



UNIVERSITAT POLITECNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH

ESCOLA SUPERIOR D'AGRICULTURA DE BARCELONA

GRADO EN INGENIERIA ALIMENTARIA

# EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS EN VEGETALES

---

## *Impacto sobre la microbiota, textura y color de la Zanahoria (*Daucus carota*)*

Trabajo final de Grado presentado por:

**Susana Hurtado Díaz**

Bajo la dirección de:

**Dra. M. Isabel Achaerandio**

**Dra. Montserrat Pujolà**

*Castelldefels, noviembre de 2013*



## AGRADECIMIENTOS

Durante la realización de este proyecto ha habido buenos y malos momentos. Quiero mostrar mi más sincera gratitud a todas esas personas que han estado a mi lado y han depositado su confianza en mí.

Aunque han sido muchas las personas que con su “granito de arena”, directa o indirectamente han formado parte de este trabajo, compañeros de trabajo y estudios, profesores, familiares y amigos, me gustaría mentar algunas sin las cuales este trabajo no hubiera sido posible.

Agradecer a las directoras de este trabajo, Isabel Achaerandio y Montserrat Pujolà por siempre tener la puerta abierta a mis dudas, por sus consejos y su confianza.

A mis profesores de estadística, en especial a Mónica Blanco, por haberme dado las herramientas e iniciarme en el complejo mundo del análisis de datos.

A Sheila Benítez por confiarme el dataloger y resolver mis dudas en todo momento.

No me gustaría olvidar a Silvia, Juan Pablo y Meritxell con los que he compartido muy buenos momentos en esta etapa universitaria.

Por último querría agradecer a mi familia por todo el apoyo que me han dado, en especial a Fran y a sus padres. Ellos saben lo que he trabajado para llevar a buen puerto este trabajo. Por su cariño y comprensión, sin ellos la carrera y en definitiva este proyecto personal no hubiese sido posible. Gracias por todo.

Susana Hurtado Díaz

**EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS EN VEGETALES:** *Impacto sobre la microbiota, textura y color de la Zanahoria (*Daucus carota*)***Autora:** Susana Hurtado Díaz**Directores:** Dra. M. Isabel Achaerandio. Dra. Montserrat Pujolà.

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona.

Universitat Politècnica de Catalunya. (ESAB, UPC)

**Palabras clave:** zanahoria, ultrasonidos, reducción microbiológica, cavitación.

La industria alimentaria tiene como reto constante la innovación y la optimización de los procesos. En el caso de los vegetales la descontaminación mediante desinfectantes químicos es la tendencia. El objetivo del presente proyecto es evaluar la eficacia de los ultrasonidos de baja frecuencia como método de reducción microbiana en vegetales y comprobar su efecto en el color y la firmeza. Para ello se ha sometido a ultrasonidos zanahorias frescas cortadas (*Daucus carota*), durante 10-20 minutos y a una frecuencia de 25 y 40 kHz. Para evaluar la efectividad de los tratamientos, se realizó recuentos de microorganismos aerobios mesófilos, así como de hongos y levaduras. Se calculó su reducción y se comparó con muestras lavadas en agua de red. De los datos obtenidos se realizó el tratamiento estadístico mediante ANOVA de uno y dos factores (GLM), el ajuste factorial  $2^k$  (tiempo vs. frecuencia de ultrasonidos) y la comparación mediante test de Tukey. Los resultados obtenidos indican que durante 10 y 20 minutos a frecuencias de 25 y 40 kHz los ultrasonidos tienen un impacto significativo en la reducción microbiana (1 Log UFC/g). Durante su aplicación se incrementó la temperatura de la zanahoria por el efecto de la cavitación pero no se encontraron diferencias significativas de color y firmeza respecto a la materia prima. Por los resultados obtenidos, la combinación de ultrasonidos con otros procesos no térmicos parece un enfoque atractivo para mejorar la inactivación microbiana en la industria alimentaria ya que las ondas sonoras son seguras, no tóxicas y respetuosas con el medio ambiente.

**EFFECTE DE L'APLICACIÓ D'ULTRASONS EN VEGETALS:** *Impacte sobre la microbiota, textura i color de la pastanaga (Daucus carota)***Autora:** Susana Hurtado Díaz**Directors:** Dra. M. Isabel Achaerandio. Dra. Montserrat Pujolà.

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona.

Universitat Politècnica de Catalunya. (ESAB, UPC)

**Paraules clau:** pastanaga, ultrasons, reducció microbiològica, cavitació.

La indústria alimentària té com a repte constant la innovació i l'optimització dels processos. En el cas dels vegetals la descontaminació mitjançant desinfectants químics és la tendència. L'objectiu del present projecte és avaluar l'eficàcia dels ultrasons de baixa freqüència com a mètode de reducció microbiana en vegetals i comprovar el seu efecte en el color i la fermesa. Per a això s'ha sotmès a ultrasons pastanagues fresques tallades (*Daucus carota*), durant 10-20 minuts a una freqüència de 25 i 40 kHz. Per avaluar l'efectivitat dels tractaments, es va realitzar recomptes de microorganismes aerobis mesòfils, així com de fongs i llevats. Es va calcular la seva reducció i es va comparar amb mostres rentades en aigua de xarxa. De les dades obtingudes es va realitzar el tractament estadístic mitjançant ANOVA d'un i dos factors (GLM), l'ajust factorial  $2^k$  (temps vs. freqüència d'ultrasons) i la comparació mitjançant test de Tukey. Els resultats obtinguts indiquen que durant 10 i 20 minuts a freqüències de 25 i 40 kHz els ultrasons tenen un impacte significatiu en la reducció microbiana (1 Log UFC/g). Durant la seva aplicació es va incrementar la temperatura de la pastanaga per l'efecte de la cavitació però no es van trobar diferències significatives de color i fermesa respecte a la matèria primera. Per els resultats obtinguts la combinació d'ultrasons amb altres processos no tèrmics sembla un enfocament atractiu per millorar la inactivació microbiana en la indústria alimentària doncs les ones sonores són segures, no tòxiques i respectuoses amb el medi ambient.

**EFFECT OF ULTRASOUND APPLICATION IN VEGETABLES:** *Impact on the microbiology, texture and colour of the carrot (*Daucus carota*)***Author:** Susana Hurtado Díaz**Directors:** Dra. M. Isabel Achaerandio. Dra. Montserrat Pujolà.

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona.

Universitat Politècnica de Catalunya. (ESAB, UPC)

**Keywords:** carrot, ultrasound, microbial reduction, cavitation.

The food industry has the challenge of the constant innovation and optimization process. In vegetable decontamination by chemical disinfectants is the trend. The aim of this project is evaluate the efficacy of low-frequency ultrasound as a method for reducing microbial in vegetables and evaluate the effect on their colour and firmness. We have worked with raw carrots (*Daucus carota*) subjected to ultrasonic treatment for 10-20 minutes and the frequency used was 25 and 40 kHz. The effectiveness of ultrasound was evaluated by the analysis of aerobic mesophilic and yeasts and molds counts. The microbial reduction was calculated and compared with samples washed in tap water. It was also analyzed the colour and instrumental texture of carrots to assess the impact of treatment. The statistical data process was performed using ANOVA one and two ways (GLM),  $2^k$  factorial adjustment (time vs. frequency ultrasound) and compared by Tukey test. The results show that the application of ultrasound for 10-20 minutes at frequencies 25 and 40 kHz has a significant impact in the reduction of microbial counts (1 Log of CFU/g). The carrot temperature was increased by the cavitation effect but it wasn't found any significant differences between the colour and texture of the raw and sonicated samples. From the results, the ultrasonic combination with other non-thermal processes seems an attractive approach to improve the microbial inactivation in food industry as a significant advantage over other techniques because sound waves are safe, non-toxic and environmentally friendly.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
1.1. PRE-TRATAMIENTOS EN VEGETALES: EL ESCALDADO .....	9
1.2. LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA EN LOS ALIMENTOS.....	10
1.3. TENDENCIAS Y ALTERNATIVAS AL TRATAMIENTO TÉRMICO .....	11
1.4. LOS ULTRASONIDOS (US).....	14
1.5. EFECTOS Y APLICACIONES DE LOS ULTRASONIDOS EN LOS ALIMENTOS .....	15
1.6. INACTIVACIÓN MICROBIANA MEDIANTE ULTRASONIDOS .....	16
1.7. MECANISMO DE INACTIVACIÓN MICROBIANA .....	17
1.8. LA ZANAHORIA.....	20
1.9. PARÁMETROS DE CALIDAD: COLOR Y TEXTURA EN VEGETALES .....	22
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>2. MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>25</b>
2.1. MATERIA PRIMA .....	25
2.2. EQUIPOS DE ULTRASONIDOS DE BAJA FRECUENCIA UTILIZADOS.....	25
2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	26
2.4. PARÁMETROS ANALIZADOS .....	28
2.4.1. COLOR .....	28
2.4.2. TEXTURA INSTRUMENTAL: FIRMEZA .....	29
2.4.3. RECUENTO DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS (ISO 4833).....	30
2.4.4. RECUENTO DE HONGOS Y LEVADURAS (ISO 7954).....	31
2.4.5. CONTROL DE LA TEMPERATURA.....	31
2.5. ANÁLISIS DE DATOS .....	32
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>33</b>
3.1. BLOQUE EXPERIMENTAL 1: PRUEBAS PRELIMINARES .....	33
3.1.1. INCREMENTO DE LA TEMPERATURA DURANTE LA APLICACIÓN DE (US) .....	34
3.2. BLOQUE EXPERIMENTAL 2: EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS .....	35
3.2.1. EVOLUCIÓN DE LA TEMPERATURA DURANTE LA APLICACIÓN DE (US) .....	35
3.2.2. EFECTO DEL TIEMPO DE APLICACIÓN Y LA FRECUENCIA EN LA REDUCCIÓN MICROBIOLÓGICA .....	36
3.2.3. APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS DE 40 KHz: EFECTO DEL TIEMPO .....	37
3.2.4. APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS DE 25 KHz: EFECTO DEL TIEMPO .....	38
3.2.5. EFECTO DEL TIEMPO, TRATAMIENTO Y FRECUENCIA (US) .....	40
3.2.6. EFECTO DEL TIEMPO DE APLICACIÓN Y LA FRECUENCIA (US) EN EL COLOR Y FIRMEZA .....	46
<b>4. CONCLUSIONES</b> .....	<b>49</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>50</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Principales microorganismos presentes en vegetales.....	10
Tabla 2. Tecnologías innovadoras en la Industria Alimentaria.....	12
Tabla 3. Ejemplos de extracción asistida por ultrasonidos en algunos alimentos.....	16
Tabla 4. Aplicación de ultrasonidos y reducciones microbianas obtenidas en algunos vegetales....	18
Tabla 5. Composición nutricional de la zanahoria fresca y congelada.....	21
Tabla 6. Efecto de los ultrasonidos en el color y diferentes componentes de los alimentos.....	22
Tabla 7. Resultados preliminares sobre la reducción microbiana.....	33
Tabla 8. Efecto del tiempo y tratamiento a 40 kHz en la población microbiana.....	37
Tabla 9. Efecto del tiempo y tratamiento a 25 kHz en la población microbiana.....	38
Tabla 10. Modelo Lineal General para la reducción de microorganismos vs tratamiento y tiempo ...	40
Tabla 11. Ajuste factorial <b>2k</b> , de la reducción microbiana vs tiempo y frecuencia.....	41
Tabla 12. Tratamientos aplicados en zanahorias y su reducción microbiológica.....	44
Tabla 13. Análisis de la varianza (GLM): efecto del tiempo y tratamiento en el color y firmeza.....	46
Tabla 14. Comparación de las componentes del color de la zanahoria por tratamiento.....	47
Figura 1. Cavitación ultrasónica. Adaptado de.....	14
Figura 2. Aplicación de los US en alimentos y efectos bioquímicos generados por la cavitación.....	15
Figura 3. Mecanismo de inactivación microbiana mediante ultrasonidos.....	19
Figura 4. Diseño experimental bloque 1: pruebas preliminares.....	26
Figura 5. Diseño experimental bloque 2.....	27
Figura 6. Representación descriptiva de las coordenadas del espacio Cielab.....	28
Figura 7. Recta de regresión de la temperatura a 40 y 25 kHz.....	34
Figura 8. Recta de regresión de la temperatura corazón a 40 y 25 kHz.....	36
Figura 9. Reducción microbiológica a 40 kHz.....	37
Figura 10. Reducción microbiológica a 25 kHz.....	39
Figura 11. Gráfica de superficie de la reducción de aerobios mesófilos.....	42
Figura 12. Gráfica de contorno de la reducción de hongos y levaduras.....	43
Figura 13. Comparación de la firmeza según el tratamiento.....	48
Imagen 1. Equipos de (US) utilizados. Sonowat 25 kHz, Branson 40 kHz.....	25
Imagen 2. Dataloger.....	31



## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha aumentado el interés y conocimiento del consumidor hacia los alimentos funcionales y sus propiedades beneficiosas. Más allá de suplir la función básica del suministro de nutrientes y energía para el organismo, aportan propiedades beneficiosas para la salud como la prevención de enfermedades. Para satisfacer esta necesidad del consumidor es indispensable el desarrollo y la aplicación de métodos de procesado y conservación de alimentos, que preserven la calidad nutricional, sensorial y mantengan o aumenten la bioactividad y biodisponibilidad de los componentes beneficiosos presentes en los alimentos.

La aplicación de calor es el método más común para el procesado de alimentos en la industria ya que se consigue la inactivación de enzimas que pueden producir alteraciones en el producto, así como una gran capacidad de destrucción microbiana. El gran inconveniente de los tratamientos térmicos radica en que al utilizarse temperaturas elevadas, dan lugar a alteraciones en el alimento produciéndose cambios físicos y químicos que deterioran las propiedades organolépticas, viéndose afectado el contenido de componentes funcionales por el efecto del calor.

La industria alimentaria tiene como reto constante la innovación, el desarrollo, la optimización y el uso de nuevas tecnologías como son altas presiones, pulsos eléctricos, campos magnéticos o ultrasonidos entre otros.

Estas tecnologías alternativas ofrecen la posibilidad de obtener alimentos de alta calidad con características similares al producto fresco, sin comprometer la seguridad alimentaria y en algunos casos mejorando las funcionalidades de estos (Soria y Villamiel 2010).

