

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE
VALÈNCIA**

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR
D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL
MEDI NATURAL**



**PUESTA A PUNTO DE UNA
METODOLOGÍA PARA LA
HIGIENIZACIÓN DE LECHUGA
ASISTIDA MEDIANTE ULTRASONIDOS**

**TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERIA
AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL**

ALUMNO/A: Augusto Beléndez Pascual

TUTOR/A: Juan Andrés Cárcel Carrión y José Javier Benedito Fort

Curso Académico: 2015/2016

VALENCIA, JULIO 2016



Título: Puesta a punto de una metodología para la higienización de lechuga asistida mediante ultrasonidos.

Resumen: La desinfección es uno de los procesos de mayor importancia en la industria de los productos vegetales de IV Gama, con la que se pretende reducir la carga microbiana del producto. Habitualmente se realiza mediante la aplicación de agua a la que se adiciona un compuesto desinfectante, normalmente hipoclorito sódico. Las cantidades del mismo deben ser suficientes para asegurar la efectividad del proceso, pero, a su vez, las mínimas para no resultar perjudiciales para la salud del consumidor, no encarecer el proceso y reducir la contaminación del agua de lavado. Por otro lado, los ultrasonidos de potencia se han utilizado para la intensificación de procesos de inactivación microbiana y para la higienización. En este sentido, el principal objetivo de este trabajo fue evaluar la efectividad de la aplicación de ultrasonidos de potencia en la higienización de lechuga fresca cortada y su posible influencia en la reducción del uso de hipoclorito sódico. Los resultados obtenidos indicaron una mayor efectividad de los ultrasonidos en el lavado de las muestras y una mayor efectividad del hipoclorito sódico en la inactivación. Por lo tanto, una combinación de ambos métodos permitiría la reducción de la concentración de hipoclorito en la disolución de tratamiento con las consiguientes ventajas que esto supone.

Palabras clave: IV Gama, hipoclorito sódico, ultrasonidos, lechuga, desinfección, *E. coli*

Title: Development of a methodology for lettuce ultrasonically assisted sanitization.

Abstract: Disinfection is one of the most important processes in the industry of fresh cut vegetable products, which is applied to reduce the microbial load of the product. Typically, the procedure is carried out by the application of water in which a disinfectant such as sodium hypochlorite is added. The amount of this compound must be enough to ensure the effectivity of the process but at the same time the minimum to avoid damaging the consumer's health, to reduce the process cost and to reduce the wastewater contamination. Furthermore, high power ultrasounds have been used both to intensify the process of microbial inactivation and for sanitation purposes. In this regard, this work aims to evaluate the effectiveness of the high power ultrasounds application in the sanitation of fresh cut lettuce and its potential influence in the reduction of the use of sodium hypochlorite. The results obtained show a higher effectiveness of ultrasound in cleaning the samples but a higher effectiveness of sodium hypochlorite for microbial inactivation. In such a way, the combination of both methods would allow the reduction of the concentration of hypochlorite in the treatment solution, with the subsequent advantages that it involves.

Key words: fresh cut, sodium hypochlorite, ultrasounds, lettuce, disinfection, *E. coli*

Alumno: Augusto Beléndez Pascual

Tutor: D. Juan Andrés Cárcel Carrión

Cotutor: D. José Javier Benedito Fort

Valencia, Julio de 2016

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. IV GAMA EN LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA	1
1.2. CARACTERÍSTICAS DE LA LECHUGA.....	3
1.3. MÉTODOS DE DESINFECCIÓN DE FRUTAS Y HORTALIZAS, PROBLEMAS ASOCIADOS	5
1.4. ULTRASONIDOS DE POTENCIA: APLICACIONES EN LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA	7
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. MATERIA PRIMA	11
3.2. MICROORGANISMO CULTIVADO	11
3.2.1. PREPARACIÓN DEL CULTIVO	11
3.2.2. INOCULACIÓN DE <i>E. COLI</i>	13
3.3. DESINFECCIÓN DE LA LECHUGA	13
3.3.1. MONTAJE EXPERIMENTAL	13
3.3.2. METODOLOGÍA DE DESINFECCIÓN	16
3.4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	18
3.4.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	18
3.4.2. ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO.....	18
3.4.3. MODELOS MATEMÁTICOS	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	20
4.1. PUESTA A PUNTO DE LA METODOLOGÍA DE SIEMBRA	20
4.2. EFECTO DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS SOBRE LA REDUCCIÓN MICROBIANA	20
4.3. ANÁLISIS DEL AGUA DE LAVADO	23
4.4. MODELIZACIÓN MATEMÁTICA DE LA INACTIVACIÓN MICROBIANA	25
5. CONCLUSIONES	30
6. BIBLIOGRAFÍA	31

ÍNDICE DE FIGURAS

- **Figura 1.** Diagrama de elaboración de productos de IV Gama.
- **Figura 2.** Consumo de productos de IV Gama en España período 2005-2012.
- **Figura 3.** Porcentaje de producción de IV Gama por categorías en España.
- **Figura 4.** Reacción química del hipoclorito sódico en el agua.
- **Figura 5.** Propagación de una onda acústica.
- **Figura 6.** Detalle de la obtención de muestras de lechuga cortada de 3x3 cm con un cuchillo de acero inoxidable estéril.
- **Figura 7.** Matraces erlenmeyer con LB Broth esterilizados y micropipeta.
- **Figura 8.** Centrífuga con tubos.
- **Figura 9.** Generador de ultrasonidos.
- **Figura 10.** Baño de ultrasonidos.
- **Figura 11.** Detalle del intercambiador y depósito pulmón del sistema de refrigeración del baño de ultrasonidos.
- **Figura 12.** Termómetro digital.
- **Figura 13.** Equipo de desinfección ultrasónica. A) Enfriador. B) Válvula. C) Intercambiador de calor. D) Bomba. E) Depósito de agua glicolada. F) Baño de ultrasonidos. G) Soporte de muestras. H) Termopar I) Muestras de lechuga. J) Transductores. K) Termómetro digital. L) Generador de ultrasonidos.
- **Figura 14:** Disposición de muestras de lechuga en el baño de ultrasonidos.
- **Figura 15.** Valores experimentales del contenido de microorganismos medio y su desviación estándar a diferentes tiempos de tratamiento para los métodos de desinfección considerados.
- **Figura 16.** Valores experimentales del análisis del agua de lavado de los diferentes métodos.
- **Figura 17.** Cinéticas de inactivación experimental y predichas por los distintos modelos para los tratamientos de desinfección con una disolución de NaClO (200 ppm).
- **Figura 18.** Cinéticas de inactivación experimental y predichas por los distintos modelos para los tratamientos de desinfección con HPU.
- **Figura 19.** Cinéticas de inactivación experimental y predichas por los distintos modelos para los tratamientos de desinfección combinando HPU con NaClO (100 ppm).

- **Figura 20.** Cinéticas de inactivación experimental y predichas por los distintos modelos para los tratamientos de desinfección combinando HPU con NaClO (200 ppm).

ÍNDICE DE TABLAS

- **Tabla 1.** Composición nutricional en 100 g de la parte comestible de distintos tipos de lechugas.
- **Tabla 2.** Recuentos obtenidos en experiencias de desinfección con disolución de hipoclorito sódico (200 ppm).
- **Tabla 3.** Recuentos obtenidos en experiencias de desinfección empleando únicamente ultrasonidos.
- **Tabla 4.** Recuentos obtenidos en experiencias de desinfección combinando ultrasonidos con disolución de hipoclorito sódico (100 ppm).
- **Tabla 5.** Recuentos obtenidos en experiencias de desinfección combinando ultrasonidos con disolución de hipoclorito sódico (200 ppm).
- **Tabla 6.** Parámetros y estadísticos obtenidos del ajuste del modelo lineal a los valores experimentales de inactivación microbiana.
- **Tabla 7.** Parámetros y estadísticos obtenidos del ajuste del modelo de Weibull a los valores experimentales de inactivación microbiana.
- **Tabla 8.** Parámetros y estadísticos obtenidos del ajuste de los modelos de Peleg Tipo A y Tipo B a los valores experimentales de inactivación microbiana.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. IV GAMA EN LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA

La industria agroalimentaria es uno de los sectores más importantes dentro del complejo industrial europeo, constituyendo el 14.6 % del total de ventas de la industria europea (FOOD DRINK EUROPE, 2013).

