestock breeds, types and varieties*. 4 Ed. CABI Publishing. Wallingford, UK.

Mongenot, N., Charrier, S. y Chalier, P. (2000). Effect of ultrasound emulsification on cheese aroma encapsulation by carbohydrates. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48: 861-867.

McDonald, K. y Sun, D.W. (1999). Predictive food microbiology for the meat industry. *International Journal of Food Microbiology*, 52: 1-27

Mossel, D.A.A., Corry, J.E.L., Struijk, C.B. y Baird, R.M. (1995). A113–A116. Essentials of the Microbiology of Foods. Wiley, West Sussex, Doherty, A., McMahon, C.M.M., Sheridan, J.J., 1998. Thermal UK.

Murphy, A. y Kavanagh, K. (1999). Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen. Implications for biotechnology. *Enzyme Microbiology Technology*, 25: 551–557 (Review).

Nyborg, W. L. (1965). *Acoustic Streaming*, Vol. 2B, Academic Press, New York.

O'Brien, W.D. (2007). Ultrasound–biophysics mechanisms. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 93: 212-255.

Ordoñez, J. A., Aguilera, M.A., García, M.L. y Sanz, B. (1987). Effect of combined ultrasonic and heat treatment (thermoultrasonication) on the survival of a strain of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Science*, 54: 61-67.

O'Donnell, C.P. Tiwari, B.K., Bourke, P. y Cullen, P.J. (2010). Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science y Technology*, 21: 358-367

Pagán, R., Mañas, P., Álvarez, I. y Condón, S. (1999). Resistance of *Listeria monocytogenes* to ultrasonic waves under pressure at sublethal (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures. *Food Microbiology*, 16: 139-148.

Parish, M.E. (1998). Orange juice quality after treatment by thermal pasteurization or isostatic high pressure. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 31(5): 439–442.

Philippe, M., Gaucheron, F., Le graet, Y., Michel, F. y Garem F. (2007). Physicochemical characterization of calcium-supplemented skim milk. *Lait*, 83: 45-59.

Piyasena, P., Mohareb, E. & McKellar, R.C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 87: 207– 216

Presser, K. A., Ross, T. y Ratkowsky, D. A. (1998). Modelling the Growth Limits (Growth/No Growth Interface) of *Escherichia coli* as a Function of Temperature, pH, Lactic Acid Concentration, and Water Activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 64,( 5): 1773–1779.

Povey, M.J.W y Mason, T. J. (1998). *Ultrasound in Food Processing*. Springer. Berlin.

Roberts R.T., 1993. High intensity ultrasonics in food processing. *Chemical Industry*, 15: 119-121.

Rodriguez, G., Riera, E., Gallego-Juárez, J.A., Acosta, V.M., Pinto, A., Martínez, I. y Blanco, A. (2010). Experimental study of defoaming by air-borne power ultrasonic technology. *Physic procedia*, 3: 135-139.

*Saccharomyces cerevisiae*. Recuperado el 5 de Julio de 2011 de: <http://hongos-alergericos.reviberoammicol.com/files/039.PDF>

Sagong, H., Lee, S., Chang, P., Heu, S., Ryu, S., Choi, Y. y Kang, D. (2011). Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *International Journal of Food Microbiology*. Accepted manuscript. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.010.

Sala, F. J., Burgos, J., Condón, S., López, P., y Raso, J. (1995). Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. G. W. Gould, *New methods of food preservation*. Blackie Academic and Professional. pp. 176-204. London, England.



Sarabia Alegria, Jose Marí (2005). Curso Básico de estadística Economía y Administración de Empresas. Recuperado el 11 de Diciembre de 2011 de: <http://books.google.com.co/books?id=QEp1dROPOACypg=PA111ylpg=PA111ydg=medidas+de+bondad+y+ajusteysource=blyots=UVGsk9fvUxysig=JmF76440dyHAEuAnpEHpKv-Nlg8yhl=esysa=Xyei=LrrpTtHnLcyftwfKl7i1Cgyved=OCFgQ6AEwCQ#>

Shoh, A. (1998). In: Ultrasound:Chemical, Biological and Physical Effects. Ed. Suslick, K. S. pp 97-122.