## 1.1. Pre-tratamientos en vegetales: El escaldado

El escaldado o blanqueo es uno de los pre-tratamientos más comunes en vegetales. Consiste en un calentamiento de corta duración, que tiene como objetivo inactivar las enzimas de modo que éstas detengan su actividad metabólica y cese la degradación del alimento, indirectamente reduce la carga microbiana superficial.

Es típico el escaldado de productos vegetales antes de su congelación ya que de esta forma se impide el desarrollo de olores y sabores extraños durante el almacenamiento del producto congelado, prolongando la vida útil del alimento.

Puede llevarse a cabo en condiciones de alta o baja temperatura en intervalos de 60°C a 100°C, siendo frecuentes procesos a temperaturas de 80°C durante unos minutos. Sin embargo, de manera similar a otros procesos térmicos, el escaldado puede afectar a la composición nutricional y a componentes bioactivos presentes en el alimento, incluyendo entre otros el contenido de vitamina C.

La cantidad de calor que el alimento recibe durante el escaldado altera inevitablemente su valor nutritivo y sus características organolépticas. Por lo general, la combinación de tiempo y temperatura utilizada se establece como solución de compromiso para reducir al mínimo las pérdidas de compuestos responsables del flavor y nutricionales, que asegure la adecuada inactivación de enzimas, sin reblandecer excesivamente el producto.

También tiene influencia sobre el color ya que la temperatura y el tiempo influyen sobre los pigmentos como los carotenoides en el caso de las zanahorias.

La aplicación de métodos alternativos al escaldado y la optimización de las condiciones de lavado y secado, ofrecen la posibilidad de obtener productos vegetales procesados con mejor sabor, mayor valor nutritivo y mayor concentración en componentes beneficiosos.

La aplicación de ultrasonidos ha surgido como pre-tratamiento alternativo al escaldado y al lavado convencional, con resultados positivos. Según el estudio de contenido en vitamina C realizado por Gamboa-Santos *et al.* 2013, en zanahorias un tratamiento previo de ultrasonidos (10 minutos) da como resultado una mayor retención de carotenoides y poliacetilenos que zanahorias hervidas a 80°C durante 3 min. Otros autores como Rawson *et al.* demuestran en 2011 que el pre-tratamiento con ultrasonidos es una alternativa potencial al blanqueo convencional en vegetales.

## 1.2. La calidad microbiológica en los alimentos

Los microorganismos de importancia alimentaria en vegetales son aquellos que están presentes de forma natural en el alimento o son aportados por contaminación, siendo bacterias, mohos y levaduras los microorganismos implicados (Tabla 1).

Tabla 1. Principales microorganismos presentes en vegetales.

	Microorganismo	Alimento	Fuente
Bacterias	<i>Clostridium botulinum</i>	Col, pimiento, ajo, patata y zanahoria	(Ramos <i>et al.</i> 2013)
	<i>Escherichia coli</i>	Brotes de alfalfa, col, apio, cilantro, berro, lechuga, col, fresas y melones	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Brotes de soja, repollo, achicoria, melón, berenjena, lechuga, patatas, rábanos y lechuga	
	<i>Salmonella spp.</i>	Brotes de alfalfa, alcachofas, remolacha, apio, repollo, melón, coliflor, berenjena, escarola, hinojo, cebolla, lechuga, berros, espinacas y tomates	
	<i>Shigella spp.</i>	Apio, lechuga, cebolla y perejil	
	<i>Staphylococcus spp.</i>	Lechuga, perejil, rábano y brotes de semillas	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Zanahorias, pepinos, lechuga y tomates	(Berrang <i>et al.</i> 1989a)
	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	Espárragos, brócoli, coliflor y lechuga	
	<i>Pseudomonas spp.</i>	Col, zanahoria, maíz y tomate	
	<i>Erwinia spp.</i>	Zanahorias y pepinos	(Buick y Damoglou 1987)
Hongos	<i>Aspergillus</i>	Pimientos, maíz, judías verdes y guisantes	(Webb y Mundt 1978)
	<i>Penicillium</i>	Col, maíz y tomates	(Geeson 1979)
	<i>Mucor</i>	Pepinos, calabaza y judías verdes	(Senter <i>et al.</i> 1984)
	<i>Alternaria</i>	Col, pepinos, calabaza, guisantes y tomates	(Golden <i>et al.</i> 1987)
	<i>Cladosporium</i>	Col, guisantes y tomates	(Tournas 2005)
Levaduras	<i>Saccharomyces spp.</i>	Lechuga, col, zanahorias, apio, brócoli, coliflor, pepinos, pimientos, espinacas, tomates, cebolla y rábanos	
	<i>Hanseniaspora</i>		
	<i>Pichia</i>		
	<i>Kloeckera</i>		
	<i>Candida</i>		
	<i>Rhodotorula</i>		

Fuente: (Ramos *et al.* 2013 y Wiley 1997).

El proceso de deterioro microbiano de los alimentos es un fenómeno variable, dado que está condicionado por el tipo y número de especies microbianas presentes, el tipo de alimento y las condiciones de conservación, temperatura y presencia o no de oxígeno.

Estos microorganismos pueden atacar prácticamente todos los componentes de los alimentos, actuando a la vez varios tipos de ellos, contribuyendo a cambios simultáneos responsables de alteraciones y a la descomposición del producto.

El análisis microbiológico por lo tanto no tiene carácter preventivo, sino el de inspeccionar, valorar y verificar, la carga microbiana existente o el efecto de un tratamiento o proceso con el objetivo de garantizar la seguridad alimentaria y la calidad de los productos.

### **1.3. Tendencias y alternativas al tratamiento térmico**

El cambio en los productos demandados por el consumidor ha incrementado notablemente el consumo de alimentos mínimamente procesados. Ha impulsado el desarrollo de nuevos métodos de conservación que permitan la obtención de alimentos seguros de elevada calidad y vida útil satisfaciendo las preferencias del consumidor.

Aunque los métodos más utilizados en general, comportan el uso de tratamientos térmicos más o menos agresivos, actualmente se están implementando diferentes técnicas que permitan suplirlos. Los métodos no térmicos afectan mínimamente a las características nutritivas y sensoriales de los alimentos, su eficacia no es una novedad ya que sus ventajas se conocen desde hace años.

En la actualidad se están produciendo mayores avances tecnológicos para hacer posible su comercialización y su aplicación a nuevos productos del mercado dado que esta tecnología supone una inversión económica para las empresas. Los mayores avances en este campo se han conseguido con el desarrollo de sistemas físicos, que actúan sobre la viabilidad de los microorganismos, sin incremento sustancial de la temperatura del producto.

En la Tabla 2 se resumen las bases de conservación, el efecto en los alimentos y las principales aplicaciones de distintas tecnologías en la industria alimentaria, algunas de ellas con relevante presencia en la actualidad (Herrero y de Ávila 2006).

Tabla 2. Tecnologías innovadoras en la Industria Alimentaria (IA).

Tecnología	Parámetro	Fundamento-Procedimiento	Aplicación en la (IA)	Efecto en los alimentos
Altas presiones	(100-1000 Mpa)	<b>Alta Presión dinámica (Hydrodyne Process, HDP):</b> El incremento de presión se origina en milésimas de segundo, consecuencia de la explosión que genera una onda de choque hidrodinámica (> 100 Mpa).	<i>En fase de estudio y desarrollo.</i>	Inactivación de microorganismos y ablandamiento de tejidos por ruptura de estructura celular (ej: carne).
		<b>Alta Presión Hidrostática:</b> La presión externa aplicada a un fluido confinado se transmite de forma uniforme e instantánea en todas direcciones.	Alimentos líquidos, envasados sumergidos en un fluido de baja compresibilidad. En semicontinuo y discontinuo (los más utilizados). En inducción de congelación y descongelación ultra-rápida ( <i>está aplicación se encuentra en estudio</i> ).	Equivalente a la pasteurización. Disminución en la síntesis de ADN, aumento de permeabilidad de las membranas celulares, desnaturalización de proteínas, inactivación de enzimas, viabilidad de microorganismos. No se alteran aromas ni el valor nutritivo, pueden aparecer cambios de color, apariencia y textura.
Ultrasonidos	Ondas inaudibles de frecuencia > 20 kHz	<b>Ondas ultrasónicas de baja frecuencia:</b> (18-100 kHz; $\lambda = 145$ mm) y alta intensidad (10-1000 W/cm <sup>2</sup> ). El efecto conservador está asociado a la cavitación gaseosa (microburbujas de aire en medio líquido).	En continuo o discontinuo (los más habituales). Descontaminación en vegetales, ablandamiento en carnes. Determinación del óptimo de curado en quesos, evaluación del contenido graso (in vivo o post-mortem) y de la estructura muscular, evaluación de la textura (ej: sobrasada).	Afecta a la estructura celular de los vegetales, inactivación microbiológica, aumento del rendimiento extractivo, modificación de la textura, color y viscosidad.  <b>Fuente:</b> Adaptado (Herrero y de Ávila 2006)
		<b>Termoultrasonicación:</b> aplicación de ultrasonidos y tratamientos térmicos suaves (50-60°C).	Equipos en continuo o discontinuo (los más habituales). Descontaminación en vegetales crudos y huevos enteros sumergidos en medios líquidos.	
		<b>Manosonicación:</b> Aplicación de Ultrasonidos con incrementos de presión (< 300 MPa).	Equipos en continuo o discontinuo (los más habituales). Esterilización de mermeladas, huevo líquido (prolongar la vida útil de alimentos líquidos).	
		<b>Manotermosonicación:</b> Combinación de las tres anteriores.		

Tabla 2 (continuación) Tecnologías innovadoras en la Industria Alimentaria (IA).

Tecnología	Parámetro	Fundamento-Procedimiento	Aplicación en la (IA)	Efecto en los alimentos
Irradiación	Radiaciones ionizantes durante un periodo de tiempo. La dosis absorbida se mide en gray (Gy).	Radiación gamma de los radionúclidos Cobalto-60 y Cesio-137.	Dosis bajas (hasta 1 kGy), retarda procesos biológicos (maduración y senescencia) de frutas y eliminación de insectos y parásitos. Dosis medias (hasta 10 kGy), reducen microorganismos patógenos y mejoran propiedades tecnológicas. Dosis altas (> 10 kGy), esterilización comercial.	La radiolisis produce alteraciones del ADN y forma radicales a partir de las moléculas de agua con elevado poder reductor y oxidante. Efecto conservador y afectación sensorial del alimento.
		Rayos X generados por aparatos con energía nominal igual o menor a 5 MeV.		
		Electrones acelerados generados por aparatos de energía nominal igual o menor a 10 MeV.		
Campos eléctricos de alta intensidad	Campos eléctricos de alta intensidad.	El tratamiento se aplica en forma de pulsos cortos, con una duración entre 1 y 10 ms (hasta 300 $\mu$ s). Se ajusta teniendo en cuenta diversos factores del alimento y de la microbiota contaminante.	Denominada pasteurización fría en productos bombeables, conductores de electricidad (no tiene efecto sobre enzimas). Los alimentos idóneos son: leche, huevo líquido, zumos de frutas y concentrados, sopas y extractos de carne. Estos equipos se conectan a líneas de envasado aséptico.	El efecto se basa en la alteración de la pared celular, origina la formación de poros irreversibles en la membrana (electroporación) y la pérdida de su integridad, incremento de la permeabilidad y finalmente destrucción de la célula afectada
Campos magnéticos oscilantes	Campo magnético oscilante de intensidad entre 5 y 50 teslas y una frecuencia entre 5 y 500 kHz.	El alimento en material plástico, se somete a un campo magnético (1000 veces superior al campo magnético de la tierra). La temperatura durante el procesado se mantiene entre 0 y 50 °C.	Los alimentos idóneos: zumos, mermeladas, frutas en soluciones azucaradas, derivados cárnicos, productos cocidos, envasados y listos para su consumo.	El efecto conservador se debe, a la ruptura de la molécula de ADN, proteínas y a la rotura de enlaces covalentes en moléculas con dipolos magnéticos.
Luz blanca de alta intensidad	El espectro de luz utilizado incluye longitudes de onda desde el ultravioleta lejano (200 nm) hasta la región del infrarrojo cercano (1100 nm). La intensidad de los pulsos varía entre 0,01 y 50 J/cm <sup>2</sup> . La duración de cada pulso es de 200-300 ms y la frecuencia es de 1 a 20 s-1.	Distribución del espectro: 25% ultravioleta, 45% luz visible y 30% infrarrojo. La intensidad es 20.000 veces superior a la radiación solar sobre la superficie terrestre. Este tratamiento produce cambios fotoquímicos y fototérmicos.	Es un tratamiento limitado a la superficie de los productos pero puede utilizarse para pasteurización de líquidos transparentes y alimentos envasados en materiales transparentes como: filetes y porciones de carne, pescado, gambas, pollo, etc.	Originan modificaciones en el ADN, en las membranas celulares y en las enzimas. <b>Fuente:</b> Adaptado (Herrero y de Ávila 2006)

## 1.4. Los ultrasonidos (US)

La tecnología de los ultrasonidos se fundamenta en la formación de ondas mecánicas de frecuencia superior al umbral de la audiencia humana (superior a los 16 kHz) (Soria y Villamiel 2010).

El efecto fundamental del ultrasonido en un fluido continuo, es ejercer una presión acústica ( $P_a$ ), además de la presión hidrostática que actúa sobre el medio (Ashokkumar *et al.* 2008). La presión acústica es una onda sinusoidal en función del tiempo ( $t$ ), la frecuencia ( $f$ ) y la amplitud de presión máxima de la onda ( $P_{a, max}$ ), según se muestra en la ecuación 1 (Patist y Batest 2008).

$$P_a = P_{a, max} \sin(2\pi ft) \quad (1)$$

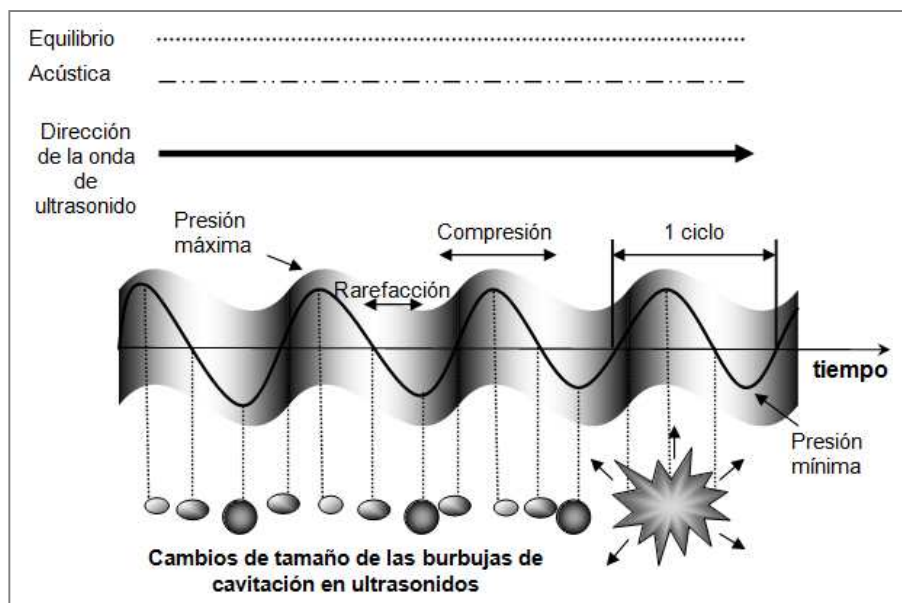


Figura 1. Cavitación ultrasónica. Adaptado de (Soria y Villamiel 2010).