En nuestro país, la industria de alimentación y bebidas española es también la principal rama industrial, representando el 20.5 % de las ventas netas de producto. Por otra parte, la industria alimentaria de España ocupa el quinto puesto a nivel europeo en ventas, superada sólo por Alemania, Francia, Italia y Reino Unido (MAGRAMA, 2016).

En la década de los 80 llegan a Europa los productos de IV Gama, vegetales procesados en fresco que dependen exclusivamente de la cadena de frío para conservar sus cualidades y condiciones de consumo. De este modo la industria agroalimentaria aprovecha la horticultura para sacar al mercado productos frescos mínimamente tratados (Alonso, 2007).

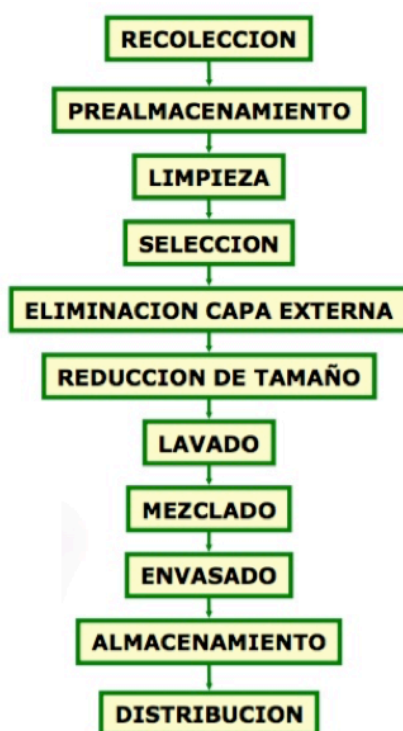


Figura 1 | *Diagrama de elaboración de productos de IV Gama.*

Fuente: Imagen obtenida de Ortolá, 2016.

Sin embargo, los productos de IV Gama nacieron durante los años 70 en América (Aguerri, 2014). Una de las principales causas de su aparición es la falta de tiempo de los trabajadores para la preparación de alimentos. Por ello la búsqueda de alimentos de rápida elaboración o listos para su consumo favoreció al desarrollo de estos productos.

Otro de los motivos que benefició la aparición de estos productos es el cada vez mayor interés de los consumidores por alimentos naturales que contribuyan a llevar una dieta sana. Esto fue un punto a favor para la creciente demanda de los productos de IV Gama, ya que se caracterizan por ser frescos y saludables gracias a que conservan las propiedades de las hortalizas y frutas en

fresco y carecen de aditivos añadidos, puesto que constituyen productos que sólo se han sometido a procesos de pelado, cortado y lavado (AINIA DISAL, 2016, Figura 1).

Podemos distinguir más gamas aparte de la IV Gama:

- I Gama: Frutas y hortalizas frescas muy pereceras que han sido deshidratadas o encurtidas para su conservación (Pefaur, 2014).
- II Gama: Conservas vegetales sometidas a un tratamiento para alargar su vida útil.
- III Gama: Frutas y hortalizas congeladas que requieren de una cocción para su consumo.
- V Gama: Productos cocinados y ultracongelados que precisan de un calentamiento.

Si comparamos con otras gamas de alimentos, la IV Gama comprende productos frescos y naturales de rápida elaboración, lo que puede considerarse una ventaja frente al resto de gamas (Aguerri, 2014). Por otro lado, gracias a su atractiva presentación y su buena relación producto natural-vida útil, la IV gama se presenta como una alternativa a los productos vegetales frescos (Pefaur, 2014).

La vida útil de este tipo de productos se encuentra en torno a 10 días, valor relativamente bueno teniendo en cuenta que el producto no se somete a ningún tratamiento de esterilización. No obstante, uno de los mayores factores limitantes de los productos de IV Gama es el aumento metabólico del mismo. Así, al ser un producto fresco cortado, la tasa respiratoria aumenta debido al corte del tejido, lo que reduce su vida útil si no se conserva en un ambiente adecuado (Pefaur, 2014).

Otro de los aspectos limitantes de los productos de IV Gama es la carga bacteriológica presente en el producto. Debido a que los productos de IV Gama no reciben ningún tratamiento de esterilización, la etapa de lavado va a determinar en gran medida la calidad del producto final, ya que la función de esta fase es la de la eliminación de la mayor cantidad de carga microbiana. No realizar correctamente esta etapa puede perjudicar la salud del consumidor y acortar la vida útil del producto.

El método de lavado más extendido es el empleo de agua clorada, actuando como desinfectante, y a temperatura inferior a 4°C, evitando así que el producto se caliente. Posterior al tratamiento es necesario un aclarado para eliminar los restos de agua clorada y de suciedad que queden presentes en el producto (Aguerri, 2014).

Respecto al mercado de IV Gama, hay una diferencia significativa entre las ventas en Estados Unidos respecto a Europa. Concretamente, el país americano encabeza este sector con un 85% de ventas frente al 7% de ventas europeas. Esto se debe a la gran variedad de productos de IV Gama presentes en el mercado, mientras que este segmento está todavía poco desarrollado en Europa (AINIA DISAL, 2016).

Dentro del mercado europeo, Inglaterra es el país líder en la industria de la IV Gama, con un consumo de 30 kg por persona al año. En España el consumo de productos de IV Gama ha experimentado un notable aumento en los últimos años (Figura 2). Sin embargo, su valor es de 2.2 kg por persona al año, muy pequeño comparado con otros países europeos como Inglaterra o Francia (Aguerri, 2014).

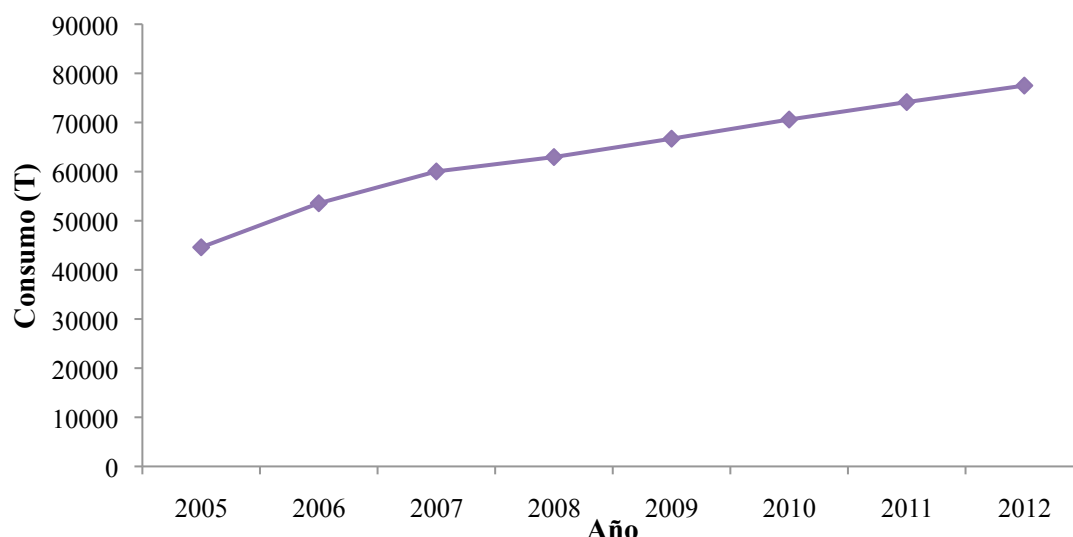


Figura 2| Consumo de productos de IV Gama en España periodo 2005-2012.

Fuente: Elaboración propia a partir de la imagen obtenida de Aguerri, 2014.

En nuestro país, dentro de las hortalizas empleadas para la obtención de productos de IV Gama (Figura 3), destaca la lechuga para ensaladas como el cultivo predominante, comprendiendo el 60% de la producción. (Aguerri, 2014).