Simal, S., Benedito, J., Sanchez, E.S. y Rosello, C. (1998). Use of ultrasound to increase mass transport rates during`smotic dehydration. Journal of Food Engineering, 36: 323-336.

Skinner, G.E. y Larkin, J.W. (1994). Mathematical modelling of bacterial growth. Journal Food Safety, 14: 175-217

Smith, D., Metzgar, D., Wills, C. y Fierer, J. (2002). Fatal Saccharomyces cerevisiae aortic graft infection. Journal of Clinical Microbiology, 40: 2691–2692.

Soh, W.K. y Willis, B. (2002). A flow visualization study on the movements of solid particles propelled by a collapsing cavitation bubble. Faculty of Engineering, University of Wollongong, New South Wales 2522, Australia.

Soria, A. C. y Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. Trends in Food Science y Technology, 21: 323-331

Sun, D.W. y Li, B. (2003). Microstructutal change of potato tissues frozen by ultrasound-assisted immersion freezing. Journal of Food Engineering, 57:337-345.

Suslick, K. S. (1998). In: Ultrasound:Chemical, Biological and Physical Effects. Ed. Suslick, K. S.,pp.:123-163.

Suslick, K. S., y Hammerton, D. A. (1985). Determination of local temperatures caused by acoustic cavitation, IEEE Ultrasonics Symposium Process, 4: 1116.

Szent, A. (1933). Chemical and biological effects of ultra-sonic radiation. Nature, 131: 278.

Taylor, M. J. y Richardson, T. (1980). Antioxidant activity of skim milk: effect of sonication. Journal of Dairy Science, 63: 1938-1942.

Tiwari, B.K., Muthukumarappana, K., O'Donella, C.P. y Cullen, P.J. (2009). Innovative Food Science and Emerging Technologies, 10: 166-171.

Valdramidis, V.P. Cullen, P.J., Tiwari, B.K. y O'Donnell, C.P. (2010). Quantitative modelling approaches for ascorbic acid degradation and non-enzymatic browning of orange juice during ultrasound processing. Journal of Food Engineering, 96: 449-454.

Vercet, A., Lopez, P. y Burgos, J. (1999). Inactivation of heat resistant pectinmethylesterase from orange by manothermosonication. Journal of Agricultural Food Chemical, 47: 432-437.

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L. y Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry: A review. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 9: 161-169.

Villamiel, M. y de Jong, P. (2000). Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins, and native enzymes of milk. Department of Process Innovation, NIZO Food Research. The Netherlands. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 48:472-478.

Walkling-Ribeiro, M. , Noci, F., Cronin, D.A., Riener, J., Lyng, J.G. y Morgan D.J. (2008). Reduction of Staphylococcus aureus and quality changes in apple juice processed by ultraviolet irradiation, pre-heating and pulsed electric fields. Journal of Food Engineering, 89: 267-273.

Whiting, R. C. y Buchanan, R. L. (1993). A classification of models for predictive microbiology. *Food Microbiology*, 10: 175-177.

Wrigley, D. M. y Llorca, N. G. (1992). Decrease of *Salmonella typhimurium* in skim milk and egg by heat and ultrasonic wave treatment. *Journal of Food Protection*, 55: 678-680.

Wu, H. Hulbert, G.J. y Mount, J.R. (2000). Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1: 211-218

Yang P, Zhao B, Basir OA, y Mittal GS. (2007). Measures of similarity and detection of miniature foreign bodies in packaged foods. *Food Research International*, 40 (6): 742-747.

Zenker M, Heinz V y Knorr D. (2003). Application of ultrasound-assisted thermal processing for preservation and quality retention of liquid foods. *Journal of Food Protection*, 66 (9): 1642-1649.