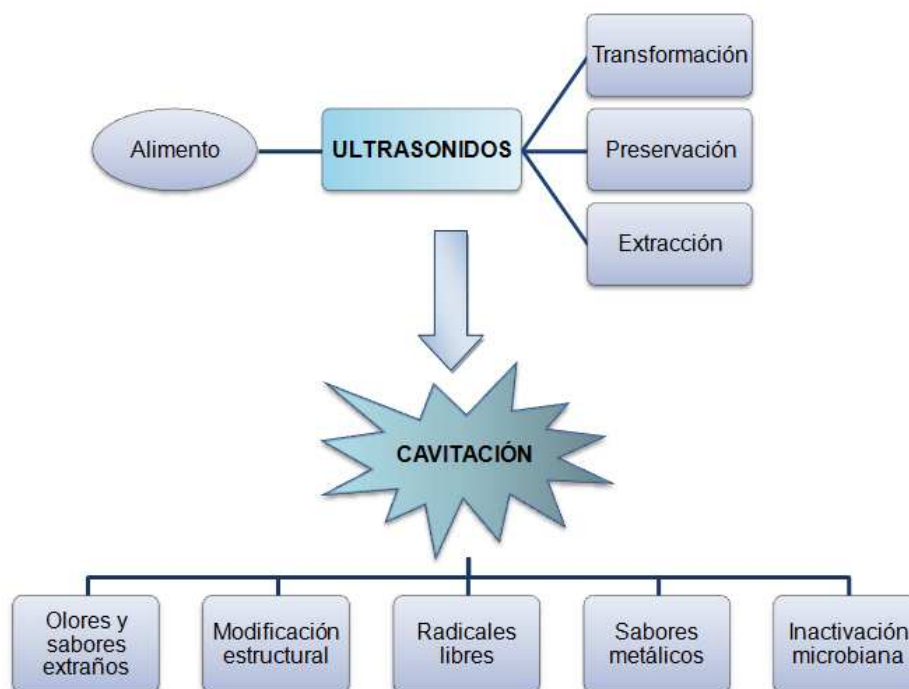
Este proceso de compresión, expansión de partículas y colapso de las burbujas se conoce como cavitación (Figura 1) y es el efecto más importante en ultrasonidos. Como la frecuencia es inversamente proporcional al tamaño de la burbuja creada (Soria y Villamiel 2010), la aplicación de ultrasonidos de baja frecuencia (16-100 kHz), genera cavitación de grandes burbujas.

Sin embargo, la combinación de los factores (calor, presión y turbulencia) que ocurren al aplicar ultrasonidos, puede acelerar la transferencia de masa en reacciones químicas, creando nuevas vías de reacción e incluso descomponiendo o generando productos distintos de los obtenidos en condiciones convencionales (Ashokkumar *et al.* 2008).

Otro efecto a destacar del ultrasonido es el que ejerce sobre las moléculas de agua; ya que las puede romper generando radicales libres altamente reactivos ( $H_2O \rightarrow H + \cdot OH$ ) que pueden reaccionar y/o modificar otras moléculas. Estos efectos, son necesarios tenerlos en cuenta al utilizar los ultrasonidos como posible tecnología en la industria alimentaria ya que pueden inducir efectos físicos y químicos sobre los alimentos tratados.

### 1.5. Efectos y aplicaciones de los ultrasonidos en los alimentos

El efecto de los ultrasonidos en la composición de los alimentos no ha sido estudiado exhaustivamente, mientras que los efectos físicos de la cavitación acústica lo han sido ampliamente. Dependiendo del proceso y la matriz del alimento, los efectos químicos de la cavitación acústica pueden ser beneficiosos o perjudiciales (Figura 2).



**Figura 2. Aplicación de los US en alimentos y efectos bioquímicos generados por la cavitación.**  
Adaptado de (Pingret *et al.* 2013)



La formación de radicales se considera una desventaja en la preservación de la bioactividad de componentes en los alimentos como los fenoles. Sin embargo puede suponer una mejora de la actividad antioxidante de otros componentes, como los flavonoides dependiendo del grado de hidroxilación (Soria y Villamiel 2010).

El uso de los ultrasonidos en el procesado de los alimentos está siendo explorado constantemente en diferentes ámbitos como: la extracción de gingerol del jengibre, la homogenización de la leche y la generación de emulsiones de alta calidad, son algunos ejemplos de su aplicación como alternativa eficaz, en ensayos a escala piloto (Vilkhu *et al.* 2008). La utilización de ultrasonidos de baja frecuencia disminuye las reacciones indeseadas que se generan entre radicales libres e ingredientes alimenticios.

Sin embargo, el ultrasonido de alta frecuencia también podría ser utilizado para el procesamiento de alimentos, añadiendo eliminadores de radicales (Vilkhu *et al.* 2008). La aplicación de ultrasonidos para la extracción de compuestos bioactivos (polifenoles y carotenos entre otros) ha resultado ser un método eficaz para aumentar el rendimiento extractivo (entre un 6 y un 35%) en distintos alimentos (Tabla 3).

**Tabla 3. Ejemplos de extracción asistida por ultrasonidos en algunos alimentos.**

Compuesto	Producto	Solvente	Frecuencia	Condiciones	Incremento (%)
β-carotenos	Zanahoria	Acuoso	24 kHz	T ambiente	15–25
		Etil-acetato	24kHz	T ambiente	8–20
Polifenoles	Orujo de uva tinta	Acuoso	24 kHz	T ambiente	11–35
	Té negro	Acuoso	24 kHz	90 °C	6–18
	Manzana	Acuoso	40 kHz	80 °C	6
Gingerol	Jengibre	Dióxido de carbono supercrítico	20 kHz	Presión (160 bares)	30

Fuente: (Vilkhu *et al.* 2008).

## 1.6. Inactivación microbiana mediante ultrasonidos

La pasteurización y la esterilización son las técnicas más frecuentes en la actualidad para la inactivación de microorganismos en los alimentos. Sin embargo la demanda de nuevos métodos con impacto reducido sobre el contenido nutricional y la calidad de los alimentos es cada vez mayor. Las nuevas técnicas de preservación desarrolladas podrían reducir la

actividad microbiana, significativamente o eliminar completamente la cantidad de calor requerida para estos procesos. El calor, junto con sus efectos destructivos sobre enzimas y microorganismos, en comparación con otros métodos de conservación de alimentos, tiene la ventaja añadida de garantizar la seguridad alimentaria y la conservación a largo plazo. Sin embargo, los efectos menos específicos del calor en los alimentos también pueden ser muy perjudiciales. Algunos procesos de calentamiento pueden causar reducciones en la calidad nutritiva y sensorial de los alimentos y pueden poner en peligro las propiedades beneficiosas. Los efectos letales de muchos de los métodos de inactivación físicos no térmicos se conocen desde hace tiempo, pero su potencial uso en la tecnología de la preservación de los alimentos se ha evaluado solo en los últimos años. En la actualidad, las altas presiones hidrostáticas, pulsos eléctricos y los ultrasonidos resultan tecnologías no térmicas prometedoras. Los ultrasonidos son una técnica con gran potencial para utilizarla en la inactivación de las poblaciones microbianas ya que la cavitación causada por los cambios en la presión de las ondas ultrasónicas permiten su reducción sin un incremento elevado de la temperatura del producto (Piyasena *et al.* 2003).

### 1.7. Mecanismo de inactivación microbiana

El uso de los ultrasonidos como posible método de inactivación microbiana se inició en la década del 1960, después de que se descubriera que las ondas de sonido utilizadas en la guerra antisubmarina tuvieron un gran impacto sobre las especies acuáticas. El mecanismo de muerte microbiana se debe principalmente al estrechamiento de las membranas celulares, aumentos de temperatura localizada y producción de radicales libres durante la aplicación de ultrasonidos (Piyasena *et al.* 2003). Las burbujas producidas durante el proceso aumentan su área superficial durante el ciclo de expansión, lo que facilita la difusión del gas, haciendo que la burbuja se expanda. Cuando la energía ultrasónica suministrada no es suficiente para retener la fase de vapor en la burbuja, se produce una rápida condensación produciendo choques violentos entre moléculas y creando zonas con un incremento de temperatura y presión. Este aumento de presión es causante del efecto antimicrobiano.

Las zonas calientes por el aumento de temperatura también pueden inactivar algunos microorganismos, pero este efecto es solo local. Estudios realizados sobre el efecto de los ultrasonidos en la reducción microbiana se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Aplicación de ultrasonidos (US) y reducciones microbianas obtenidas en algunos vegetales.

Alimento	Condiciones	Tratamiento	Reducción microbiana (Log UFC/g)	Referencia
Fresas	40 kHz, 20 °C, 10 min	US	RTM: 0,6 RHL: 0,5	(Cao <i>et al.</i> 2010)
	35 kHz, 15 °C	US	RTM: 0,6 RHL: 1,4	(Alexandre <i>et al.</i> 2012)
Lechuga	20 kHz, 53 min	US	<i>E. coli</i> : 4,4 en el agua de lavado	(Elizaquivel <i>et al.</i> 2012)
	32–40 kHz, 10 min	US	<i>S. typhimurium</i> : 1,5	(Seymour <i>et al.</i> 2002)
		US + agua con cloro (25 ppm cloro libre)	<i>S. typhimurium</i> : 2,7	
	170 kHz, 6-10 min	US + ClO <sub>2</sub> (5 y 10 ppm)	<i>Salmonella</i> spp.: 2,2-2,9 <i>E. coli</i> : 1,3-2,2 <i>Salmonella</i> spp.: 3,1-4,2 <i>E. coli</i> : 2,2-3,8	(Huang <i>et al.</i> 2006)
40 kHz, 5 min	US + (ác. láctico, cítrico, málico) al 2%	<i>E. coli</i> : 2,7 <i>S. typhimurium</i> : 3,2 <i>L. monocytogenes</i> : 2,9	(Sagong <i>et al.</i> 2011)	
Pimiento rojo	35 kHz, 15 °C	US	<i>L. innocua</i> : 1,98	(Alexandre <i>et al.</i> 2013)
Zanahoria rallada	45 kHz, 1 min	US	RTM: 1,3	(Alegria <i>et al.</i> 2009)
		US + agua con cloro (200 ppm cloro libre)	RHL: 0,9 RTM: 1,0	
Tomates Cherry	45 kHz, 10 min, 25 °C	US	<i>S. enterica typhimurium</i> : 0,8	(São José y Vanetti 2012)
		US + ác. peracético (40 ppm)	<i>S. enterica typhimurium</i> : 3,9	
Trufas	35 kHz, 4 °C, 10 min	US + etanol (70%)	RTM: 4 Recuento de hongos: < 1,7 Recuento de levaduras: < 0,5 <i>Pseudomonas</i> spp.: > 4 Enterobacteriaceae: 3,6 Bacterias ácido lácticas: 3,5	(Rivera <i>et al.</i> 2011)
Ciruelas	40 kHz, 20 °C, 10 min	US + ClO <sub>2</sub> (40 ppm)	RTM (Mésofilos): 3	(Chen y Zhu 2011)
		US + ác. peracético (40 ppm)	RTM (Psicotróficos): 2,9 RHL: 2	

RTM: Recuento total de mesófilos. RHL: Recuento de hongos y levaduras. **Fuente:** (Bilek y Turantaş 2013)

Los efectos mecánicos debido a la cavitación, incluyen las fuerzas de cizalla que pueden ocasionar la ruptura de la célula del microorganismo como se observa en la Figura 3.

Cuando una burbuja de cavitación eclosiona cerca de una superficie sólida se genera un gradiente de velocidad perpendicular a la superficie, que da como resultado las fuerzas de cizallamiento que actúan sobre la superficie del microorganismo (Gao *et al.*2013). Aunque el efecto global sobre el alimento se ve influenciado también por la presión y temperatura a que se trabaje.

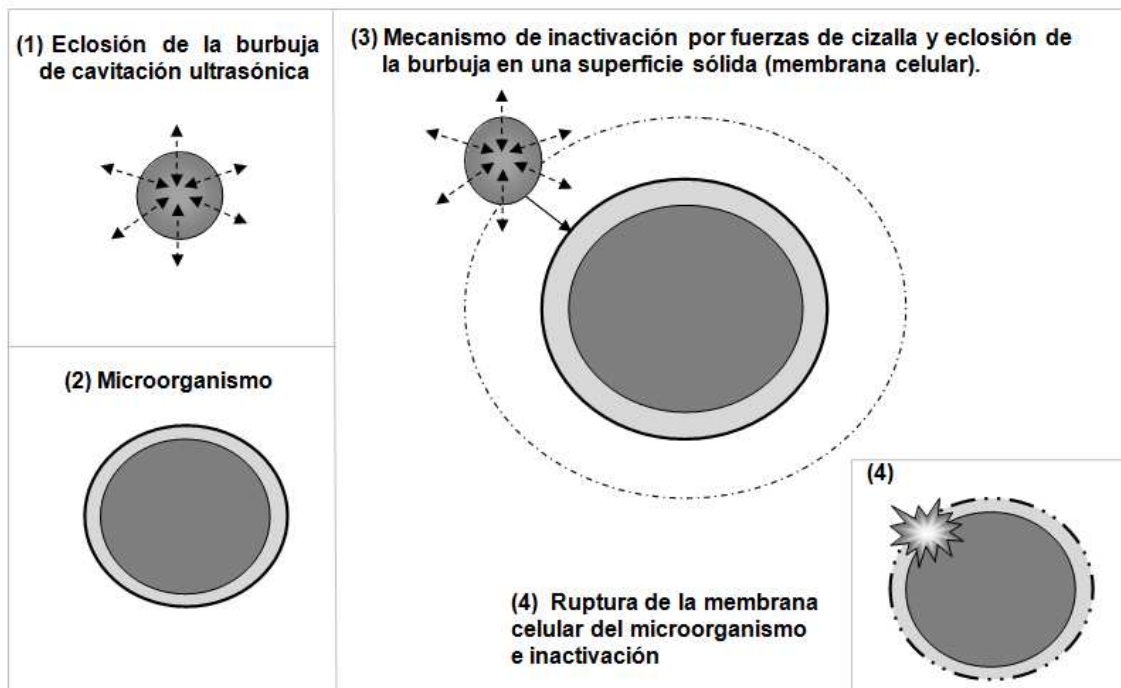


Figura 3. Mecanismo de inactivación microbiana mediante ultrasonidos. Adaptado (Gao *et al.*2013).