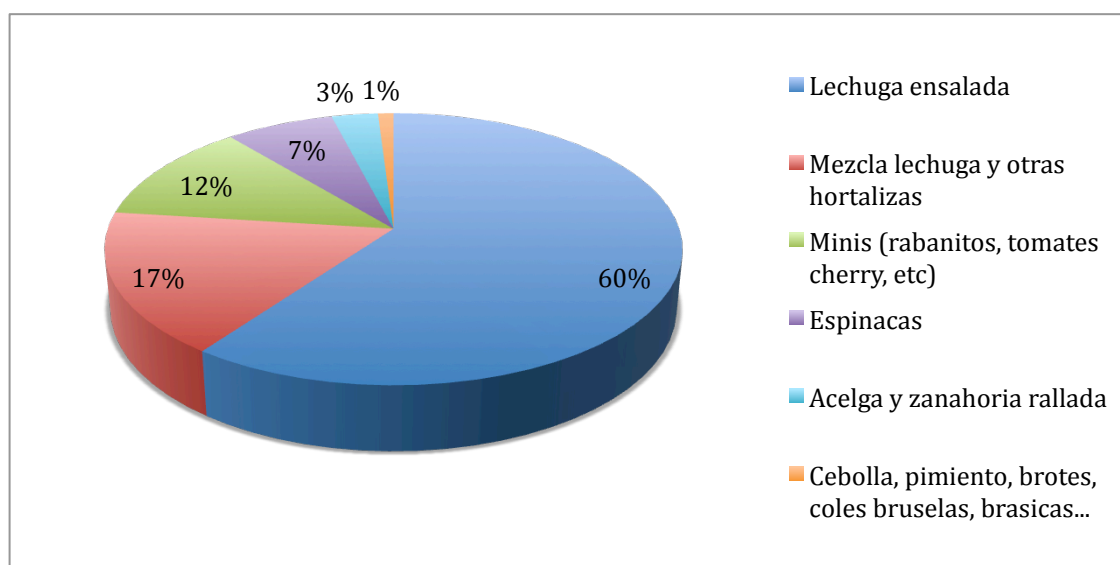


Figura 3| Porcentaje de producción de IV Gama por categorías en España.

Fuente: Elaboración propia a partir de la imagen obtenida de Aguerri, 2014.

1.2. CARACTERÍSTICAS DE LA LECHUGA

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es una planta anual consumida por sus hojas (a excepción de la variedad *augustana*) que pertenece a la familia *Asteraceae* y al género *Lactuca*. Está compuesta por un sistema radicular profundo y poco ramificado. Sus hojas se disponen inicialmente en roseta y posteriormente forman un cogollo cuya consistencia depende de la variedad. Respecto a la forma de las mismas, pueden ser redondeadas, lanceoladas o casi espatuladas, de consistencia

fibrosa o tierna y cuyo borde de los limbos puede ser liso, ondulado o aserrado. Se trata de una planta autógena cuyas semillas están provistas de un vilano plumoso (Maroto, 1999).

Dentro de la especie *Lactuca sativa* L. se distinguen cuatro variedades botánicas:

- *Lactuca sativa* var. *longifolia* Lam.: Cultivares que no forman un verdadero cogollo con sus hojas. Estas poseen una forma generalmente oblonga.
- *Lactuca sativa* var. *capitata* L.: Sus hojas forman un cogollo apretado, las cuales poseen una forma orbicular.
- *Lactuca sativa* var. *inybacea* Hort.: Provistas de hojas sueltas y dispersas
- *Lactuca sativa* var. *augustana* Irish.: Variedad aprovechada por sus tallos.

Las variedades *longifolia* y *capitata* son las de cultivo más extendido en el mundo occidental (Maroto, 1999).

Respecto a los tipos de lechuga más consumidos en España, podríamos destacar los tres siguientes:

- Lechuga romana (var. *longifolia*): Es el tipo de lechuga más consumido en el mercado nacional. Esta provista de hojas alargadas, con bordes enteros y nervio central muy ancho, además no forma un verdadero cogollo.
- Lechuga iceberg (var. *capitata*): Su cultivo es típico de las provincias de Murcia y Alicante. Posee hoja redonda y crujiente, y forma un cogollo compacto.
- Lechuga trocadero (var. *capitata*): Es acogollada, pero de hoja mantecosa y no crujiente. Como no forma un cogollo verdadero, en algunas fuentes se incluye en la var. *crispa* L. (Gómez, 2001).

La lechuga se cultiva en zonas templadas de todo el mundo, tanto al aire libre como en invernaderos, lo que facilita su disponibilidad para el consumo durante todo el año (MAGRAMA, 2013). En España es el tercer cultivo hortícola que más superficie emplea para su cultivo (33868 ha) por detrás de la patata y el tomate (MAGRAMA, 2014). Predomina la siembra en semilleros durante un período entre 4 y 6 semanas seguido de trasplante del cultivo en campo. En él, se disponen en líneas simples o dobles, dejando una separación entre plantas de unos 30 o 40 cm (López *et. al*, 1999).

En lo que concierne a la composición nutricional, la lechuga es un alimento constituido casi en su totalidad por agua, con un contenido en proteínas, grasas e hidratos de carbono no muy elevado (MAGRAMA, 2013). Como se muestra la Tabla 1 (Maroto, 1999), las variedades de lechuga iceberg son las que mayor contenido en agua poseen. Por otro lado, las variedades romanas poseen mayor cantidad de proteínas, grasas e hidratos de carbono totales.

Debido al elevado contenido en agua, la lechuga es un alimento que no aporta demasiadas calorías, siendo las variedades iceberg las lechugas menos calóricas. En lo que respecta al contenido en minerales, la lechuga contiene principalmente calcio, hierro, fósforo, potasio y sodio, aunque la cantidad total de minerales no es muy relevante. En Tabla 1, se puede apreciar que el nutriente más abundante es el potasio, encontrándose en menor cantidad en las variedades iceberg. Por otro lado, el contenido en sodio es muy similar en las tres variedades comparadas.

La lechuga contiene flavonoides que pueden resultar muy beneficiosos para la salud del consumidor debido a su actividad antioxidante, antitrombótica y anticarcinogénica (MAGRAMA, 2013).

Tabla 1 | Composición nutricional en 100 g de la parte comestible de distintos tipos de lechuga.

Fuente: Elaboración propia a partir de Maroto, 1999.

Componentes	Romanas	Iceberg	Trocadero
Agua (g)	94.0	95.5	95.1
Proteínas (g)	1.3	0.9	1.2
Grasas (g)	0.3	0.1	0.2
Hidratos de carbono totales (g)	3.5	2.9	2.5
Fibra (g)	0.7	0.5	0.5
Cenizas (g)	0.9	0.9	1.0
Calcio (mg)	68	20	35
Hierro (mg)	1.4	0.5	2.0
Fósforo (mg)	25	22	26
Potasio (mg)	264	175	264
Sodio (mg)	9	9	9
Vitamina A (UI)	1.900	330	970
Tiamina (mg)	0.05	0.06	0.06
Riboflavina (mg)	0.08	0.06	0.06
Niacina (mg)	0.4	0.3	0.3
Vitamina C (mg ac. Ascórbico)	24	5	9
Valor energético (kcal)	18	13	14

1.3. MÉTODOS DE DESINFECCIÓN DE FRUTAS Y HORTALIZAS. PROBLEMAS ASOCIADOS

La industria agroalimentaria tiene como objetivo principal la oferta de productos saludables e inocuos mediante técnicas que no sean perjudiciales para el medio ambiente (Castillo, 2015). Una de las preocupaciones más importantes para la industria agroalimentaria es la contaminación microbiana. En el caso de frutas y hortalizas, y especialmente para los productos postcosecha cortados como el caso de la lechuga fresca para IV Gama. Esto resulta especialmente importante en las áreas cortadas ya que facilitan la colonización de los tejidos por los agentes contaminantes (Janisiewicz *et al.*, 1999).

Entre las fuentes de contaminación más comunes en las hortalizas durante su cultivo se encuentra el suelo, el estiércol, el agua de riego y los animales. A esto se une la contaminación que puede aparecer durante la cosecha, manipulación, procesado y transporte del producto (Johannessen *et al.*, 2000). Entre los agentes patógenos más comunes presentes en las hortalizas y frutas frescas se pueden citar a *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Clostridium botulinum* entre otros (FAO, 2003). La presencia de estos agentes

puede ocasionar en el consumidor una serie de enfermedades muy variadas dependiendo del microorganismo infeccioso, incluyendo desde vómitos, náuseas y fiebre (DEPARTMENT OF HEALTH, 2003), hasta gastroenteritis (Salyers, 2002), infecciones del tracto urinario, neumonía (MEDSCAPE, 2016) e incluso parálisis (BOTULISMO.ORG, 2016).