Zhao BS, Basir OA y Mittal GS. (2003). Detection of metal, glass and plastic pieces in bottled beverages using ultrasound. *Food Research International*, 36 (5): 513-521.

Zhao B, Basir OA y Mittal GS. (2003). A self-aligning ultrasound sensor for detecting foreign bodies in glass containers. *Ultrasonics*, 41 (3): 217-222.

Zhao B, Basir OA y Mittal GS. (2003). Correlation analysis between beverage apparent viscosity and ultrasound velocity. *International Journal of Food Properties*, 6 (3): 443-448.

Zhao B, Basir OA y Mittal GS. (2007). Hybrid of multi-signal processing methods for detection of small objects in containers filled with beverages using ultrasound. *Lwt-Food Science and Technology*, 40 (4): 655-660.

Zhao B, Basir OA, yMittal GS. (2009). Detection of occluded small objects in glass bottles filled with beverages via ultrasound center frequency tracing. *Lwt-Food Science and Technology*, 42 (1): 162-167.

Zhao B, Jiang Y, Basir OA y Mittal GS. (2004). Foreign body detection in foods using the ultrasound pulse/echo method. *Journal of Food Quality*, 27 (4): 274-288.

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M. y Van 't Riet, K. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 1875-1881.

Zuo, J.Y., Kn9oerzer, K., Mawson, R., Kentish, S. y Ashokkumar, M. (2009). The pasting properties of sonicated waxy rice starch suspensions. *Ultrasonic sonochemistry*, 16: 462-468.

# ANEXOS

## ANEXO 1. FICHA TÉCNICA DEL PBS (PHOSPHATE BUFFERED SALINE)

### PHOSPHATE BUFFERED SALINE TABLET, TRUMEASURE CHEMICAL

#### Composición/Información sobre los Ingredientes

Ingrediente Nombre	N° CAS	Porcentaje	SARA 313
PHOSPHATE BUFFER	None		No
POTASSIUM CHLORIDE	7447-40-7	0.02	No
SODIUM CHLORIDE	7647-14-5	0.8	No

**EXPOSICIÓN ORAL:** En caso de ingestión, lavar la boca con agua si el sujeto está consciente. Llamar al médico.

**INHALACIÓN:** En caso de inhalación, sacar al sujeto al aire libre. Si tiene dificultad para respirar, llamar al médico.

**EXPOSICIÓN DÉRMICA:** En caso de contacto, lavar inmediatamente la piel con jabón y abundante cantidad de agua.

**EXPOSICIÓN OCULAR:** En caso de contacto con los ojos, enjuagar con abundante cantidad de agua durante 15 minutos por lo menos. Separar los párpados con los dedos para asegurar el buen enjuague de los ojos. Llamar al médico.

**PROCEDIMIENTO(S) DE PRECAUCIÓN PERSONAL:** Deben adoptarse las debidas precauciones para minimizar el contacto con la piel o los ojos y evitar la inhalación del polvo.

**MÉTODOS DE LIMPIEZA:** Barrer, meter en una bolsa y conservar para su posterior eliminación. Evitar el levantamiento de polvo. Ventilar el local y lavar el lugar donde se haya derramado el producto una vez retirado por completo.

#### INSTRUCCIONES DE MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

**MANIPULACIÓN:** Exposición del Usuario: Evitar la inhalación. Evitar el contacto con los ojos, la piel o la ropa. Evitar la exposición prolongada o repetida.

**ALMACENAMIENTO ADECUADO:** Mantener herméticamente cerrado.

**MEDIDAS GENERALES DE HIGIENE:** Lavarse cuidadosamente después de la manipulación

### **PROPIEDADES FÍSICO/QUÍMICAS**

**Aspecto Estado Físico:** Sólido

Propiedad Valor A Temperatura o Presión

pH 7.2 - 7.6 25 °C

### **ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD**

#### **ESTABILIDAD**

**Estable:** Estable.

**Materiales a Evitar:** Agentes extremadamente oxidantes, Ácidos fuertes.

### **SIGNOS Y SÍNTOMAS DE LA EXPOSICIÓN**

Según nuestras informaciones, creemos que no se han investigado adecuadamente las propiedades químicas, físicas y toxicológicas.