## 1.8. La zanahoria

La zanahoria (*Daucus carota*) es un cultivo bianual, la raíz se forma en el primer año y las flores y semillas en el segundo. Es considerado uno de los vegetales cuyo consumo, tanto fresco como procesado, se ha incrementado en los últimos años aportando múltiples beneficios nutricionales y saludables por su elevado contenido en carotenos entre otros nutrientes.

Su consumo se promueve desde asociaciones de la comunidad científica y médica como la española con la campaña “5 al día”, donde se recomienda el consumo de 5 frutas y hortalizas al día en una dieta saludable, donde la zanahoria es un gran aliado por sus múltiples formatos de consumo y practicidad de preparación.

Su sabor y olor característicos se deben principalmente a la presencia de compuestos volátiles mayoritariamente terpenos, sesquiterpenos y azúcares (Gamboa-Santos *et al.* 2013). El agua es el componente más abundante, seguido de los hidratos de carbono, siendo estos nutrientes los que aportan energía.

La zanahoria es excelente desde el punto de vista nutricional por su alto contenido en vitaminas y minerales (Tabla 5). Su característico color se debe a la presencia de carotenos, entre ellos el  $\beta$ -caroteno o pro-vitamina A, con actividad antioxidante. También es fuente de vitamina E y vitaminas del grupo B como los folatos y la Niacina. En cuanto a minerales, destaca su alto contenido en potasio.

**Tabla 5. Composición nutricional de la zanahoria fresca y congelada.**

Composición nutricional por 100 g de zanahoria			
Nutrientes	Unidades	Zanahoria fresca	Zanahoria congelada
Agua	g	88,29	90,04
Energía	Kcal	41	36
Proteínas	g	0,93	0,78
Lípidos	g	0,24	0,46
Carbohidratos	g	9,58	7,90
Fibra	g	2,8	3,3
Azúcares	g	4,74	4,76
Calcio	mg	33	36
Hierro	mg	0,30	0,44
Magnesio	mg	12	12
Fósforo	mg	35	33
Potasio	mg	320	235
Sodio	mg	69	68
Zinc	mg	0,24	0,33
Yodo	µg	6,53	6,50
Vitamina C, ácido ascórbico	mg	5,9	2,5
Vitamina B1, Tiamina	mg	0,066	0,044
Vitamina B2, Riboflavina	mg	0,058	0,037
Vitamina B3, Niacina	mg	0,983	0,464
Vitamina B6, Piridoxina	mg	0,138	0,095
Folatos, DFE	µg	19	10
Vitamina A (Retinol)	µg	835	710
Vitamina E (α-tocoferol)	mg	0,66	0,57
Vitamina K (filoquinona)	µg	13,2	17,6
Carotenoides (Eq. β-carotenos)	µg	8285	7047

Fuente: (USDA 2013 y SEH-LELHA 2013).

## 1.9. Parámetros de calidad: color y textura en vegetales

Los cambios de color en los alimentos pueden afectar a la aceptabilidad global del producto de los consumidores. Diversos estudios han documentado el efecto de los ultrasonidos en el color dependiendo el alimento, como se resume en la Tabla 6.

Estos cambios en el color se deben a reacciones bioquímicas aceleradas por el efecto de los ultrasonidos como la reacción de Maillard o sabores extraños, en leche o en zumos de frutas entre otros productos estudiados (Pingret *et al.* 2013).

**Tabla 6. Efecto de los ultrasonidos en el color y diferentes componentes de los alimentos.**

Alimento	Parámetros	Condiciones	Observaciones	Fuente
Zumo de tomate	Color, ácido ascórbico	20 kHz t: 2–10 min T: 32–45 °C	Modificaciones del color y degradación del ácido ascórbico.	(Adekunte <i>et al.</i> 2010)
Piña, uva, zumo de arándanos y manzanas	pH, color, antocianos	24 kHz t: 0,5–10 min T: 40–60 °C	Oscurecimiento y modificación del pH, detección de malos sabores y disminución de antocianos.	(Bermúdez <i>et al.</i> 2012)
		20 kHz t: 8 min T: 43–58 °C		(Caminiti <i>et al.</i> 2011)
Berros	Color	20 kHz t: 0–120 min T: 82–92 °C	Incremento del color verde.	(Cruz <i>et al.</i> 2007)
Zumo de naranja	Color, ácido ascórbico	20 kHz t: 2–10 min T: 10 °C	Oscurecimiento del zumo y degradación del ácido ascórbico.	(Gómez-López <i>et al.</i> 2010)
		20 kHz t: 0–60 min T: 30 °C		(Lee <i>et al.</i> 2005)
Sidra	Color, turbidez	20 kHz, t: 4–20 min, T: 40–60 °C	Pardeamiento enzimático y disminución de la turbidez	(Ugarte-Romero <i>et al.</i> 2006)

Fuente: (Pingret *et al.* 2013)

De los componentes responsables del color, los carotenoides son los pigmentos naranjas responsables del color de las zanahorias. Son sensibles al calor, oxígeno, luz y a las reacciones enzimáticas. Su concentración es un parámetro importante en la determinación de la calidad ya que es un factor determinante del color y de la calidad nutricional.

En la textura de frutas y hortalizas el tratamiento térmico provoca cambios químicos y físicos de la pared celular vegetal que a su vez alteran su estructura modificando las propiedades mecánicas. La consecuencia es la pérdida de presión de turgencia y cambios de las propiedades mecánicas que dan como resultado ablandamiento.

El mecanismo de cómo el ultrasonido altera la estructura de la pared celular y las propiedades mecánicas no está claro. Una teoría es que puede penetrar la membrana de tal manera que permite la difusión del contenido interno a través de la membrana y pared celular provocando una muerte gradual de la presión de turgencia (Day *et al.* 2012).

Dependiendo de la intensidad de los ultrasonidos, la viscosidad de los alimentos puede aumentar o disminuir, siendo este efecto temporal o permanente con la modificación directa de la textura del producto. En gránulos de almidón de maíz se ha determinado una disminución y aumento de la viscosidad por el efecto del ultrasonido. Así como en purés de verdura, el tratamiento de ultrasonidos también provoca un aumento en la viscosidad (Soria y Villamiel 2010).



## 2. Objetivos

El objetivo principal del proyecto es evaluar la eficacia del ultrasonido como método de reducción microbiana en la zanahoria (*Daucus carota*).

Los objetivos específicos son:

- Determinar el efecto de la frecuencia de ultrasonidos aplicada (25-40 kHz) y del tiempo (10, 20 min) en la población de microorganismos aerobios mesófilos, hongos y levaduras.
- Comprobar el efecto de la frecuencia y del tiempo de aplicación sobre el color y la textura de la zanahoria.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1. Materia prima

Las zanahorias frescas (*Daucus carota*) de procedencia Española y variedad Nelson fueron obtenidas de dos proveedores. Un primer lote se compró a través de un punto de compra de corta distancia desde el punto de origen y se utilizó en pruebas preliminares al estudio. El resto de los lotes se obtuvieron de un supermercado de gran superficie.

Desde la compra hasta el procesado se mantuvieron en almacenado refrigerado ( $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ ) y el tiempo de almacenado no superó los 5 días. Las zanahorias se cortaron en láminas con un grosor aproximado de 10 mm de forma manual y se descartaron las partes superiores a 25-30 mm y las inferiores a 10 mm de diámetro para obtener una muestra homogénea y representativa del lote analizado.

### 2.2. Equipos de ultrasonidos de baja frecuencia utilizados

Para la aplicación de los ultrasonidos se utilizaron dos equipos con tanque de capacidad de tres litros para la realización de los experimentos:

- Baño de ultrasonidos modelo DTG-250-LABO, frecuencia 25 kHz (Sonowat).
- Baño modelo 2510 (Branson) con frecuencia de 40 kHz.



**Imagen 1. Equipos de (US) utilizados.** Sonowat 25 kHz (izquierda), Branson 40 kHz (derecha).

### 2.3. Diseño experimental

El diseño experimental se dividió en dos bloques realizados a escala de laboratorio. El primer bloque (pruebas preliminares), lo integran dos experimentos iniciales ilustrados en el diagrama de flujo (Figura 4). Los tiempos de tratamiento utilizados en estos ensayos fueron 5 y 10 minutos. En este bloque se realizó el control del incremento de temperatura del agua del baño de ultrasonidos en ambas frecuencias (25 y 40 kHz) así como los análisis microbiológicos y físicos (color y textura) de cada muestra por duplicado.

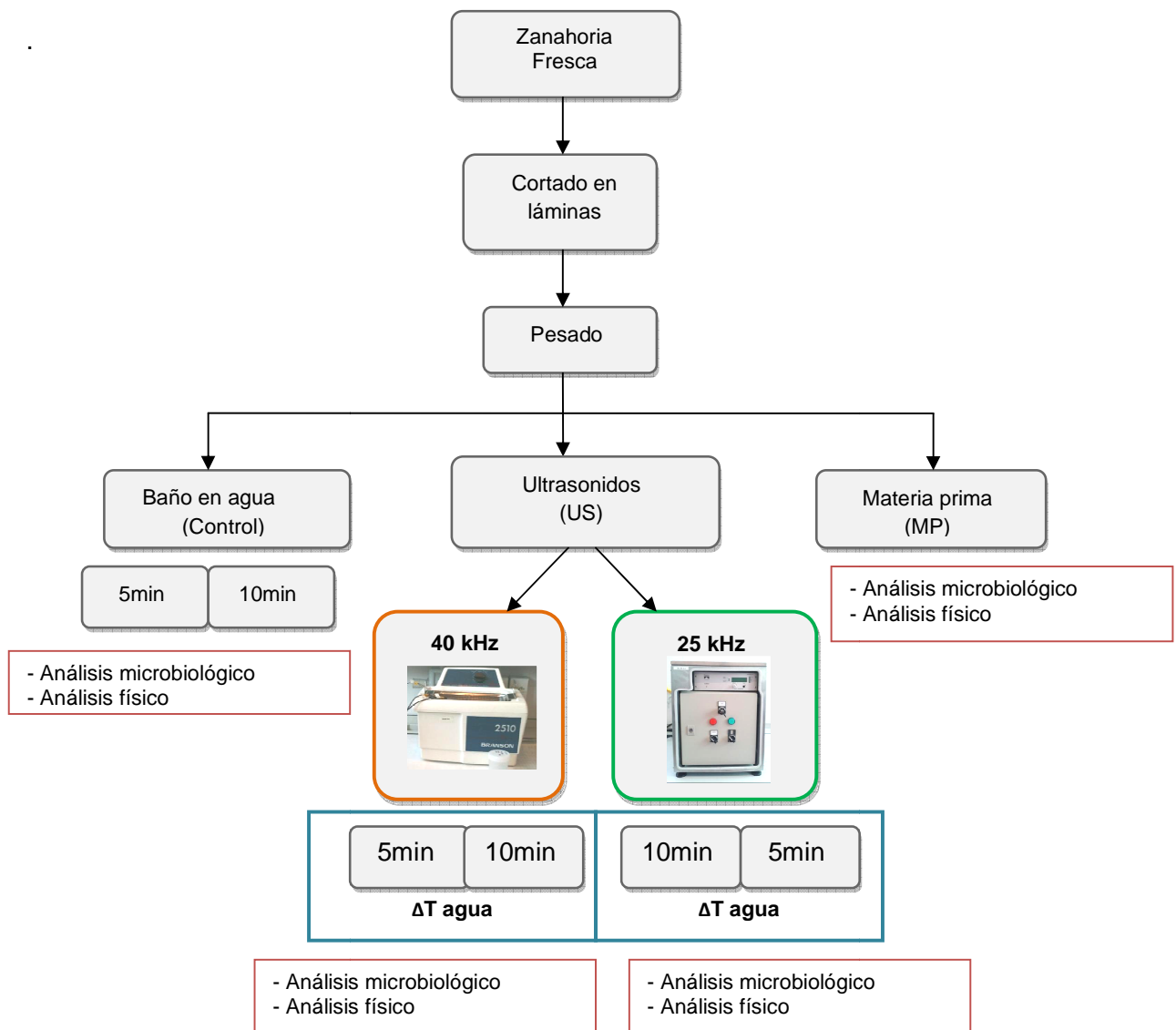


Figura 4. Diseño experimental bloque 1: pruebas preliminares.

El segundo bloque formado por cuatro experimentos (Figura 5) se diferencia del primero por el tiempo de tratamiento aplicado, 10 y 20 minutos. Del mismo modo se controló el incremento de temperatura del agua y también la del corazón de la zanahoria, llevándose a cabo las mismas analíticas.