Con el objetivo de reducir la carga microbiana, los productos postcosecha suelen recibir diferentes tratamientos de desinfección. Entre ellos destacan tratamientos que incluyen el uso de ácidos orgánicos o diversos agentes químicos (Chaveste, 2006). Sin embargo, en el momento actual, el método más extendido para la desinfección de los productos de IV Gama es el lavado con agua clorada, siendo el hipoclorito sódico (NaClO) el agente desinfectante más empleado en la industria (Lee y Baek, 2008).

El hipoclorito sódico es un derivado del cloro de color claro (entre verde y amarillo) y de olor característico. Sus propiedades desinfectantes son función de una serie de factores (FAO, 2016):

- La concentración de cloro libre ($50\text{-}200\text{ mgL}^{-1}$ para productos frescos cortados) (López-Gálvez *et al.*, 2010).
- La temperatura (inferior a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$) y el tiempo de contacto. No es conveniente realizar tratamientos excesivamente largos (no superior a 30 minutos) debido al efecto corrosivo.
- La presencia de materia orgánica consume cloro libre, reduciendo así su capacidad desinfectante.
- El pH durante el almacenamiento debe oscilar entre 9 y 11 para reducir la descomposición.

Una de las características a tener en cuenta es que el hipoclorito de sodio es un agente desinfectante inestable, que se evapora a una velocidad media de 0.75 gL^{-1} de cloro por día. El contacto con ácidos, la luz solar, algunos metales y gases corrosivos también favorecen su eliminación (CESVBC, 2016).

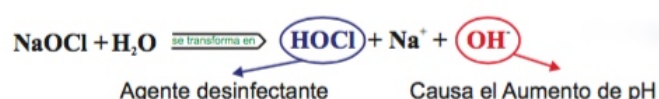


Figura 4 | Reacción química del hipoclorito sódico en el agua.

Fuente: Imagen obtenida de CESVBC, 2016.

A pesar de ser el desinfectante más empleado en la industria alimentaria, el hipoclorito sódico posee una eficacia limitada y forma subproductos tóxicos en presencia de materia orgánica, pudiendo ser perjudicial para el consumidor (Ölmez y Kretzschmar, 2009). Así mismo, el hipoclorito sódico es una sustancia corrosiva para los ojos, la piel y el tracto respiratorio, corrosiva por ingestión, pudiendo incluso originar edema pulmonar si se produce su inhalación (INSHT, 1994).

Otro de los agentes químicos muy utilizados para la desinfección de frutas y hortalizas cortadas es el dióxido de cloro. Este desinfectante no reacciona tanto como el hipoclorito con la materia orgánica y, además, tiene un mayor poder oxidante que las sales de hipoclorito. No obstante, es un compuesto altamente inestable. Uno de los grandes inconvenientes de esta sustancia química

es el hecho de ser explosivo a concentraciones superiores al 10%, lo que imposibilita su traslado en forma concentrada (Garmendia y Vero, 2006).

Además de los compuestos clorados, el sector de la IV Gama dispone de otros agentes desinfectantes como el peróxido de hidrógeno o el ozono. En el caso del peróxido de hidrógeno, su empleo está limitado debido a su capacidad para alterar el color de los alimentos, que limita la aceptación del consumidor. Respecto al ozono, a pesar de ser una sustancia efectiva a bajas concentraciones, puede provocar efectos tóxicos para los consumidores, además del deterioro de propiedades organolépticas del producto como el color o el sabor (Parish, 2003).

A todos los inconvenientes sobre estos agentes desinfectantes mencionados anteriormente, se debe sumar que algunos de ellos pueden ser corrosivos en ciertos equipos y contaminantes para el medio ambiente (Parish, 2003). Por tanto, actualmente es de gran interés la búsqueda de métodos alternativos de desinfección, que reduzcan o prescindan del uso de sustancias químicas (Ölmez y Kretschmar, 2009).

1.4. ULTRASONIDOS DE POTENCIA: APLICACIONES EN LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA

Los ultrasonidos son ondas mecánicas que requieren de un medio para propagarse, cuya frecuencia es superior al límite perceptible por el oído humano (20 kHz) (Mulet *et al.*, 1999).

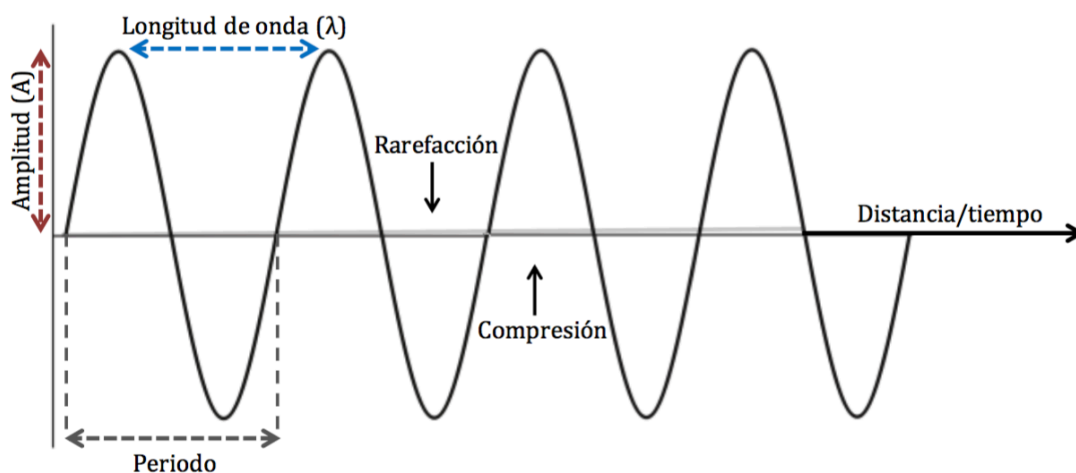


Figura 5 | Propagación de una onda acústica.

Fuente: Imagen obtenida de Castillo, 2015.

Las ondas ultrasónicas se caracterizan por una serie de parámetros: frecuencia, longitud de onda, amplitud, velocidad acústica, intensidad acústica, presión acústica, potencia acústica, densidad de energía, impedancia acústica y atenuación (Castillo, 2015).

En función de la frecuencia y la intensidad, los ultrasonidos se pueden clasificar en ultrasonidos de potencia o alta intensidad (HPU) y en ultrasonidos de señal o baja intensidad (LPU). Los HPU comprenden frecuencias que oscilan entre 20 y 100 kHz e intensidades superiores a 1 Wcm^{-1} . Por otro lado, los LPU presentan frecuencias superiores a los HPU ($10^2 - 10^3 \text{ kHz}$) e intensidades menores ($>1 \text{ Wcm}^{-1}$) (Mulet *et al.*, 1999).

En la industria alimentaria, la aplicación de ultrasonidos de potencia se centra principalmente en la intensificación de procesos relacionados con la transferencia de materia o de calor (Cárcel *et al.*, 2012). En cuanto a los ultrasonidos de señal, son empleados para la detección de defectos en piezas metálicas, la medición de distancias o el diagnóstico médico (Mulet *et al.*, 1999). En el campo alimentario también tienen numerosas aplicaciones, como por ejemplo para el control del salado de productos cárnicos (Díaz, 2014).

Debido a la facilidad de propagación de estas ondas en medio líquido, los HPU suelen aplicarse en sistemas líquido-líquido y líquido-sólido (Mulet *et al.*, 2003). La difusión de la onda ultrasónica de alta intensidad a través de un medio líquido como el agua genera un fenómeno llamado cavitación. Éste consiste en la formación de micro burbujas que sufren una implosión. Esto se debe a que cuando los ultrasonidos atraviesan un medio provocan ciclos de compresión (alta presión) y rarefacción (baja presión). Si durante la fase de rarefacción la energía ultrasónica supera un nivel determinado, las fuerzas de atracción que unen a las moléculas puede romperse, pudiendo formarse micro burbujas debido a núcleos de gas presentes (Soria y Villamiel, 2010).