### **MÉTODO ADECUADO PARA EL DESECHO DE LA SUSTANCIA O PREPARADO**

Para la eliminación de este producto, dirigirse a un servicio profesional autorizado. Disolver o mezclar el producto con un solvente combustible y quemarlo en un incinerador apto para productos químicos provisto de postquemador y lavador. Observar todos los reglamentos estatales y locales sobre la protección del medio ambiente.

### **GARANTÍA**

La información indicada arriba se considera correcta pero no pretende ser exhaustiva y deberá utilizarse únicamente como orientación. Sigma-Aldrich Inc., no responderá por ningún daño resultante de la manipulación o contacto con el producto indicado arriba.

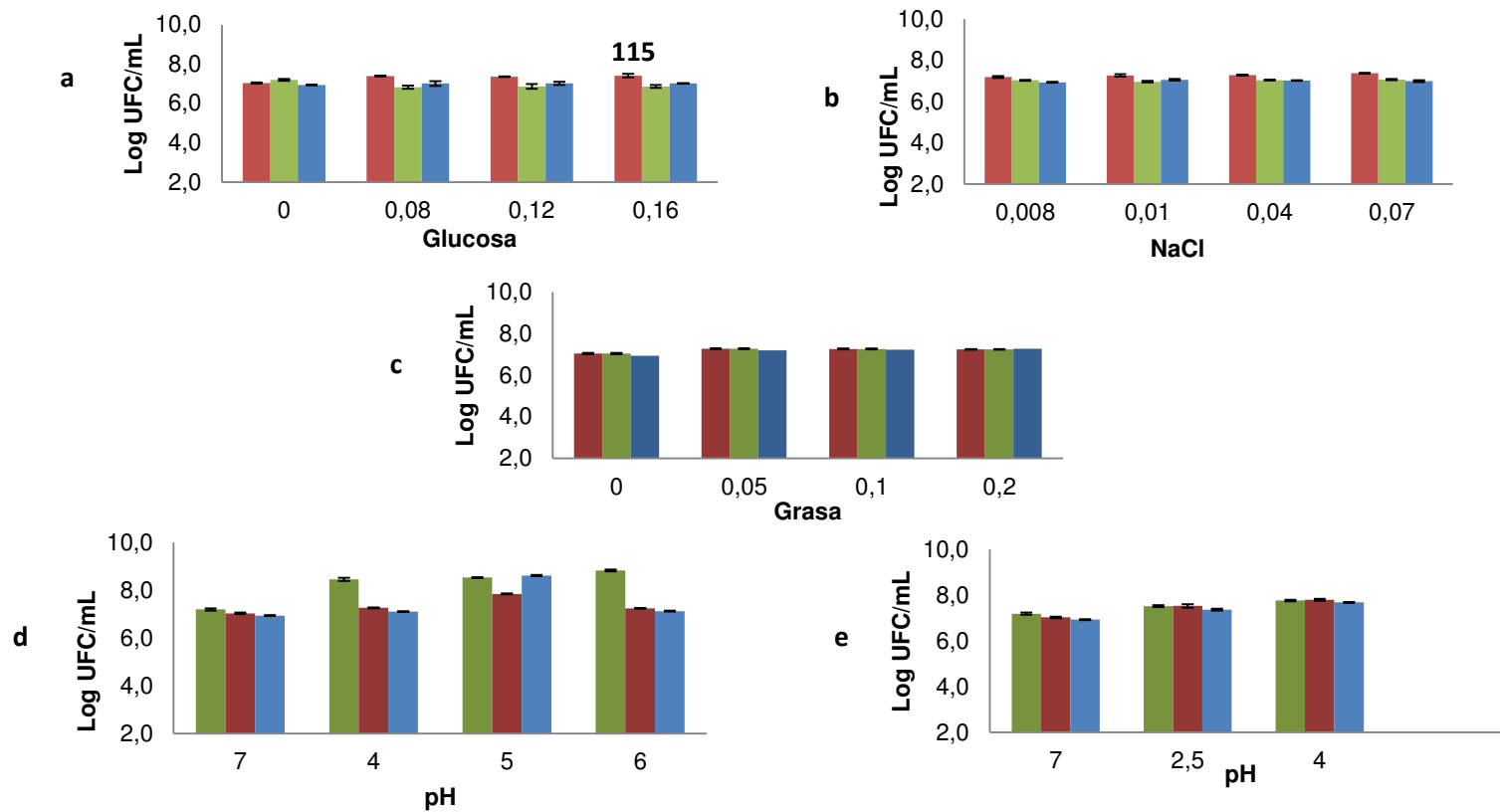
## **ANEXO 2. ENSAYO DE VIABILIDAD DE LOS MICROORGANISMOS BAJO DIFERENTES FACTORES INTRÍNSECOS**