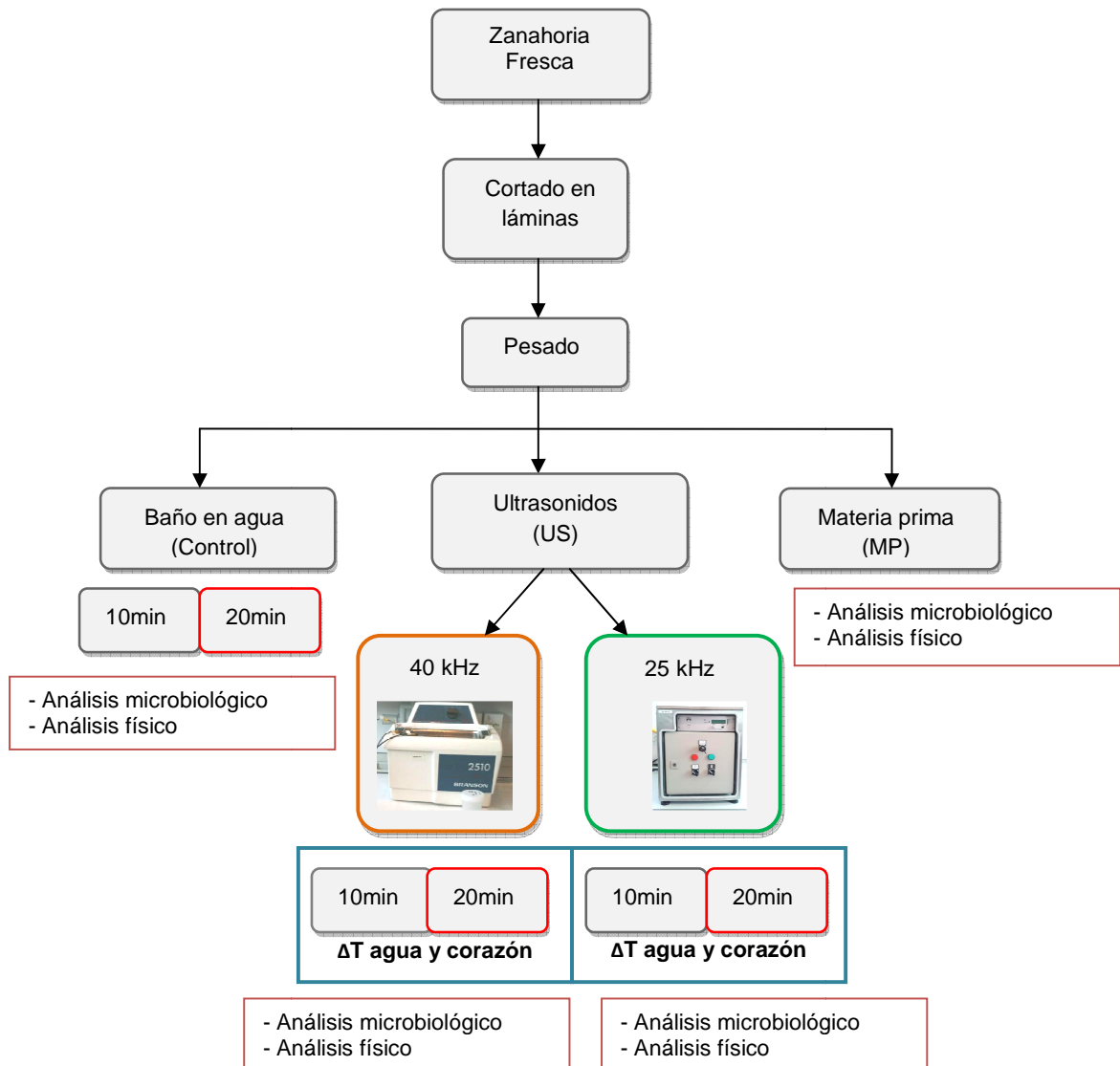


Figura 5. Diseño experimental bloque 2.

En ambos bloques experimentales, las zanahorias procesadas no fueron lavadas ni desinfectadas y el ratio utilizado fue de 1:15 (zanahoria: agua).

Los experimentos se dividieron por equipo de ultrasonidos, frecuencia de 25 kHz y de 40 kHz (US) y se realizaron al mismo tiempo muestras lavadas en agua de red.

De esta forma se obtuvieron datos sobre la eficacia del tratamiento de ultrasonidos bajo dos aspectos: comparativa respecto la contaminación microbiana inicial propia del vegetal (materia prima) y comparativa con la reducción obtenida por el efecto del baño en agua (Control).

Para el recuento microbiológico se recogieron las muestras en recipiente estéril hasta su siembra y posterior incubación. Todo el proceso y muestras se realizaron por duplicado.

## 2.4. Parámetros analizados

### 2.4.1. Color

La medida de color puede cuantificarse de forma objetiva con la utilización de colorímetros, segmentando la luz reflejada por el alimento en tres componentes según el sistema Cielab (Commission Internationale de l'Eclairage). Las componentes se definen como:  $L^*$  claridad,  $a^*$  proporción de rojo-verde y  $b^*$  cantidad de amarillo-azul. De esta forma se obtienen unas coordenadas que corresponden de forma objetiva al color del alimento (Figura 6).

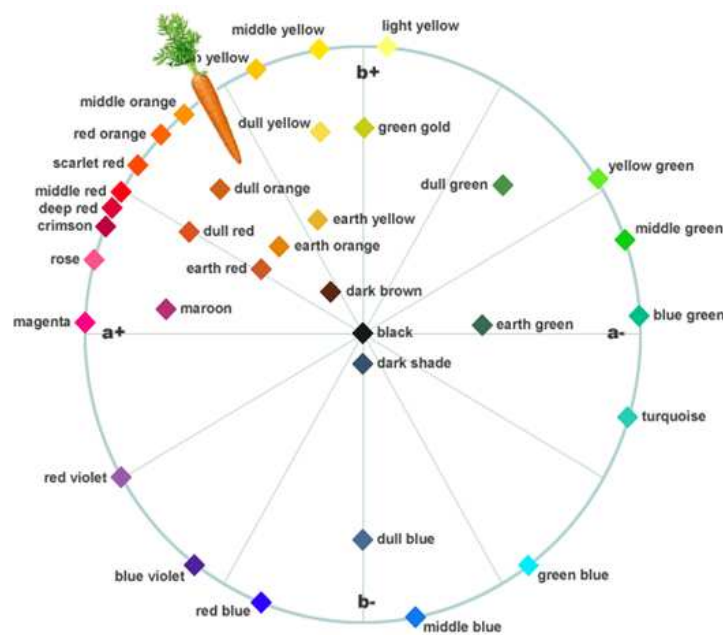


Figura 6. Representación descriptiva de las coordenadas del espacio Cielab. Fuente: Handprint.

Posterior al tratamiento de ultrasonidos se midió el color de las muestras de zanahoria cortada. Para la cuantificación se realizaron veinte medidas por muestra (dos por lámina de zanahoria). Se utilizó un colorímetro modelo (Minolta CR-400) con tamaño de apertura de 8mm, iluminante D65 y observador 2° y se calibró utilizando el blanco de referencia: ( $L^* = 97,59$   $a^* = -0,03$   $b^* = 1,75$ ).

Los componentes del color se expresaron como  $L^*$  (Luminosidad),  $a^*$  (variación rojo-verde) y  $b^*$  (amarillo-azul) y se obtuvieron las coordenadas CieLab con las siguientes expresiones:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (2)$$

$$a^* = C^* \cos (H) \quad (3)$$

$$b^* = C^* \sin (H) \quad (4)$$

$$^\circ H = \arctan(b^* / a^*) \quad (5)$$

Para la determinación del color objetivo, se utilizó el software “*Color calculator*” de easyrgb. La utilidad de esta herramienta es la de convertir la coordenadas Cielab a otro sistema de medición del color (RGB). De esta forma el software facilita el código del color referido a las coordenadas introducidas y la imagen de éste.

#### 2.4.2. Textura instrumental: Firmeza

La determinación de la firmeza en los alimentos consiste en la medida de la textura como la resistencia a una fuerza. Se cuantifica a través de aparatos instrumentales capaces de medirla con la sonda apropiada al producto estudiado. Como resultante se obtiene una curva de tiempo-fuerza característica para cada alimento.

Para la realización del análisis de la firmeza se utilizó el texturómetro TA.XT2 (Stable Microsystem, UK), con límite de carga 30 kg y precisión de 0,1g. Las pruebas se realizaron con la sonda (P2) de 2 mm de diámetro, 7mm de penetración y una velocidad de ensayo de 1 mm/s. De cada muestra se realizaron veinte mediciones (dos medidas por lámina de zanahoria).

### 2.4.3. Recuento de microorganismos aerobios mesófilos (ISO 4833)

En este grupo se incluyen todas las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse a 30° C en las condiciones establecidas y sirve para obtener datos sobre la calidad sanitaria de un alimento, las condiciones de manipulación y las higiénicas de la materia prima.

El método utilizado se basa en la siembra en profundidad de las diluciones realizadas de la muestra en un medio de cultivo definido (PCA), entre dos placas de Petri (las colonias crecen en el interior de la masa de Agar).

Las diluciones realizadas fueron ( $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ ) y la incubación de las placas se realizó en aerobiosis a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1$ , durante 48-72h.

El número total de colonias (UFC/g) se obtuvo a través de la siguiente expresión:

$$\mathbf{N \text{ Log (UFC/g)} = \text{Log} (\bar{n} \times d_i)} \quad \mathbf{(6)}$$

Donde N es el logaritmo en base 10 del número total de colonias (UFC/g),  $\bar{n}$  el número medio de colonias para una dilución (UFC/g) y  $d_i$  el factor de dilución.

La reducción microbiana de los tratamientos de ultrasonidos y baño en agua se calculó respecto la zanahoria fresca de la siguiente forma:

$$\mathbf{\text{Reducción Log (UFC/g)} = (\text{Log } N_{mp} - \text{Log } N_m)} \quad \mathbf{(7)}$$

Donde la Reducción logarítmica es el total de reducción para el número total de colonias de una muestra (UFC/g),  $N_m$  es el número total de colonias de la muestra (UFC/g) y  $N_{mp}$  el número total de colonias que contiene la materia prima (UFC/g).

#### 2.4.4. Recuento de hongos y levaduras (ISO 7954)

El recuento de hongos y levaduras es un índice de las condiciones higiénicas de la materia prima y de las condiciones de manipulación.

Este método de recuento de colonias a 25°C se basa en la siembra en profundidad en un medio de cultivo selectivo determinado, (CGA). La siembra de las diluciones decimales obtenidas de la suspensión madre se realiza del mismo modo que en el recuento de aerobios mesófilos, pero en este caso las diluciones utilizadas fueron: 10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup>.

La incubación de las placas se realizó en aerobiosis a 25°C ± 1, durante 72-120h horas.

El logaritmo del número total de colonias (UFC/g) y el logaritmo de la reducción microbiana se calcularon del mismo modo que el apartado anterior, según las expresiones (6) y (7).

#### 2.4.5. Control de la temperatura

Estudios anteriores han demostrado que el ultrasonido genera un aumento de la temperatura localizada. Este incremento se debe al efecto de la cavitación e implosión de las burbujas generadas que originan ondas de choque que provocan el colapso y la generación de radicales hidroxilo primarios (Bilek y Turantaş 2013). Todos estos fenómenos físicos y químicos intervienen en la inactivación de los microorganismos.

Para cuantificar el incremento de temperatura durante la aplicación de ultrasonidos y observar posibles diferencias entre diferentes frecuencias, se registró la temperatura del agua del baño de ultrasonidos y corazón de la zanahoria durante el tratamiento. De este modo se determinaron los incrementos de temperatura para cada equipo de ultrasonidos utilizado.

Para la obtención de los registros de temperatura se utilizó un dataloger provisto de cinco termopares independientes con captación de temperatura cada 5 segundos.



**Imagen 2. Dataloger.**



## 2.5. Análisis de datos

Los datos obtenidos se sometieron al análisis de la varianza mediante ANOVA de uno y dos factores a través de GLM (modelo lineal general).

Para analizar los efectos del tiempo y frecuencia de ultrasonidos se realizó un ajuste factorial ( $2^k$ ) y se realizaron comparaciones de las medias a través del test de Tukey para observar las diferencias entre muestras.

El nivel de significación utilizado en todos los casos fue de  $\alpha = 0,05$  y el software utilizado Minitab 16.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Bloque experimental 1: Pruebas preliminares

La literatura publicada referente a la aplicación de ultrasonidos en alimentos, presenta entre estudios condiciones experimentales muy diferentes: frecuencia utilizada, tiempo de aplicación, ratio, temperatura y microorganismos analizados.

En este bloque se ajustaron las condiciones experimentales al producto estudiado, para ello se llevaron a cabo dos experimentos de ultrasonidos a baja frecuencia (25kHz y 40Khz) durante 5 y 10 minutos. A su vez se realizaron tratamientos control que consistieron en un baño estático en agua de red durante el mismo tiempo de aplicación. Partiendo de la contaminación inicial de la zanahoria fresca, se recogen los recuentos microbiológicos de aerobios mesófilos, hongos y levaduras y la respectiva reducción obtenida (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados preliminares sobre la reducción microbiana (n=2).

Pruebas preliminares	Muestra	Ultrasonidos de 40 kHz		Ultrasonidos de 25 kHz	
		UFC/g	Reducción Log UFC/g	UFC/g	Reducción Log UFC/g
Aerobios mesófilos	Zanahoria fresca	$3,13 \cdot 10^4$	-	$7,55E \cdot 10^5$	-
	baño 5 min	$6,18 \cdot 10^4$	Sin reducción	$1,13 \cdot 10^6$	Sin reducción
	baño 10 min	$1,83 \cdot 10^4$	0,23	$9,80 \cdot 10^5$	Sin reducción
	ultrasonidos 5 min	$3,03 \cdot 10^4$	0,01	$1,20 \cdot 10^5$	0,80
	ultrasonidos 10 min	$3,20 \cdot 10^4$	Sin reducción	$3,30 \cdot 10^4$	1,40
Hongos y levaduras	Zanahoria fresca	$9,50 \cdot 10^1$	-	$4,50 \cdot 10^1$	-
	baño 5 min	$8,00 \cdot 10^1$	0,08	$1,15 \cdot 10^2$	Sin reducción
	baño 10 min	$2,75 \cdot 10^1$	0,54	$1,20 \cdot 10^2$	Sin reducción
	ultrasonidos 5 min	$3,50 \cdot 10^1$	0,44	$4,50 \cdot 10^1$	Sin reducción
	ultrasonidos 10 min	$1,60 \cdot 10^1$	Sin reducción	$1,00 \cdot 10^1$	1,04

En estos experimentos se observa la existencia de diferencias entre la contaminación inicial de la materia prima, atribuidas al diferente origen y punto de compra de las zanahorias.

También se observó que la frecuencia de 25 kHz presentó una mayor reducción en aerobios mesófilos y este efecto se incrementó al aplicar ultrasonidos durante 10 minutos. Los resultados obtenidos de las muestras lavadas en agua no fueron suficientemente homogéneos para verificar su efecto respecto la reducción obtenida.