Se puede distinguir entre cavitación estable y transitoria dependiendo de la naturaleza de las burbujas formadas (Cárcel *et al.*, 2012). En el primer caso, las micro burbujas permanecen estables en las oscilaciones de los ciclos acústicos, aumentando y disminuyendo su tamaño de manera regular. De esta manera, pueden producir microcorrientes en el medio líquido. Respecto a la cavitación transitoria, las micro-burbujas aumentan su tamaño en cada oscilación y cuando alcanzan un tamaño crítico sufren una implosión. Esto produce fuerzas de corte y turbulencia muy importantes en las zonas de cavitación (Castillo, 2015).

Si la implosión de las micro burbujas se produce cerca de la superficie de un sólido, es asimétrica, y da lugar a un “microjet”, que impacta sobre la superficie del sólido. Esto favorece el transporte de calor y de materia entre el sólido y el líquido (Castillo, 2015).

Entre las diferentes aplicaciones de los HPU en la industria agroalimentaria, destaca la conservación de alimentos (Gómez-Díaz y López-Malo, 2009), no obstante, se deben mencionar la intensificación de diversos procesos como:

- Cocción de alimentos: Permitiendo reducir el tiempo de tratamiento obteniéndose productos más uniformes (Han y Baik, 2006).
- Extracción: Los ultrasonidos rompen la pared celular de las plantas, facilitando la penetración del solvente para la extracción de solutos en plantas y semillas (Ahmad-Qasem *et al.*, 2013).
- Deshidratación e impregnación: Aumentando la difusividad del agua, mejorando el rendimiento de deshidratación e impregnación de sólidos solubles (Cárcel *et al.*, 2007).
- Homogenización y mezclado de emulsiones: Por medio del fenómeno de cavitación. (Soria y Villamiel, 2010).
- Liofilización: Permitiendo una mejor salida de agua del producto (García-Pérez *et al.*, 2012).
- Inactivación microbiana y enzimática: Los ultrasonidos de potencia ocasionan una ruptura de las membranas celulares de los microorganismos, facilitando la extracción de

sus componentes (Piyasena *et al.*, 2003). Por otra parte, Yuting *et al.* (2013) estudiaron la aplicación de ultrasonidos de potencia como una alternativa para la conservación de productos postcosecha, con el fin aplicar una dosis menor de agentes químicos para la higienización de los mismos.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo fue determinar la viabilidad del uso de los ultrasonidos de potencia como método para la mejora de la higienización de productos postcosecha. Para conseguir este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Determinar la efectividad del hipoclorito de sodio en disolución para la desinfección de lechuga fresca cortada.
- Determinar la efectividad de los ultrasonidos para la desinfección de lechuga fresca cortada.
- Comprobar la eficacia de los ultrasonidos de potencia para la intensificación de la desinfección en combinación con hipoclorito sódico.
- Determinar la posibilidad de reducir el tiempo de desinfección, tanto empleando únicamente ultrasonidos o hipoclorito como la combinación de ambos métodos.
- Modelizar las cinéticas de inactivación microbiana obtenidas mediante la utilización de diferentes modelos matemáticos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIA PRIMA

Las experiencias de desinfección se realizaron con hojas de Lechuga romana fresca (*Lactuca sativa* var. *longifolia*). Las piezas de lechuga se adquirieron en un supermercado de Valencia, España, y se conservaron durante un día a 4°C. Posteriormente, se eliminaron y se desecharon las hojas exteriores. Las hojas internas se cortaron en muestras cuadradas (3 x 3 cm) con un cuchillo de acero inoxidable estéril (Figura 6). Las muestras de lechuga recién cortadas se mezclaron bien para obtener una muestra homogénea y se lavaron con agua de grifo durante 1 minuto para eliminar la suciedad.



Figura 6 | Detalle de la obtención de muestras de lechuga cortada de 3x3 cm con un cuchillo de acero inoxidable estéril.

Fuente: Elaboración propia.

3.2. MICROORGANISMO INOCULADO

El microorganismo empleado para el estudio de desinfección fue *Escherichia coli* CECT 101 (*E. coli*) fue proporcionado por el Área de Microbiología, Departamento de Biotecnología de la Universitat Politècnica de Valencia (2016). El cultivo se conservó a una temperatura de 4 °C en Luria Bertani Agar (LB Agar, Sigma-Aldrich, USA) y se sembró en nuevas placas de LB Agar de forma mensual.

3.2.1. PREPARACIÓN DEL CULTIVO

Para la preparación del inóculo de *E. coli* se partió de un cultivo starter. En primer lugar, se tomó una colonia de *E. coli* con un asa de siembra y se introdujo en un matraz erlenmeyer con 50 mL de Luria Bertani Broth (LB Broth, Sigma-Aldrich USA). Tras la inoculación se colocó a una temperatura de 37 °C durante 24 h en una cámara incubadora (J.P. SELECTA, Modelo 3000957, Barcelona, España) situada sobre un agitador orbital (J.P. SELECTA, Rotabit Modelo 3000974, Barcelona, España) a 120 rpm para favorecer el crecimiento de la bacteria de manera homogénea. Pasadas las 24 horas, se tomaron 100 µL de la disolución con una micropipeta (SOCOREX Acura 100-900 µL, Suiza) y se introdujeron en otro erlenmeyer con 50 mL de LB

Broth (Figura 7). Después se introdujo el nuevo matraz en la cámara incubadora en las mismas condiciones que la disolución anterior durante 18 h. Tras este tiempo se obtuvieron las células de *E. coli* en fase estacionaria temprana (Ortuño *et al.*, 2012). Todo el material empleado en la experiencia fue previamente esterilizado en autoclave (J.P. SELECTA, Modelo Preso clave 75, Barcelona, España).



Figura 7 | Matracas erlenmeyer con LB Broth esterilizados y micropipeta.
Fuente: Elaboración propia.

Transcurridas las 18 horas, se introdujeron 15 mL de la suspensión microbiana en dos tubos de centrifuga estériles. Estos tubos se introdujeron en una centrifuga (J.P. SELECTA, Modelo Medifriger-BL-S 7001377, Barcelona, España) (Figura 8). La centrifugación se realizó a una temperatura de 4°C a 5000 g durante 5 minutos.



Figura 8 | Centrifuga con tubos.
Fuente: Elaboración propia.

Una vez separadas las fases, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 20 mL de una solución salina estéril (SS, 0.85% w/w) previamente esterilizada en autoclave. Seguidamente se homogeneizó la muestra mediante agitación de los tubos de centrifuga en un agitador vórtex (VWR INTERNATIONAL, modelo 444-1372, Alemania). Tras obtener la solución final, se procedió a cultivarla en placas LB Agar con el fin de comprobar el crecimiento correcto en la solución salina. Posteriormente se dejó en la cámara incubadora durante 24 horas a 37 °C.

3.2.2. INOCULACIÓN DE *E. COLI*

La inoculación se realizó añadiendo 100 µL de la solución final agitada en las muestras de lechuga fresca (muestras de 3 x 3 cm) situadas en bandejas de plástico estériles, empleando para ello una micropipeta. Terminada la inoculación, las muestras se dejaron secar durante 1 hora en una campana de flujo laminar (TELSTAR TECHNOLOGIES, modelo AH-100, Terrassa, España).

En este punto, cabe destacar la problemática específica de la relación entre tiempo de secado y temperatura de la muestra. Así, 1 hora no resultó un período de tiempo suficiente para asegurar la adherencia de la solución bacteriana sobre la superficie de la lechuga. Por otro lado, la lechuga no debe permanecer mucho tiempo a una temperatura superior a 4 °C, ya que sus características físicas (turgencia principalmente) pueden verse alteradas. Como solución de compromiso se optó por, transcurrida la hora de secado, almacenar la lechuga durante 24 horas a una temperatura de 4 °C. Esto permitió la adherencia de los microorganismos, manteniendo el producto a una temperatura óptima. Una vez inoculada la bacteria, se determinó la concentración inicial de *E. coli* en la muestra.

3.3. DESINFECCIÓN DE LA LECHUGA

El estudio de la eficacia de la aplicación de ultrasonidos de potencia como agente desinfectante se realizó a partir de tres tratamientos de desinfección en lechuga fresca cortada: Uno con aplicación de NaClO, otro con aplicación de HPU y el último con la combinación de ambos, es decir, la aplicación de NaClO con HPU.