Para estudiar el efecto de los factores intrínsecos sobre la cinética de inactivación microbiana por ultrasonido, inicialmente se evaluó la viabilidad de los tres microorganismos (*L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. cerevisiae*) sobre los diferentes tipos de sustrato, para verificar que dichos factores no tuvieran un efecto inhibitorio directo antes de los tratamientos con ultrasonido. Para esto, poblaciones microbianas de aproximadamente  $10^7$  UFC/ml se inocularon sobre las diferentes soluciones preparadas en PBS, y posteriormente se incubaron durante 24 horas a 37,0°C (bacterias) y durante 48 horas a 25°C (levadura). Recuentos en placa sobre agar tripticasa de soya (TSA), sirvieron para determinar la viabilidad de las cepas. En total se realizaron tres ensayos diferentes cada uno con tres réplicas. Los datos experimentales se analizaron mediante ANOVA ( $P < 0.05$ ) con el programa estadístico SPSS (versión 13.0, SSPS Inc, Chicago).

Los resultados obtenidos a partir de este ensayo demostraron que no existen diferencias significativas ( $\alpha = 0,05$ ) entre los factores intrínsecos evaluados y la viabilidad de las cepas (Figura 19). Se determinó que los tres microorganismos en estudio no se afectaron con las cuatro concentraciones de glucosa analizadas (0,0%, 8,0%, 12,0% y 16,0%) y se mantuvieron viables después de 24 horas de incubación. Los ensayos realizados con NaCl, proteína, grasa y pH mostraron los mismos resultados descritos anteriormente.

Se concluyó que no existen diferencias significativas entre la concentración celular de las cepas (UFC/mL) obtenidas en los diferentes niveles de cada factor y el control utilizado en la experimentación (solución tampón). Esto demuestra que los diferentes niveles seleccionados para cada factor intrínseco (glucosa, NaCl, proteína, grasa, pH) pueden evaluarse con confiabilidad durante los tratamientos con ultrasonido. De esta manera, los resultados de inactivación que se obtengan con los tratamientos ultrasónicos, no serán debidos al efecto inhibitorio del medio.

**ANEXO 2. ENSAYO DE VIABILIDAD DE LOS MICROORGANISMOS BAJO DIFERENTES FACTORES INTRÍNSECOS**



**Figura 19.** Evaluación de la viabilidad microbiana frente a diferentes factores intrínsecos. En rojo: *L. monocytogenes*. En verde: *E. coli*. En azul: *S. cerevisiae*. Se evaluó la viabilidad de las tres cepas frente a diferentes niveles de glucosa (a), NaCl (b), grasa(c), pH ajustado con ácido clorhídrico (d) y pH ajustado con ácido cítrico (e) .