Aunque estos resultados iniciales no fueron concluyentes se apreció un efecto positivo de la aplicación de ultrasonidos respecto a la inactivación microbiana. De estos resultados, se valora como posible factor para aumentar el efecto de los ultrasonidos (el tiempo de aplicación), por lo que en el siguiente bloque experimental se decide aumentar el tratamiento a 20 minutos y eliminar el de 5 minutos, así como obtener la materia prima siempre del mismo proveedor.

### 3.1.1. Incremento de la temperatura durante la aplicación de (US)

Uno de los efectos producidos por la cavitación es el aumento de la temperatura. Para evaluar este fenómeno se realizaron previamente a los experimentos el registro de la temperatura del baño de ultrasonidos durante 30 minutos. De los resultados se verificó la existencia de diferencias respecto al incremento de temperatura ya que la frecuencia de trabajo en los equipos era diferente. De los datos obtenidos se realizó la recta de regresión (Figura 7) para observar la variación de las pendientes.

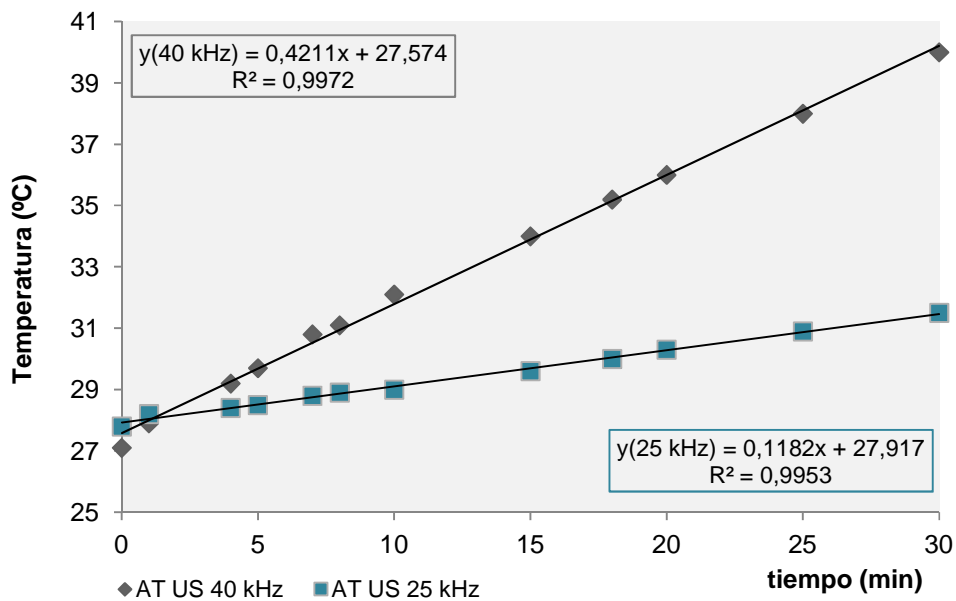


Figura 7. Recta de regresión de la temperatura a 40 y 25 kHz.

Como se observa en la ecuación de regresión por cada frecuencia de trabajo, la pendiente es muy diferente entre ellas y el coeficiente de correlación muy elevado. El mayor incremento de temperatura se obtuvo a 40 kHz, siendo de 12,9°C en 30 minutos de tratamiento, (0,43°C por minuto).

El equipo de 25 kHz, no superó los 4°C en todo el tratamiento (0,12°C por minuto).

Analizando el comportamiento de las frecuencias de ultrasonidos y el aumento de temperatura producido en el agua, se decide controlar la temperatura corazón de la zanahoria en el segundo bloque experimental y verificar si en medio sólido la transferencia de energía por el efecto de la cavitación se comporta del mismo modo que en medio fluido.

### **3.2. Bloque experimental 2: Efecto de la aplicación de ultrasonidos**

En este apartado se recogen los resultados de cuatro experimentos realizados en condiciones diferentes de tiempo y frecuencia de ultrasonidos.

Dos de ellos se realizaron a una frecuencia de 40 kHz durante 10 y 20 minutos y los dos restantes a 25 kHz durante los mismos tiempos de tratamiento. Se realizaron los mismos análisis que en bloque experimental anterior y se incluyeron el control de la temperatura corazón de la zanahoria, la determinación del color y la textura instrumental.

#### **3.2.1. Evolución de la temperatura durante la aplicación de (US)**

Los registros de las temperaturas obtenidas de los termopares, se muestran en la Figura 8. Se observa que el incremento de la temperatura corazón y la del agua es mayor a una frecuencia de 40 kHz que a 25 kHz como muestran las pendientes de la regresión. El incremento total de la temperatura corazón a 40 kHz resultó de 7,3°C en 20 minutos, (0,4°C por minuto de tratamiento). En 25 kHz fue muy inferior 3,3°C en todo el tratamiento, tan solo 0,2 °C por minuto.

La temperatura del agua resultó ser ligeramente superior que la temperatura corazón en ambas frecuencias. Esto es comprensible dado que la transferencia de energía presenta menor resistencia en el agua.

Esta diferencia de incremento de la temperatura según la frecuencia de ultrasonidos aplicada se deberá tener presente en la interpretación de los resultados como posible factor que puede afectar la textura de la zanahoria.

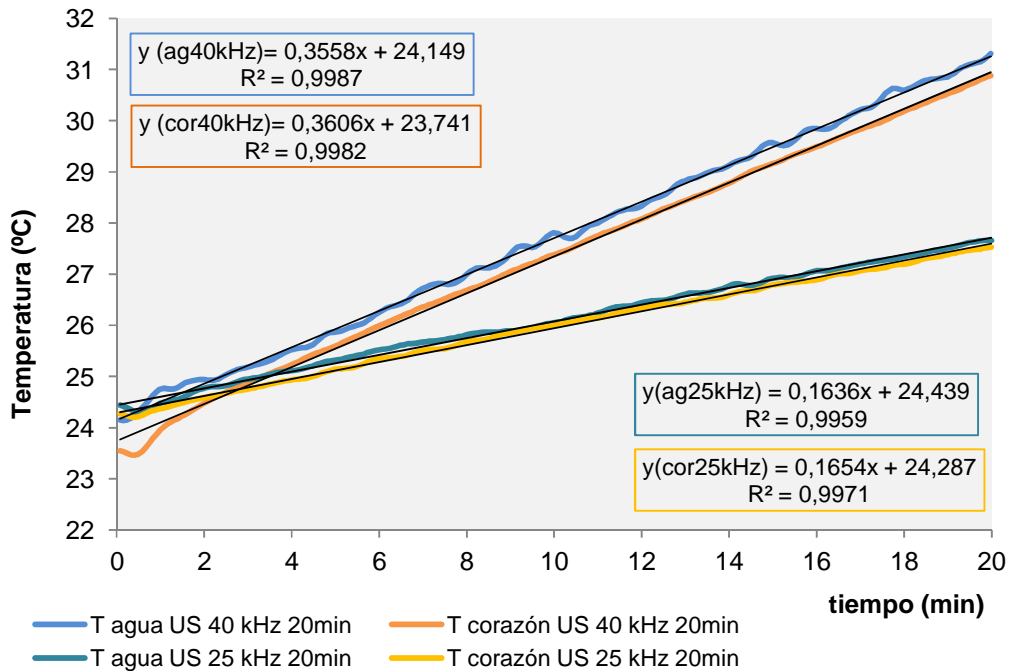


Figura 8. Recta de regresión de la temperatura corazón a 40 y 25 kHz y del agua (n=2).

### 3.2.2. Efecto del tiempo de aplicación y la frecuencia en la reducción microbiológica

Para el análisis de estos efectos (tiempo y frecuencia), las muestras se separaron por tratamiento aplicado:

- zanahoria fresca
- baño en agua de red
- ultrasonidos

Por tiempo de aplicación (5-10 minutos) y por frecuencia de ultrasonidos utilizada (25 o 40 kHz).

### 3.2.3. Aplicación de ultrasonidos de 40 kHz: efecto del tiempo

En la Tabla 8, se presentan los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos, hongos y levaduras de las muestras tratadas con ultrasonidos a 40 kHz.

Tabla 8. Efecto del tiempo y tratamiento a 40 kHz en la población microbiana (n=4).

40 kHz	Muestra	10 min	20 min
		Log UFC/g	Log UFC/g
Aerobios Mesófilos	Zanahoria fresca	6,21	6,26
	baño en agua	6,20	5,60
	ultrasonidos	5,97	5,38
Hongos y levaduras	Zanahoria fresca	2,90	3,10
	baño en agua	2,67	2,52
	ultrasonidos	1,89	2,40

Aplicando ANOVA de un factor sobre las reducciones microbianas, se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre la reducción de microorganismos aerobios mesófilos respecto la muestra control (Figura 9).

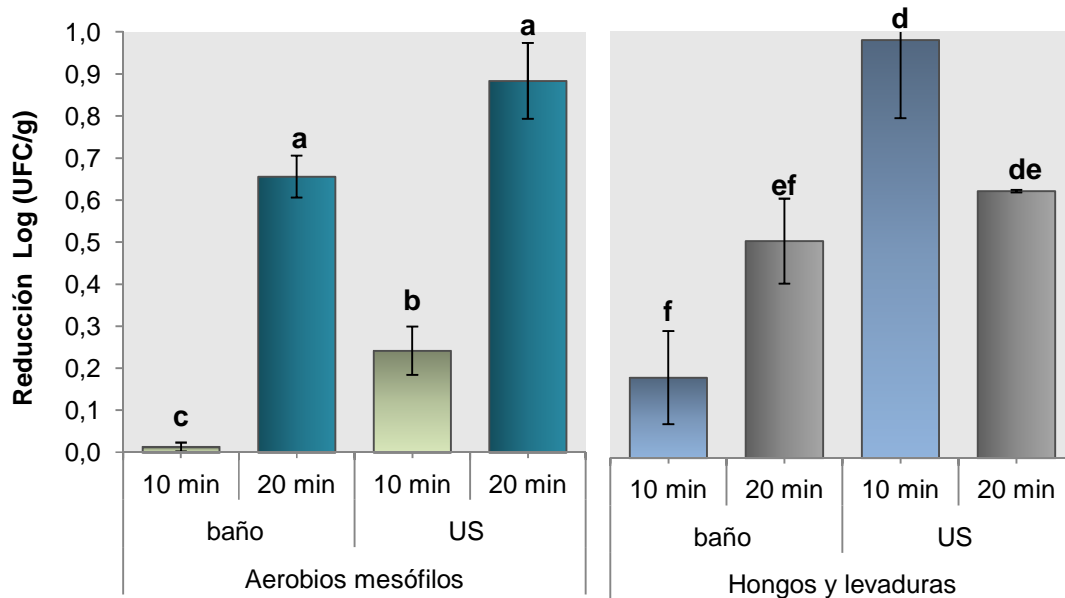


Figura 9. Reducción microbiológica a 40 kHz.

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Aerobios mesófilos, (abc); hongos y levaduras (def).

El aumento de tratamiento a 20 minutos reflejó un efecto positivo sobre la disminución de aerobios mesófilos ya que se encontró diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) respecto al tratamiento de 10 minutos.

En hongos y levaduras, aumentar el tiempo de tratamiento no obtuvo resultados significativos de reducción microbiana. El mejor resultado se obtuvo en 10 minutos de tratamiento (0,98 Log UFC/g) encontrándose diferencias significativas respecto a las zanahorias lavadas, que tampoco obtuvieron mejores resultados ampliando el tiempo de lavado a 20 minutos.

Los resultados obtenidos de las reducciones logarítmicas son comparables a los recogidos en el estudio de Cao *et al.* 2010, donde obtienen reducciones de 0,4 Log en aerobios mesófilos y 0,5 Log en hongos y levaduras.

Estos resultados son inferiores a los obtenidos en este proyecto en condiciones experimentales similares.

### 3.2.4. Aplicación de ultrasonidos de 25 kHz: efecto del tiempo

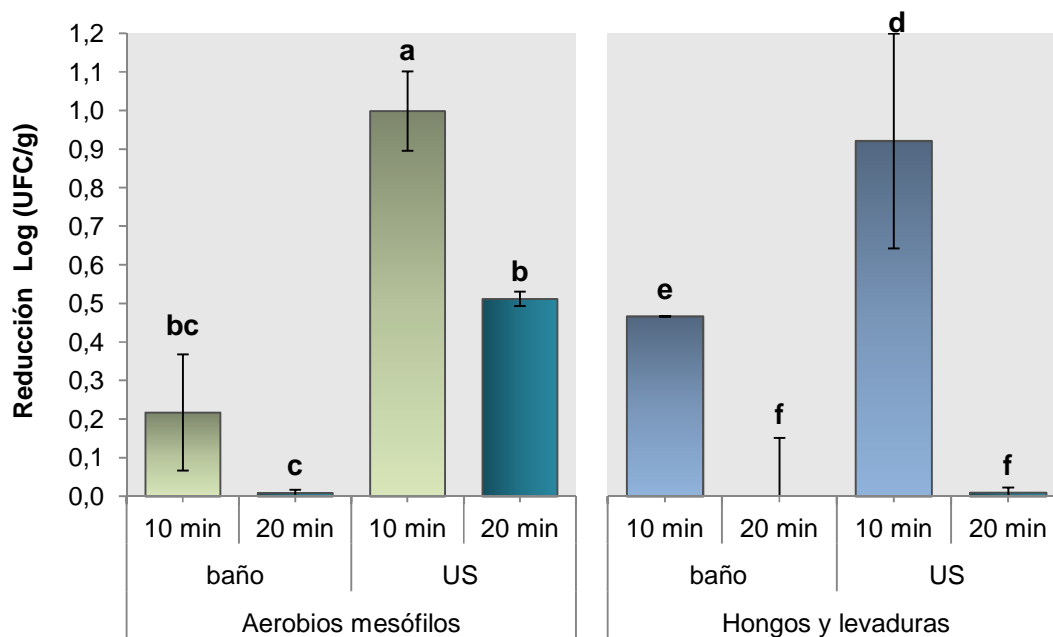
En la Tabla 9, se presentan los recuentos de los microorganismos aerobios mesófilos, hongos y levaduras de las muestras tratadas con ultrasonidos a 25 kHz. Para comprobar del mismo modo que en los experimentos anteriores si al aumentar el tiempo de tratamiento aumentaba la reducción microbiológica, se realizó ANOVA de un factor (Figura 10).