3.3.1. MONTAJE EXPERIMENTAL

En las Figuras 9, 10, 11 y 12 se muestran imágenes de los principales componentes del montaje experimental empleado para la desinfección del producto fresco mediante ultrasonidos de potencia (HPU). Dichos componentes son:

- Generador de ultrasonidos (ATU Ultrasonidos, modelo G.A.T-1500, Manises, España) (Figura 9). Genera una onda de alta frecuencia a partir de energía eléctrica (programada de fábrica, 40 kHz). También dispone de un sistema con barrido de frecuencias configurable para limitar los efectos de aparición de un campo estacionario con zonas de máxima y mínima presión acústica. Está compuesto por dos bloques principales: un circuito de control, mediante el cual se puede visualizar la intensidad y el nivel de potencia de salida; y un circuito de potencia, con el que permite modular la potencia de ultrasonidos (hasta 1500 W).



Figura 9 | *Generador de ultrasonidos.*

Fuente: Elaboración propia.

- Baño de ultrasonidos (ATU Ultrasonidos, modelo ATG-E, Manises, España) (Figura 10). Tanque de acero inoxidable con una capacidad de 60 L. Está compuesto por un conjunto de transductores acoplados a la base del baño. Estos vibran al recibir una señal eléctrica de alta frecuencia proveniente del generador, emitiendo así una onda ultrasónica en dirección perpendicular a la base. Está provisto de una doble camisa de refrigeración para controlar la temperatura en el interior del tanque.



Figura 10 | *Baño de ultrasonidos.*

Fuente: Elaboración propia.

- Equipo de frío (Figura 11). Circuito de frío por el que se recircula una solución de agua glicolada y que posibilita el control de temperatura en el baño. Está compuesto por un intercambiador de calor que permite el enfriamiento del fluido almacenado en el depósito de la Figura 11, y desde el que se suministra la disolución a baja temperatura a la camisa de refrigeración del baño.



Figura 11| *Detalle del intercambiador y depósito pulmón del sistema de refrigeración del baño de ultrasonidos.*

Fuente: Elaboración propia.

- Termómetro digital (TES, Thermometer modelo 1300, Taiwan) (Figura 12). Permite la medición de la temperatura del agua dentro del tanque por medio de un sensor termopar K.



Figura 12| *Termómetro digital.*

Fuente: Elaboración propia.

La configuración con la que trabaja el equipo de desinfección ultrasónica se esquematiza en la Figura 13.

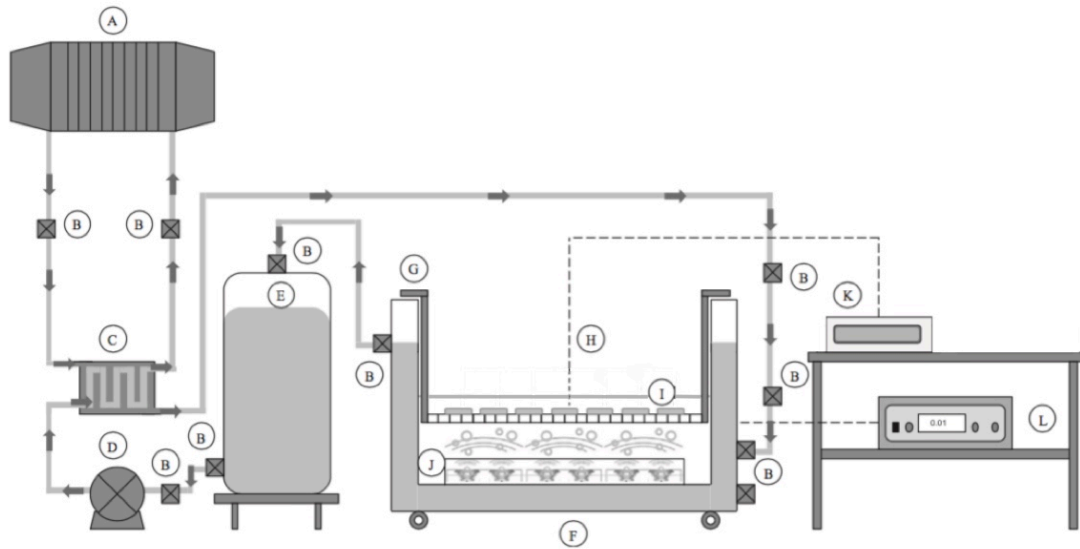


Figura 13 | Equipo de desinfección ultrasónica. A) Enfriador. B) Válvula. C) Intercambiador de calor. D) Bomba. E) Depósito de agua glicolada. F) Baño de ultrasonidos. G) Soporte de muestras. H) Termopar I) Muestras de lechuga. J) Transductores. K) Termómetro digital. L) Generador de ultrasonidos.

Fuente: Modificado a partir de la imagen de Ozuna *et al.*, 2014.

El generador proporciona la señal eléctrica con la amplitud y frecuencia determinada. Esta señal es recibida por los transductores, los cuales la transforman en vibraciones mecánicas de frecuencia ultrasónica. A su vez, esta energía acústica se transmite al interior del baño. Las muestras se sitúan sumergidas en el baño (25 L) en posición perpendicular a la dirección de la onda ultrasónica. De esta manera, se facilita que la onda alcance a la máxima superficie posible de muestra. Los ultrasonidos generan el fenómeno de cavitación. Este consiste en la formación, crecimiento y colapso de micro burbujas en el seno del líquido. La implosión de las mismas en zonas próximas a superficies sólidas genera un micro-jet que golpea la superficie (Castillo, 2015; Soria y Villamiel, 2010). Este efecto es la base de las aplicaciones de los ultrasonidos para limpieza y podría contribuir tanto a la eliminación de agentes contaminantes y microorganismos como a la inactivación de estos últimos.

Durante la aplicación de ultrasonidos, se encuentra en funcionamiento el equipo de frío. De esta manera, se evita la subida de temperatura en el agua del baño que producen los ultrasonidos, y se diferencian los efectos mecánicos de los mismos de los efectos puramente térmicos. Para ello, el intercambiador de calor enfría el agua glicolada del depósito, y ésta se recircula a través de la doble camisa del baño, permitiendo el control de la temperatura del agua del interior del baño. La temperatura de la misma se mide periódicamente mediante un termopar para identificar oscilaciones fuera de rango.

3.3.2. METODOLOGÍA DE DESINFECCIÓN

Cada una de las experiencias de desinfección ensayadas consistieron en el tratamiento de 24 muestras de lechuga a una temperatura controlada de 4 ± 1 °C. En todos los casos, el baño de

ultrasonidos contuvo 25 L de agua de grifo, y las muestras de lechuga permanecieron sujetas mediante soportes metálicos con el fin de evitar cambios de posición y permitir que el tratamiento fuera similar en todos los casos.



Figura 14| Disposición de muestras de lechuga en el baño de ultrasonidos.

Fuente: Elaboración propia.

A intervalos de 5 minutos se fueron retirando sucesivamente 4 muestras de lechuga de manera aleatoria, para evitar la influencia de su posición en el baño.

Para el tratamiento con hipoclorito sódico (NaClO) se utilizó Lejía Multiusos Consum, apta para alimentos, adquirida en un supermercado de Valencia, España. El producto en cuestión, según indica el fabricante, contiene 37 g de cloro activo por litro de agua a la salida de fábrica. Ya que la concentración de cloro activo normalmente empleada en la industria para la desinfección de productos frescos cortados se encuentra en el rango de 50-200 mgL⁻¹ (López-Gálvez *et al.*, 2010) se diluyeron 135 mL de producto en los 25 L de agua del baño. Esto equivale a tener una concentración de 200 ppm de cloro libre. Hay que tener en cuenta que el producto pierde eficacia debido a la evaporación del cloro (CESVBC, 2016). Sin embargo, se estimó que la corta duración de los tratamientos no fue suficiente para cambiar dicha concentración. Durante los tratamientos la disolución de hipoclorito se sometió a una agitación suave manual para favorecer la homogeneidad.

En cuanto a los tratamientos con ultrasonidos (HPU), la potencia acústica se ajustó al máximo valor permitido por el baño (1500 W). También se realizó un barrido de frecuencia, modulando al ancho de banda máximo permitido por el sistema y con una velocidad de barrido media. De esta manera, se pretendió minimizar al máximo el efecto de campo estacionario y homogeneizar al máximo el tratamiento de ultrasonidos recibido por todas las muestras.