**ANEXO 3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS PARA LA SELECCIÓN DE CONDICIONES DE TRATAMIENTO ULTRASÓNICO**

<i>(Barbosa-Cánovas et al., 2008)</i>	Microtip: 22mm Potencia: 400 w Frecuencia: 24KHz Amplitud: 120 µm
<i>(Barbosa-Canovas et al., 2009)</i>	Microtip de 22mm Frecuencia: 24KHz Potencia: 400 w Amplitud y potencia: 40 µm y 0.86 W/cm <sup>2</sup> Amplitud y potencia: 72 µm y 1.71 W/cm <sup>2</sup> Amplitud y potencia: 108 µm y 2.57 W/cm <sup>2</sup> Amplitud y potencia: 120 µm y 2.85 W/cm <sup>2</sup> Tiempo: 30 minutos
<i>(D'Amico et al., 2006)</i>	Frecuencia: 20 KHz 100% de potencia Potencia acústica: 150 W Intensidad Acústica: 118 W/cm <sup>2</sup> Temperatura 20°C Tiempo: 18 min
<i>(Guerrero et al., 2001)</i>	Microtip: 13mm Frecuencia: 20KHz Amplitud: 71.4(60%), 83.3(70%), 95.2 (80%), 107.10 (90) µm Temperatura: 55°C
<i>(Lee et al., 2009)</i>	Microtip: 13mm Frecuencia: 20KHz 4 minutos de tratamiento Temperatura 61°C Amplitud: 124 µm
<i>(Noci et al., 2009)</i>	Microtip:22mm Frecuencia: 24KHz Amplitud: 117 µm Potencia Acústica: 85 W/cm <sup>2</sup> Potencia: 400Wmuestras de 21mL Tiempo: 2 minutos

<i>(Patil et al., 2009)</i>	<p>Microtip: 13mm  Frecuencia: 20KHz  Amplitud: 0.4, 7.5, 37.5 <math>\mu</math>m  5s on 5s off  Tiempo: 15 minutos</p>
<i>(Tiwari et al., 2008)</i>	<p>Microtip: 19mm  Frecuencia: 20KHz  Amplitudes: 40,50,70,90 y 100%  Tiempos: 2,4,6,8 y 10 minutos  5 s on y 5 s off</p>
<i>(Tiwari et al., 2010)</i>	<p>Microtip: 19mm  Frecuencia: 20KHz  Amplitudes: 24.4-61 <math>\mu</math>m  Tiempos: 2-10 minutos  5 s on y 5 s off  Flujo de 0.5L/min</p>
<i>(Villamiel et al., 2000)</i>	<p>Microtip: 12.7mm  Frecuencia: 20KHz  Amplitudes: 120 <math>\mu</math>m  Tiempos: 2-10 minutos  5 s on y 5 s off  Flujo de 0.5L/min</p>
<i>(Villamiel et al., 2000)</i>	<p>Microtip: 12.7mm  Frecuencia: 20KHz  Amplitudes: 120 <math>\mu</math>m  Potencia: 150W  19mL Leche</p>
<i>(Gómez-López et al., 2010)</i>	<p>Microtip: 13mm  Frecuencia: 20KHz  Potencia: 500W  Amplitudes: 59.5 <math>\mu</math>m (50%), 71.4 <math>\mu</math>m (60%),  89.25<math>\mu</math>m (75%)  Tiempos: 2,4,6,8 y 10 minutos  80mL en Beaker de 100mL</p>
<i>(Valdramidis et al., 2010)</i>	<p>Microtip: 19mm  Frecuencia: 20KHz  Potencia: 500W  Amplitudes: 24.4 <math>\mu</math>m , 42.7 <math>\mu</math>m , 61<math>\mu</math>m  Tiempos: 2,4,6,8 y 10 minutos  5 s on y 5 s off  Jugos 80mL en Beaker de 100mL</p>

## ANEXO 4. SOCIALIZACIÓN Y PUBLICACIÓN DE ALGUNOS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL PROYECTO.



Lima, 13 de Junio del 2011

Estimados Sres:

Angélica Mejía, Catalina Aguilar y Bernadette Klotz

Presente.-

En relación a su trabajo de investigación presentado al VIII Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, el Comité Científico Internacional ha determinado lo siguiente:

**Título** : Efecto de propiedades intrínsecas del medio sobre la cinética de inactivación microbiana por ultrasonido de alta intensidad.  
**Código** : NT-019  
**Sesión** : Nuevas tecnologías en Ingeniería de Alimentos  
**Calificación** : Aceptado  
**Modalidad** : Oral

Aprovechamos la oportunidad para recordarle que la fecha límite para la entrega del artículo completo es el 15 de Agosto del 2011, el cual deberá ser enviado en archivo digital formato MS Word con el nombre del código respectivo, y de acuerdo a las normas que se encuentren en la página web del CIBIA 8.

Muy atentamente,

Fernando Vargas, Ph.D.

Coordinador Comisión Científica

CIBIA 8

VIII CONGRESO  
IBEROAMERICANO  
DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS

LIMA / 2011  
Del 23 al 26 de Octubre



Confieren el presente CERTIFICADO a:

*Angélica Mejía, Catalina Aguilar, Bernadette Klotz*

Por haber participado con la Presentación como poster del  
TRABAJO DE INVESTIGACION

**EFECTO DE PROPIEDADES INTRÍNECAS DEL MEDIO SOBRE LA  
CINÉTICA DE INACTIVACIÓN MICROBIANA POR ULTRASONIDO DE ALTA  
INTENSIDAD**

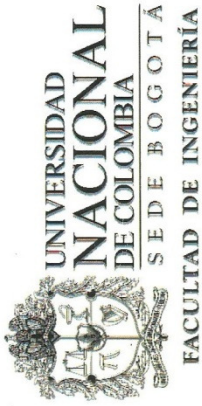
en el VIII CONGRESO IBEROAMERICANO DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS  
realizado en la Ciudad de Lima, del 23 al 26 de octubre del 2011.

Lima, octubre del 2011

Carmen Vélazquez Sánchez  
CIBIA 8  
Presidente

Fernando Vargas Delgado  
Comisión Científica CIBIA 8  
Presidente

XXXI  
**ENELIO**  
UN Bogotá 2011



La Universidad Nacional de Colombia certifica que:

**Ing. Angélica Mejía**

Participó como **CONFERENCISTA** en el  
**XXI ENCUENTRO NACIONAL DE ESTUDIANTES DE INGENIERÍA QUÍMICA Y DE PROCESOS**  
realizado en Bogotá, del 20 al 25 de junio de 2011

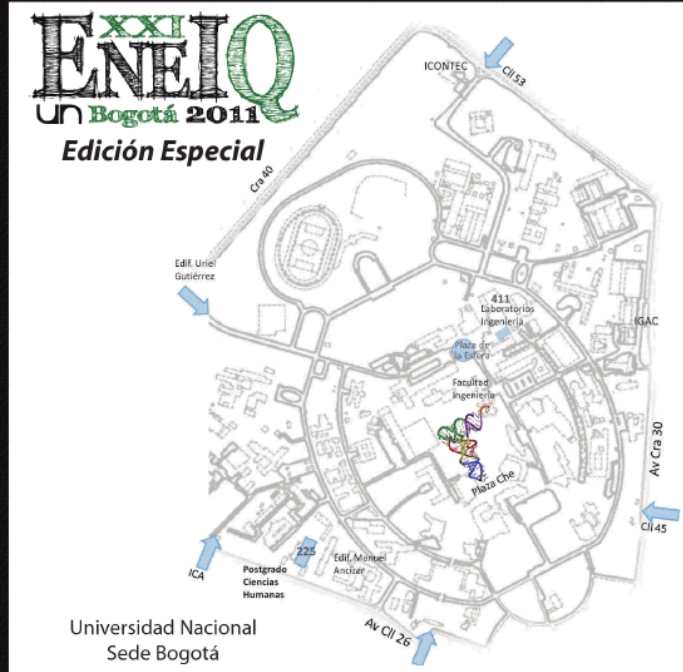
*Curofi*

Decano Facultad de Ingeniería  
Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá

*Alvarado*

Secretario Académico-Facultad de Ingeniería  
Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá

# ReCiTeIA



Revista ReCiTeIA  
*Revisión de la Ciencia, Tecnología  
e Ingeniería de los Alimentos*  
Volumen 11 número 1a, 2011  
<http://revistareciteia.es.tl>  
Colombia



# REVISTA RECITEIA

*Revisiones de la Ciencia, Tecnología e Ingeniería de los Alimentos*

© ReCiTeIA

Publicación científica virtual

<http://revistareciteia.es.tl>

ISSN 2027-6850

Año 11, Volumen 11, Número 1a, Junio de 2011

Las opiniones expresadas en este documento no son necesariamente opiniones de la Revista ReCiTeIA, de sus órganos o de sus funcionarios. ReCiTeIA no se hace responsable de materiales con derecho de autor tomados sin autorización por los propios autores.

Los artículos de esta revista pueden reproducirse citando la fuente.

Comunicaciones

e-mail: [reciteia@gmail.com](mailto:reciteia@gmail.com), [reciteia@live.com](mailto:reciteia@live.com)

Colombia

**EXPERIENCIAS EN LA APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS CON ULTRASONIDO DE ALTA INTENSIDAD PARA REDUCCIÓN DE CARGA MICROBIANA EN ALIMENTOS**

Catalina Aguilar, Mauricio Combariza, Angélica Mejía, Juan M. Camila, María X. Maldonado, Lilibiana Parada, Juan D. Ramírez, Oscar Sánchez, Ana M. Fernández, Javier Meló, Gerardo González, Fredy Carvajal y Bernadette Klotz<sup>1</sup>

Facultad de Ingeniería, Universidad de La Sabana, Chía, Colombia.

<sup>1</sup>[bernadette.klotz@unisabana.edu.co](mailto:bernadette.klotz@unisabana.edu.co)

**RESUMEN**

Actualmente el reto para la industria de alimentos es el desarrollo de productos que además de inocuos, conserven sus características naturales, con todo su valor nutricional, que sean de fácil preparación y de larga vida útil. Dichas demandas han generado la necesidad de implementar procesos industriales que involucren las llamadas nuevas tecnologías de procesamiento, entre las cuales, el ultrasonido de alta intensidad (UAI), se perfila como un proceso promisorio para reducir la carga microbiana y extender la vida útil de alimentos perecederos sin afectar significativamente sus propiedades fisicoquímicas y nutricionales, a diferencia de los tratamientos térmicos convencionales que sí producen estos cambios indeseados en los alimentos. El grupo de investigación en Procesos Agroindustriales de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de La Sabana, lleva más de seis años estudiando esta tecnología para la conservación de diferentes tipos de alimentos. Dentro de los resultados más relevantes obtenidos con los tratamientos de UAI se encuentran: (1) reducciones de más de 1,0 ciclo logarítmico en la carga de coliformes totales en cárnicos crudos; (2) reducción de más de 4,0 ciclos logarítmicos en la concentración de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* en leche entera, descremada y semidescremada; (3) disminución en la concentración de levaduras en medios estándar (buffer de fosfato) en más de 1,0 ciclo log; (4) ausencia de daño subletal en tratamientos con baño y sonda de ultrasonido a 10 minutos de tratamiento y frecuencias de 25kHz y 35kHz. Durante este tiempo se ha logrado la publicación de artículos científicos en revistas indexadas, el desarrollo de numerosas tesis de pregrado y maestría, la presentación de resultados en congresos internacionales, premios en ciencia e innovación, vinculación de empresas de alimentos a los procesos investigativos y el registro de una patente de invención en asocio con el sector privado.

**Palabras clave:** Conservación de alimentos, nuevas tecnologías de procesamiento de alimentos, ultrasonido de alta intensidad.