Tabla 9. Efecto del tiempo y tratamiento a 25 kHz en la población microbiana (n=4).

25 kHz	Muestra	10 min	20 min
		Log UFC/g	Log UFC/g
Aerobios mesófilos	Zanahoria fresca	6,14	6,13
	baño	5,93	6,12
	ultrasonidos	5,14	5,62
Hongos y levaduras	Zanahoria fresca	3,73	2,48
	baño	3,18	2,57
	ultrasonidos	2,77	2,46

Al analizar la reducción obtenida se observan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) respecto a las poblaciones de aerobios mesófilos y se verifica que el tratamiento de ultrasonidos de 10 minutos consigue la mayor reducción (1 Log UFC/g).

Al aumentar el tiempo de aplicación a 20 minutos no se incrementó la reducción microbiana de estos microorganismos, aunque se encontraron diferencias significativas entre baño en agua y ultrasonidos.



**Figura 10. Reducción microbiológica a 25 kHz.**

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ .) Aerobios mesófilos, (abc); hongos y levaduras (def).

En hongos y levaduras la reducción obtenida en 10 minutos (0,92 Log UFC/g) a 25 kHz fue similar a la obtenida a 40 kHz (0,98 Log UFC/g).

Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre el tratamiento de ultrasonidos y el baño de agua (10 minutos), pero no al aumentar el tiempo en 20 minutos.

El hecho de aumentar el tiempo de tratamiento no mostró un incremento en la reducción de estos microorganismos ya que los mejores resultados se obtuvieron en 10 minutos.



### 3.2.5. Efecto del tiempo, tratamiento y frecuencia (US)

Posterior al análisis del efecto del tiempo en la reducción de los microorganismos por cada frecuencia de ultrasonidos, se determinó el efecto individual del tratamiento realizado (baño vs. ultrasonidos) y la interacción sobre el tiempo aplicado.

Para el estudio de estos datos se realizó ANOVA de dos factores mediante Modelo Lineal General (GLM) dichos resultados se presentan en la Tabla 10.

Sobre la reducción de aerobios mesófilos los ultrasonidos presentaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) respecto al baño, pero no sobre el tiempo de aplicación. Este resultado revela que la aplicación de ultrasonidos redujo en mayor proporción estos microorganismos, dado que la interacción (tiempo x tratamiento) resultó ser no significativa.

**Tabla 10. Modelo Lineal General para la reducción de microorganismos vs tratamiento y tiempo(n=8).**

Factores		Aerobios mesófilos (Log UFC/g)		Hongos y levaduras (Log UFC/g)	
		Media	P	Media	P
Tiempo	10 min	0,5a	0,373	0,6d	0,021
	20 min	0,4a		0,3e	
Tratamiento	Baño	0,2a	0,018	0,3d	0,024
	Ultrasonidos	0,7b		0,6e	
Interacción: tiempo x tratamiento		20 min + US 0,7a	0,669	20 min + US 0,3e	0,068
		10 min + US 0,6a		10 min + US 1,0d	
		20 min + baño 0,3a		20 min + baño 0,3e	
		10 min + baño 0,1a		10 min + baño 0,3e	

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Aerobios mesófilos, (ab); hongos y levaduras (de). ( $\alpha = 0,05$ )

La reducción de hongos y levaduras mostró diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre el tratamiento realizado y el tiempo de aplicación. La combinación de factores que obtuvo mayor reducción de estos microorganismos (1,0 Log UFC/g), resultó la aplicación de ultrasonidos durante 10 minutos.

En diferentes estudios exponen que el efecto de los ultrasonidos varía según el tipo de microorganismo (Adekunte *et al.* 2010). Una posible explicación entre las diferencias obtenidas de aerobios mesófilos, hongos y levaduras puede ser debida a que los efectos físicos producidos por la cavitación no sean tan eficaces en la inactivación de levaduras. Esto se debe a son relativamente más rígidas y tienen mayor resistencia a la acción de las microcorrientes generadas por la cavitación, amortiguando las fuerzas de cizalla.

Para comprobar si existieron diferencias entre los dos tratamientos de ultrasonidos y obtener la mejor combinación de frecuencia y tiempo de tratamiento, se realizó un ajuste factorial  $2^k$ , donde los factores estudiados fueron:

1. Tiempo de tratamiento: 10 minutos (-) y 20 minutos (+)
2. Frecuencia de ultrasonido: 25 kHz (-) y 40 kHz (+)

Tal y como muestran los resultados de la Tabla 11, la interacción entre el tiempo de aplicación y la frecuencia de ultrasonidos en microorganismos aerobios mesófilos es estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) pero no en hongos y levaduras.

**Tabla 11. Ajuste factorial  $2^k$ , de la reducción microbiana vs tiempo y frecuencia de (US); (n=2).**

Factores		Aerobios mesófilos			Hongos y levaduras			
		Media	Efecto	P	Media	Efecto	P	
Tiempo US	10 min	0,6a	0,078	0,216	1,0d	-0,633	0,006	
	20 min	0,7a			0,3e			
Frecuencia	25 KHz	0,8a	-0,192	0,022	0,5e	0,339	0,041	
	40 kHz	0,6b			0,8d			
Interacción: tiempo US x frecuencia		10 min; 40 kHz	0,564	0,000	10 min; 40 kHz	0,278	0,078	
		0,2b			1,0d			
		10 min; 25 kHz			1,0a			0,9d
		20 min; 40 kHz			0,9a			0,6de
		20 min; 25 kHz			20 min; 25 kHz			
		0,5b			0,1e			

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Aerobios mesófilos, (ab); hongos y levaduras (de). ( $\alpha=0,05$ )

Se determinó que el efecto de la frecuencia en la reducción de microorganismos aerobios mesófilos es dependiente del tiempo de aplicación, pero independiente en hongos y levaduras, obteniéndose en 10 minutos de tratamiento las mayores reducciones en ambas frecuencias de ultrasonidos.

Respecto a la reducción de la población de aerobios mesófilos la frecuencia de 25 kHz muestra un mayor efecto que la de 40 kHz pero al ser dependiente del tiempo no se puede concluir que esta frecuencia obtenga mejores resultados ya que es dependiente de si el tratamiento se realiza en 10 o 20 minutos.

Las mayores reducciones (1,0 Log-0,9 UFC/g) respectivamente se obtienen en 10 minutos a una frecuencia de 25 kHz y en 20 minutos a 40 kHz (Figura 11).

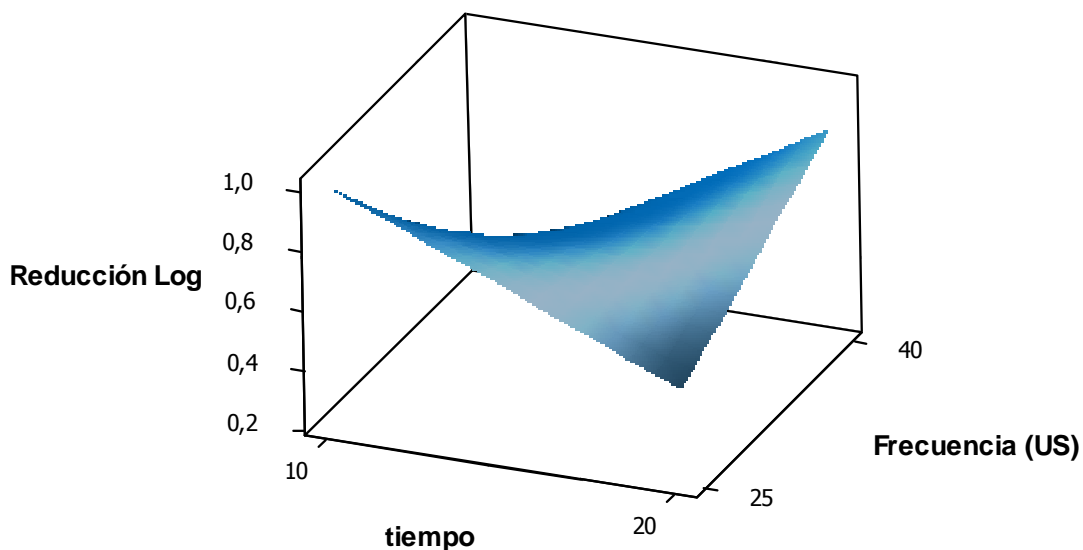


Figura 11. Gráfica de superficie de la reducción de aerobios mesófilos.

En hongos y levaduras la causa de mayor reducción fue el tiempo de tratamiento ya que resultó ser el mayor efecto del ajuste factorial (-0,633).

En la Figura 12 se muestra de forma gráfica las combinaciones de tiempo y frecuencia que obtuvieron mayores reducciones (1,0 Log-0,9 UFC/g) respectivamente, siendo 10 minutos el tiempo de aplicación de ultrasonidos tanto a 40 como a 25 kHz.

Teniendo en cuenta que el efecto químico producido por la generación de radicales libres está relacionado directamente con el aumento de la temperatura, los resultados de los registros de temperatura, relacionan que la frecuencia de 40 kHz presente la misma efectividad que la de 25 kHz, aunque esta genere más cavitación y el equipo de 40 kHz presente mayor incremento de temperatura.

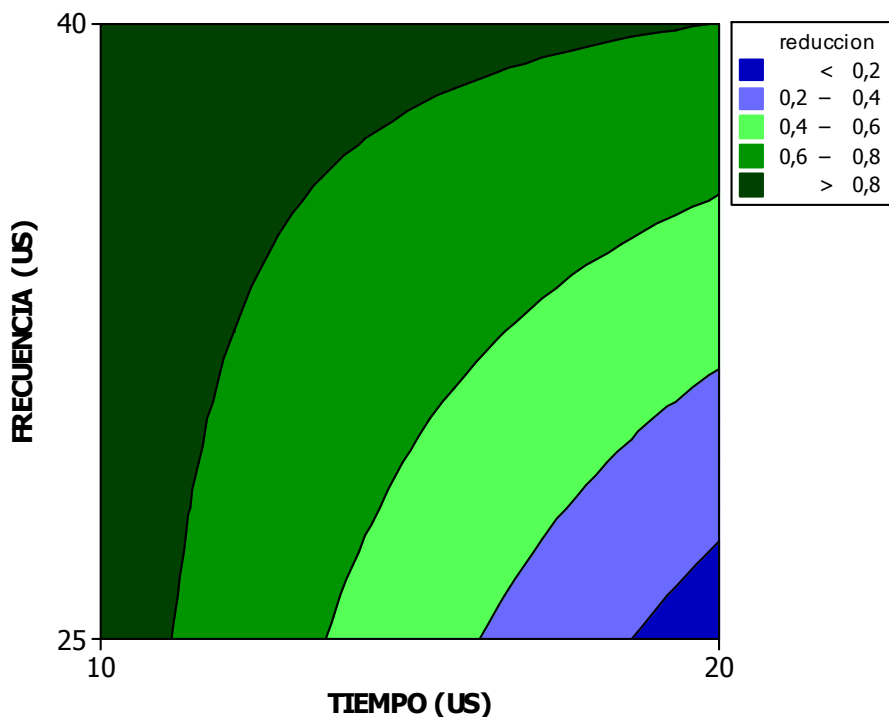


Figura 12. Gráfica de contorno de la reducción de hongos y levaduras

En estudios realizados sobre el efecto de los ultrasonidos en levaduras llegaron a la conclusión que el mecanismo de inactivación de estos microorganismos se basa principalmente en los efectos químicos de los radicales libres (Adekunte *et al.* 2010). De algún modo la relación entre la eficacia de los ultrasonidos para inactivar microorganismos respecto a sus propiedades físico-químicas no está bien definida.

En el estudio de Gao *et al.* 2013, se comprueba como los microorganismos en especial las bacterias son más sensibles de ser inactivadas en la fase exponencial de crecimiento y como el grosor de la pared celular (cápsula) es el factor más importante ya que cuanto más gruesa sea, menor efecto producen los ultrasonidos.

Otras teorías apuntan que las bacterias gram-negativas son más sensibles a la inactivación por ultrasonidos que las bacterias gram-positivas, mientras que otros trabajos afirman que no existe ninguna relación significativa entre el estado gram de las bacterias y la inactivación por ultrasonidos. También se ha relacionado el tamaño y la forma de las bacterias con su susceptibilidad a la inactivación por ultrasonidos siendo esta superior a mayor tamaño, al presentar mayor relación área-superficie.

En resumen sobre la información disponible, hay opiniones mixtas y diferentes sobre el mecanismo de inactivación de los microorganismos mediante ultrasonidos ya que podrían estar implicadas propiedades físicas y biológicas.

En futuros estudios sería recomendable relacionar el grupo de microorganismos presentes en las muestras analizadas respecto a sus características morfológicas y etapa de crecimiento para mejorar la eficacia del tratamiento, ya que en este trabajo no se investigaron los grupos de microorganismos presentes al no ser inoculados.

Los datos existentes de diferentes estudios sobre el efecto del cloro en contacto directo con vegetales para reducir la carga microbiana muestran limitaciones de 1 o 2 reducciones logarítmicas. Comparando los resultados del estudio de Alegria *et al.* 2009, sobre la combinación de tratamientos descontaminantes y ultrasonidos (Tabla 12), se observa que sus resultados son similares a los obtenidos en el presente trabajo, aunque las condiciones de trabajo fueron diferentes.

**Tabla 12. Resultados de (Alegria *et al.* 2009): Tratamientos aplicados en zanahorias y su reducción microbiológica**

Tratamientos	Pre-cortado	Post-cortado	Pre-cortado	Post-cortado
	Aerobios mesófilos Reducción Log UFC/g		Hongos y Levaduras Reducción Log UFC/g	
Ultrasonidos: US (45 kHz, 1 min)	1,3b	0,5a	0,9e	0,5c
Agua clorada (200 ppm cloro libre, 5 min, 5 °C) + US (45 kHz, 1 min)	1,0b	0,9b	0,9e	0,8de
Agua con ozono (1 ppm, 5 min, 5 °C) + US (45 kHz, 1 min)	0,2a	0,4a	0,5c	0,6cd

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ .) Aerobios mesófilos, (abc); hongos y levaduras (de).  
**Fuente:** (Alegria *et al.* 2009).

Muchas investigaciones advierten sobre la problemática de la utilización del cloro en alimentos ya que ha demostrado ser perjudicial para la salud por la formación de subproductos, tales como trihalometanos, cloraminas, halocetonas y ácidos haloacéticos causados por la reacción del cloro residual con la materia orgánica.