Por último, los tratamientos combinados con aplicación de ultrasonidos y NaClO (NaClO+HPU) se realizaron en las mismas condiciones que los anteriores. Es decir, utilizando el mismo producto desinfectante y a la misma concentración que en los tratamientos con hipoclorito sódico y con la misma potencia y modulación de la frecuencia que en los

tratamientos con HPU. Además, en este caso, también se ensayó una concentración diferente de hipoclorito sódico, concretamente, de 100 ppm de cloro activo (67.5 mL de producto desinfectante en 25 L de agua). Este último tratamiento se realizó con el fin de comprobar si con dicho tratamiento combinado sería posible reducir la cantidad de hipoclorito sódico empleado para la desinfección de la lechuga.

3.4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Después de realizar cada tratamiento de desinfección, se realizaron recuentos de microorganismos activos en las muestras de lechuga para comprobar la eficacia de cada tratamiento. Además, también se realizaron recuentos en el agua residual.

3.4.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se tomó 1 g de lechuga desinfectada y se introdujo en una bolsa de stomacher añadiendo 9 mL de agua destilada (relación 1:10). Seguidamente se introdujo la bolsa en un stomacher durante 1 minuto (IUL INSTRUMENTS, modelo classic panoramic 9000500, Barcelona, España) obteniéndose así una disolución homogénea. Posteriormente se tomaron 100 μ L y se diluyeron hasta una concentración adecuada para el recuento. Por último, se sembraron 100 μ L de la dilución en LB Agar y se introdujeron en la cámara incubadora durante 24 h a 37 °C. De la misma forma, se preparó una muestra control con lechuga que no había recibido tratamiento, para establecer la concentración inicial de microorganismos.

Por otro lado, para el análisis del agua empleada para la desinfección, se tomaron 100 μ L del agua del baño, diluyéndolos y cultivándolos en las mismas condiciones que las muestras de lechuga.

3.4.2. ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO

Respecto al análisis bacteriológico, se realizó un recuento de las colonias formadas en las placas de LB Agar a la dilución más apropiada para cada caso. Esto permitió calcular la cantidad de microorganismos presentes tras el tratamiento desinfectante, comparárlas con la carga microbiana de la muestra control y, así, determinar la efectividad de los distintos métodos de desinfección ensayados.

3.4.3. MODELOS MATEMÁTICOS

Para el estudio de la efectividad de los diferentes métodos desinfectantes se emplearon varios modelos que representan cinética de inactivación microbiana. En todos ellos, se consideró al logaritmo decimal del número de microorganismos supervivientes como una variable dependiente del tiempo. En primer lugar, se ensayó un modelo de cinética de primer orden (Ec. 1).

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -k \times t \quad (t \geq 0) \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde N_0 es la concentración inicial de microorganismos en la muestra, N la concentración de microorganismos a un determinado tiempo t y k es la constante de velocidad a la que se reduce el contenido en microorganismos.

También se ensayaron modelos no lineales como el modelo de Weibull (Ec. 2) y los modelos de Peleg Tipo A (Ec. 3) y Tipo B (Ec. 4).

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -b \times t^n \quad (\text{Ec. 2})$$

Siendo b un parámetro no lineal relacionado con la velocidad de inactivación y n un parámetro que muestra la forma de la curva. De este modo cuando $n=1$ la curva de supervivencia es lineal, mientras que si es diferente de uno puede ser cóncava hacia abajo ($n > 1$) o cóncava hacia arriba ($n < 1$).

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -\frac{a_1 \times t}{(1 + a_2 \times t)(a_3 - t)} \quad (\text{Ec. 3})$$

Siendo a_1 , a_2 y a_3 los parámetros del modelo.

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -\frac{k_1 \times t^m}{k_2 + t^m} \quad (\text{Ec. 4})$$

Siendo k_1 , k_2 y m los parámetros del modelo.

Los ajustes de los modelos se llevaron a cabo a mediante el programa Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Además, se calculó el coeficiente de regresión (R^2) y la raíz del error medio cuadrático (RMSE) para estimar la precisión de los modelos matemáticos (Ec. 5 y 6).

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^z (y_j - y_j^*)^2}{z}} \quad (\text{Ec. 5})$$

$$R^2 = 1 - \left(\frac{S_{yx}^2}{S_y^2}\right) \quad (\text{Ec. 6})$$

Siendo y_j y y_j^* los valores experimentales y estimados, respectivamente; z el número de datos experimentales, S_y la desviación estándar total y S_{yx} la desviación estándar de la estimación.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PUESTA A PUNTO DE LA METODOLOGÍA DE SIEMBRA

Como paso previo para el correcto recuento de los microorganismos existentes, se determinó la dilución más adecuada para cada uno de los tratamientos de desinfección considerados ya que su eficacia y los distintos tiempos de exposición pueden afectar al número de microorganismos supervivientes de manera diferente. Una selección adecuada de la dilución permite realizar un recuento de forma visual. Para ello, después de diluir, los resultados deben encontrarse dentro de un intervalo comprendido entre 30 y 300 UFC por placa (Castillo *et al.*, 2014).

Así, en primer lugar, para los tres tratamientos utilizados en este trabajo (NaClO, HPU y HPU + NaClO) se realizaron experiencias de puesta a punto, empleando en la siembra un rango de diluciones de 10^{-1} a 10^{-8} M. Tras la incubación de las muestras, se determinó el rango de concentraciones más adecuado para cada tratamiento. Estos rangos fueron:

- Tratamiento NaClO: Diluciones de 10^{-2} a 10^{-4} M.
- Tratamiento HPU: Diluciones de 10^{-3} a 10^{-4} M.
- Tratamiento HPU + NaClO (100 ppm): Diluciones de 10^{-2} a 10^{-4} M.
- Tratamiento HPU + NaClO (200 ppm): Diluciones de 10^{-1} a 10^{-3} M.
- Agua de lavado: Diluciones de 10^{-1} a 10^{-5} M

Una vez determinados estos valores, se comenzaron a realizar las distintas pruebas para estudiar el efecto de los tratamientos en la desinfección de las muestras.

4.2. EFECTO DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS SOBRE LA REDUCCIÓN MICROBIANA

Para asegurar la significación estadística de los resultados, se realizaron 8 repeticiones diferentes, para cada uno de los 4 tratamientos ensayados en este trabajo. En cada uno de ellos, se realizó el recuento de microorganismos en las muestras de lechuga sometidas a los distintos tiempos de tratamiento: 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min. Además, se estableció como valor a tiempo 0, el recuento obtenido en muestras de lechuga inoculadas sin recibir ningún tratamiento desinfectante. La temperatura de las muestras y la intensidad ultrasónica aplicada en los tratamientos con ultrasonidos se midió continuamente, con el objetivo de mantener un control de las condiciones experimentales.

Tabla 2| Recuentos obtenidos en experiencias de desinfección con disolución de hipoclorito sódico (200 ppm).

Tiempo (min)	Concentración de microorganismos (UFC/g)							
	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Prueba 5	Prueba 6	Prueba 7	Prueba 8
0	$1.19 \cdot 10^6$	$1.36 \cdot 10^6$	$1.12 \cdot 10^6$	$1.49 \cdot 10^6$	$1.68 \cdot 10^6$	$1.29 \cdot 10^6$	$1.38 \cdot 10^6$	$1.85 \cdot 10^6$
5	$4.40 \cdot 10^5$	$6.90 \cdot 10^5$	$5.80 \cdot 10^5$	$7.60 \cdot 10^5$	$8.20 \cdot 10^5$	$4.10 \cdot 10^5$	$5.70 \cdot 10^5$	$3.50 \cdot 10^5$
10	$5.20 \cdot 10^4$	$3.20 \cdot 10^4$	$5.90 \cdot 10^4$	$4.20 \cdot 10^5$	$1.03 \cdot 10^5$	$6.50 \cdot 10^4$	$6.80 \cdot 10^4$	$9.70 \cdot 10^4$
15	$2.15 \cdot 10^4$	$2.10 \cdot 10^4$	$3.30 \cdot 10^4$	$6.90 \cdot 10^4$	$5.50 \cdot 10^4$	$5.60 \cdot 10^4$	$3.90 \cdot 10^4$	$7.20 \cdot 10^4$
20	$2.02 \cdot 10^4$	$1.76 \cdot 10^4$	$2.92 \cdot 10^4$	$2.77 \cdot 10^4$	$3.20 \cdot 10^4$	$1.90 \cdot 10^4$	$2.41 \cdot 10^4$	$4.81 \cdot 10^4$
25	$1.58 \cdot 10^4$	$1.02 \cdot 10^4$	$1.17 \cdot 10^4$	$2.53 \cdot 10^4$	$2.87 \cdot 10^4$	$1.23 \cdot 10^4$	$1.81 \cdot 10^4$	$1.03 \cdot 10^4$
30	$1.31 \cdot 10^4$	$6.50 \cdot 10^3$	$9.10 \cdot 10^4$	$2.64 \cdot 10^4$	$1.94 \cdot 10^4$	$1.17 \cdot 10^4$	$1.54 \cdot 10^4$	$9.30 \cdot 10^3$

Tabla 3| Recuentos obtenidos en experiencias de desinfección empleando únicamente ultrasonidos.