Debido a los riesgos que plantea su utilización en la industria alimentaria, así como las normativas existentes sobre la prohibición del uso de compuestos clorados en países europeos (Bilek *et al.*2013), Países Bajos, Suecia y Alemania. La combinación de ultrasonidos con otros procesos no térmicos constituye un enfoque atractivo para mejorar la inactivación microbiana ya que una ventaja importante sobre otros procesos es que los ultrasonidos son una tecnología sostenible (respetuosa con el medio ambiente) y segura ya que no implican riesgos de toxicidad para los consumidores.

### 3.2.6. Efecto del tiempo de aplicación y la frecuencia (US) en el color y firmeza

Tras los datos recopilados de los registros de temperatura se tiene conocimiento de su aumento de forma gradual durante el tratamiento de ultrasonidos. Sin embargo, se requerirían 60 minutos para incrementar aproximadamente 25°C la temperatura corazón de la zanahoria a 40 kHz y 120 minutos a 25 kHz.

El color y la textura instrumental son índices importantes de calidad que influyen en la aceptación del consumidor. Para estudiar los posibles efectos sobre estos atributos se realizó ANOVA de dos factores para comprobar si el tiempo o el tipo de tratamiento produjeron diferencias significativas en la firmeza y el color. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

**Tabla 13. Análisis de la varianza (GLM) respecto al efecto del tiempo y tratamiento utilizado en el color y firmeza de la zanahoria (n=8).**

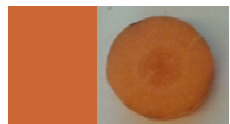



Factores		°H		Textura-Fuerza (N)	
		Media	P	Media	P
tratamiento	baño	61,2a	0,999	11,0a	0,656
	ultrasonidos	61,2a		11,3a	
tiempo	10 min	61,3a	0,806	10,4b	0,042
	20 min	61,1a		11,9b	
Interacción: tiempo US x frecuencia		baño + 10 min	0,768	baño + 10 min	0,146
		61,4a		9,8a	
		baño + 20 min		12,2a	
		61,0a		US + 10 min	
		US + 10 min		11,0a	
		61,1a		US + 20 min	
		US + 20 min		11,5a	
		61,2a			

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

Ni la interacción ni los tratamientos analizados mostraron diferencias significativas entre las muestras por lo que en las condiciones experimentales utilizadas no se afectaron estos parámetros de calidad.

El  $\beta$ -caroteno es muy sensible a la luz y los agentes oxidantes, manifestándose generalmente por un cambio en el color consecuencia de la reacción de pardeamiento. Para analizar los componentes que forman el color individualmente y verificar si alguno de ellos mostraba diferencias por el tratamiento realizado, se realizó ANOVA de un factor (Tabla 14).

Tabla 14. Comparación de las componentes del color de la zanahoria por tratamiento (n=40).

Parámetro	Zanahoria fresca		Baño en agua		40 kHz		25 kHz	
	Media	$\pm ds$	Media	$\pm ds$	Media	$\pm ds$	Media	$\pm Sd$
L*	57,88a	1,65	57,31a	1,39	56,86a	0,61	54,82a	3,14
a*	26,96a	1,74	25,96a	2,28	26,99a	0,78	25,88a	1,85
b*	49,61a	2,36	47,04a	4,00	48,91a	2,32	47,07a	2,71
Croma	56,47a	2,90	53,78a	4,52	55,88a	2,41	53,73a	3,26
Color definido								

Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05)

En la tabla anterior, se muestra el color objetivo obtenido de las coordenadas Cielab calculadas y se acompaña de la foto real de la muestra. Ninguno de los parámetros controlados mostró diferencias significativas respecto la zanahoria fresca, ni tampoco entre muestras lo que confirma que no se vio afectado el color durante el tratamiento con ultrasonidos.

La firmeza o textura instrumental es un atributo de calidad organoléptica de las zanahorias, que durante el procesamiento térmico se ve afectada de forma crítica por las elevadas temperaturas que conllevan la pérdida de turgencia por daños mecánicos en las paredes celulares vegetales.



Las zanahorias procesadas con ultrasonidos respecto las no tratadas y a las lavadas en agua de red, no mostraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) sobre la alteración de la firmeza, como se muestran en la Figura 13.

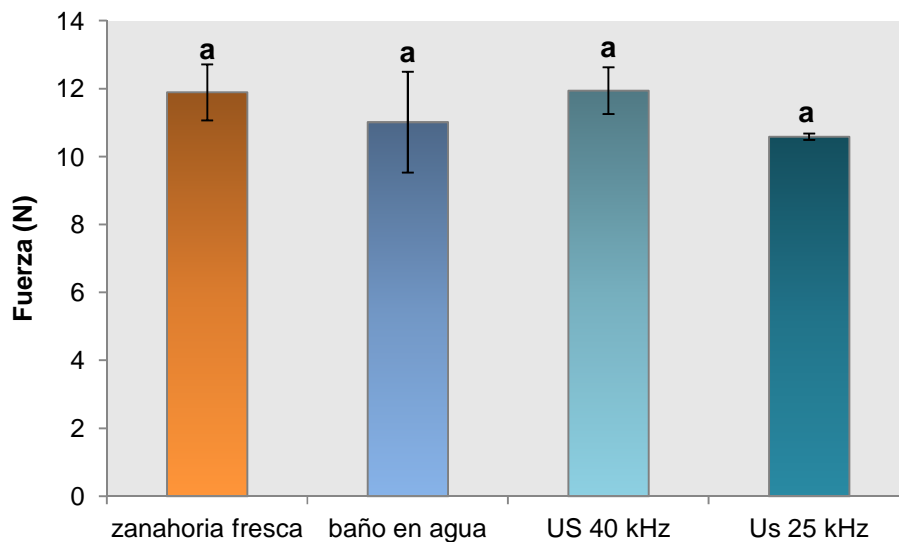


Figura 13. Comparación de la firmeza según el tratamiento (n=40).

La textura depende en gran medida de polímeros pécticos presentes en las paredes celulares que contribuye a la firmeza y la elasticidad de los tejidos vegetales. El enzima pectina metilesterasa (PME) cataliza la eliminación de los esteres metílicos de la pectina. Esta reacción puede desempeñar un papel clave en la desestabilización de la estructura de la pared celular que se produce a temperaturas de procesamiento altas ( $> 80^{\circ}\text{C}$ ) (Rawson *et al.* 2012). Dado que los tratamientos con ultrasonidos alcanzaron temperaturas suaves ( $< 35^{\circ}\text{C}$ ), no se provocó la inactivación de la PME y no originó pérdida de turgencia.

Tras los resultados obtenidos, se puede afirmar que bajo las condiciones experimentales utilizadas de tiempo y frecuencia de ultrasonidos no se disminuyó la firmeza de las zanahorias por el aumento de la temperatura originado por la cavitación.

## 4. CONCLUSIONES

De los resultados experimentales obtenidos se puede concluir que:

- La aplicación de ultrasonidos en la zanahoria cortada tiene un impacto significativo en la reducción microbiológica.
- En las condiciones experimentales utilizadas: tiempo (10 y 20 minutos) y frecuencia de ultrasonidos (25 y 40 kHz) se obtuvo una disminución de la contaminación microbiana inicial de 1 Log UFC/g respecto a la materia prima.
- La reducción de carga microbiana es dependiente del tiempo de aplicación, según la frecuencia de ultrasonidos utilizada en microorganismos aerobios mesófilos pero independiente en hongos y levaduras.
- Las combinaciones que proporcionan mejores resultados son diferentes dependiendo del microorganismo a inhibir (aerobios mesófilos y/o hongos y Levaduras).
- Cuanto menor es la frecuencia (25 kHz) se observa más efectividad en la reducción de microorganismos aerobios mesófilos, se precisa menor tiempo de tratamiento (10 minutos) para obtener mejores resultados. En hongos y levaduras la reducción obtenida en 10 minutos es similar en ambas frecuencias de trabajo.
- En las condiciones experimentales del trabajo, el aumento de temperatura producido por la cavitación, no tuvo repercusión en el color y en la dureza de la zanahoria.

A escala industrial una posible aplicación para aumentar el efecto de la reducción microbiana, sería incluir esta tecnología en los tanques y túneles de lavado empleando diferentes frecuencias de ultrasonido, para reducir la utilización de desinfectantes químicos.

## 5. BIBLIOGRAFIA

Adekunte AO, Tiwari BK, Cullen PJ, Scannell AGM, O'Donnell CP (2010). Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chem* (122):500-507.

Alegria C, Pinheiro J, Gonçalves EM, Fernandes I, Moldão M, Abreu M (2009). Quality attributes of shredded carrot (*Daucus carota* L. cv. Nantes) as affected by alternative decontamination processes to chlorine. *Innovative Food Science & Emerging Technol.* (10):61-69.

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

Bermúdez-Aguirre D y Barbosa-Cánovas, GV (2012). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in pineapple, grape and cranberry juices under pulsed and continuous thermosonication treatments. *Journal of Food Engineering*, 108(3): 383-392

Berrang, ME., Brackett, RE, y Beuchat LR (1989a). Growth of *Aeromonas hydrophila* on fresh vegetables stored under a controlled atmosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* (55): 2176-2171

Bilek SE, Turantaş F (2013). Decontamination efficiency of high power ultrasound in the fruit and vegetable industry, a review. *Int J Food Microbiol* (166):155-162.

Buick, RK y Damoglou, AP (1987). The effect of vacuum packaging on the microbial spoilage and shelf-life of 'ready-to-use' sliced carrots. *J. Sci. Food Agric.* (38): 167-175

Caminiti, IM, Noci, F, Muñoz, A, Whyte, P, Morgan, DJ, Cronin, DA (2011). Impact of selected combinations of non-thermal processing technologies on the quality of an apple and cranberry juice blend. *Food Chemistry*, 124(4):1387-1392.

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

Cruz, R., Vieira, MS y Silva, MC (2007). Modelling kinetics of watercress (*Nasturtium officinale*) colour changes due to heat and thermosonication treatments. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, (2): 244-252.

Day L, Xu M, Oiseth SK, Mawson R (2012). Improved mechanical properties of retorted carrots by ultrasonic pre-treatments. *Ultrason Sonochem* (19):427-434.

Gamboa-Santos J, Cristina Soria A, Pérez-Mateos M, Carrasco JA, Montilla A, Villamiel M (2013). Vitamin C content and sensorial properties of dehydrated carrots blanched conventionally or by ultrasound. *Food Chem* (136):782-788.



Gao S, Lewis GD, Ashokkumar M, Hemar Y (2013) Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 1. Effect of growth phase and capsule properties of the bacteria. *Ultrason Sonochem* (21):446-453.

Gao S, Lewis GD, Ashokkumar M, Hemar Y (2013) Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 2. A simple model for the inactivation mechanism. *Ultrason Sonochem* (21): 454-460.

Geeson, J.D. (1979). The fungal and bacterial flora of stored white cabbage. *J. Appl. Bacteriol.* (46): 189-193

Golden, DA, Heaton, EK y Beuchat, LR (1987) Effect of chemical treatments on microbiological, sensory and physical qualities of individually shrink-wrapped produce. *J. Food Prot.* (50): 673-680

Gómez-López, VM, Orsolani, L, Martínez-Yépez, A, y Tapia, MS (2010). Microbiological and sensory quality of sonicated calcium-added orange juice. *Food Science and Techn.* (5): 808-813.

Gould GW (1996) Methods for preservation and extension of shelf life. *Int J Food Microbiol* (33):51-64.

Herrero A, de Ávila MR (2006). Innovaciones en el proceso de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Revista de medicina* (50):71-74.

Lee, J.W., Feng, H, y Kushad, M (2005). Effect of Manothermosonication (MTS) on quality of orange juice. Presented at AIChE Annual Meeting, (Cincinnati).

Patist A, Bates D (2008) Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* (9):147-154.

Pingret D, Fabiano-Tixier A, Chemat F (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food control* (31):593-606.

Piyasena P, Mohareb E, McKellar RC (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *Int J Food Microbiol* (87):207-216.

Ramos B, Miller FA, Brandão TRS, Teixeira P, Silva CLM (2013). Fresh fruits and vegetables: An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science & Emerging Techn* (19):215-223.

Rawson A, Tiwari BK, Tuohy MG, O'Donnell CP, Brunton N (2011). Effect of ultrasound and blanching pretreatments on polyacetylene and carotenoid content of hot air and freeze dried carrot discs. *Ultrason Sonochem* (18):1172-1179.

Rawson A, Tiwari BK, Tuohy M, Brunton N (2012). Impact of frozen storage on polyacetylene content, texture and colour in carrots disks. *J Food Eng* (108):563-569.



Sagong H, Cheon H, Kim S, Lee S, Park K, Chung M, Choi Y, Kang D (2013). Combined effects of ultrasound and surfactants to reduce *Bacillus cereus* spores on lettuce and carrots. *Int J Food Microbiol* (160):367-372.

Senter, S.D, Cox, N.A., Bailey J.S y Meredith F.I. (1984). Effects of harvesting, transportation, and cryogenic processing on the microflora of southern peas. *J. Food Sci.* (49): 1410-1411, 1437.

Soria AC, Villamiel M (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends Food Sci Technol* (21):323-331.

Tournas VH (2005). Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. *Int J Food Microbiol* (99):71-77.

Ugarte-Romero, E., Feng, H., Martin, S. E., Cadwallader, K. R., & Robinson, S. J. (2006). Inactivation of *Escherichia coli* with power ultrasound in apple cider. *Journal of Food Science*, 71(2): E102-E108.

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

Webb, TA. y Mundt, JO (1978). Molds on vegetables at the time of harvest. *Appl. Environ. Microbiol.* (35):655-658

Wiley RC (1997). *Frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas*. Editorial Acirbia, Zaragoza. ISBN: 84-200-0831-1.

## 5.1. Recursos electrónicos

USDA Agricultural Research Service United States Department of Agriculture. National Nutrient Database. Disponible en:<<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>> [Consulta 31 octubre 2013].

Sociedad Española de Hipertensión Liga Española para la lucha contra la Hipertensión arterial. Tabla de alimentos. Disponible en:<<http://www.seh-lelha.org/>> [Consulta 8 de octubre 2013]

EasyRGB - The inimitable RGB and COLOR. Disponible en:< <http://www.easyrgb.com>> [Consulta 3 septiembre 2013]