Tiempo (min)	Concentración de microorganismos (UFC/g)							
	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Prueba 5	Prueba 6	Prueba 7	Prueba 8
0	$1.19 \cdot 10^6$	$1.36 \cdot 10^6$	$1.12 \cdot 10^6$	$1.49 \cdot 10^6$	$1.68 \cdot 10^6$	$1.29 \cdot 10^6$	$1.38 \cdot 10^6$	$1.85 \cdot 10^6$
5	$9.90 \cdot 10^5$	$1.24 \cdot 10^6$	$1.05 \cdot 10^6$	$1.26 \cdot 10^6$	$9.10 \cdot 10^5$	$8.40 \cdot 10^5$	$8.90 \cdot 10^5$	$8.49 \cdot 10^5$
10	$8.10 \cdot 10^5$	$9.30 \cdot 10^5$	$7.50 \cdot 10^5$	$8.40 \cdot 10^5$	$6.50 \cdot 10^5$	$7.00 \cdot 10^5$	$7.40 \cdot 10^5$	$6.64 \cdot 10^5$
15	$5.90 \cdot 10^5$	$4.40 \cdot 10^5$	$3.54 \cdot 10^5$	$6.10 \cdot 10^5$	$3.90 \cdot 10^5$	$3.10 \cdot 10^5$	$5.20 \cdot 10^5$	$3.97 \cdot 10^5$
20	$4.10 \cdot 10^5$	$3.33 \cdot 10^5$	$2.81 \cdot 10^5$	$4.30 \cdot 10^5$	$2.78 \cdot 10^5$	$4.60 \cdot 10^5$	$3.90 \cdot 10^5$	$3.96 \cdot 10^5$
25	$2.27 \cdot 10^5$	$2.19 \cdot 10^5$	$2.44 \cdot 10^5$	$2.92 \cdot 10^5$	$2.06 \cdot 10^5$	$2.91 \cdot 10^5$	$2.28 \cdot 10^5$	$2.59 \cdot 10^5$
30	$1.94 \cdot 10^5$	$1.53 \cdot 10^5$	$1.70 \cdot 10^5$	$2.48 \cdot 10^5$	$1.81 \cdot 10^5$	$2.28 \cdot 10^5$	$1.84 \cdot 10^5$	$2.13 \cdot 10^5$

Tabla 4| Recuentos obtenidos en experiencias de desinfección combinando ultrasonidos con disolución de hipoclorito sódico (100 ppm).

Tiempo (min)	Concentración de microorganismos (UFC/g)							
	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Prueba 5	Prueba 6	Prueba 7	Prueba 8
0	$1.19 \cdot 10^6$	$1.36 \cdot 10^6$	$1.12 \cdot 10^6$	$1.49 \cdot 10^6$	$1.68 \cdot 10^6$	$1.29 \cdot 10^6$	$1.38 \cdot 10^6$	$1.85 \cdot 10^6$
5	$7.10 \cdot 10^5$	$5.50 \cdot 10^5$	$7.90 \cdot 10^5$	$8.20 \cdot 10^5$	$9.30 \cdot 10^5$	$8.00 \cdot 10^5$	$7.70 \cdot 10^5$	$6.90 \cdot 10^5$
10	$1.25 \cdot 10^5$	$1.49 \cdot 10^5$	$1.72 \cdot 10^5$	$1.41 \cdot 10^5$	$2.05 \cdot 10^5$	$1.38 \cdot 10^5$	$1.54 \cdot 10^5$	$1.18 \cdot 10^5$
15	$7.90 \cdot 10^4$	$8.20 \cdot 10^4$	$6.20 \cdot 10^4$	$1.00 \cdot 10^5$	$1.13 \cdot 10^5$	$5.10 \cdot 10^4$	$8.20 \cdot 10^4$	$6.30 \cdot 10^4$
20	$4.40 \cdot 10^4$	$2.92 \cdot 10^4$	$5.30 \cdot 10^4$	$4.90 \cdot 10^4$	$3.60 \cdot 10^4$	$2.77 \cdot 10^4$	$3.00 \cdot 10^4$	$3.90 \cdot 10^4$
25	$2.13 \cdot 10^4$	$2.23 \cdot 10^4$	$3.90 \cdot 10^4$	$1.79 \cdot 10^4$	$2.44 \cdot 10^4$	$2.38 \cdot 10^4$	$2.61 \cdot 10^4$	$2.40 \cdot 10^4$
30	$1.74 \cdot 10^4$	$1.98 \cdot 10^4$	$1.89 \cdot 10^4$	$1.11 \cdot 10^4$	$1.55 \cdot 10^4$	$1.46 \cdot 10^4$	$1.90 \cdot 10^4$	$9.80 \cdot 10^3$

Tabla 5| Recuentos obtenidos en experiencias de desinfección combinando ultrasonidos con disolución de hipoclorito sódico (200 ppm).

Tiempo (min)	Concentración de microorganismos (UFC/g)							
	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Prueba 5	Prueba 6	Prueba 7	Prueba 8
0	$1.19 \cdot 10^6$	$1.36 \cdot 10^6$	$1.12 \cdot 10^6$	$1.49 \cdot 10^6$	$1.68 \cdot 10^6$	$1.29 \cdot 10^6$	$1.38 \cdot 10^6$	$1.85 \cdot 10^6$
5	$1.42 \cdot 10^5$	$1.63 \cdot 10^5$	$2.08 \cdot 10^5$	$1.21 \cdot 10^5$	$1.25 \cdot 10^5$	$1.39 \cdot 10^5$	$1.60 \cdot 10^5$	$1.01 \cdot 10^5$
10	$2.15 \cdot 10^4$	$2.54 \cdot 10^4$	$3.70 \cdot 10^4$	$2.31 \cdot 10^4$	$2.68 \cdot 10^4$	$1.55 \cdot 10^4$	$2.13 \cdot 10^4$	$4.10 \cdot 10^4$
15	$2.31 \cdot 10^3$	$2.91 \cdot 10^3$	$4.30 \cdot 10^3$	$5.10 \cdot 10^3$	$2.72 \cdot 10^3$	$1.84 \cdot 10^3$	$2.60 \cdot 10^3$	$2.49 \cdot 10^3$
20	$2.08 \cdot 10^3$	$2.74 \cdot 10^3$	$2.80 \cdot 10^3$	$2.20 \cdot 10^3$	$2.34 \cdot 10^3$	$1.91 \cdot 10^3$	$2.45 \cdot 10^3$	$1.50 \cdot 10^3$
25	$1.41 \cdot 10^3$	$2.17 \cdot 10^3$	$2.01 \cdot 10^3$	$1.51 \cdot 10^3$	$1.36 \cdot 10^3$	$1.33 \cdot 10^3$	$1.90 \cdot 10^3$	$1.27 \cdot 10^3$
30	$1.02 \cdot 10^3$	$1.56 \cdot 10^3$	$1.83 \cdot 10^3$	$1.57 \cdot 10^3$	$8.20 \cdot 10^2$	$7.40 \cdot 10^2$	$8.30 \cdot 10^2$	$9.20 \cdot 10^2$

En la Figura 15 se representan las cinéticas de reducción microbiana para cada uno de los tratamientos que se llevaron a cabo (NaClO, HPU, HPU + NaClO 100 ppm y HPU + NaClO 200 ppm). Cabe destacar que los valores de desviación estándar obtenidos fueron muy pequeños lo que demuestra la buena repetibilidad de las experiencias.

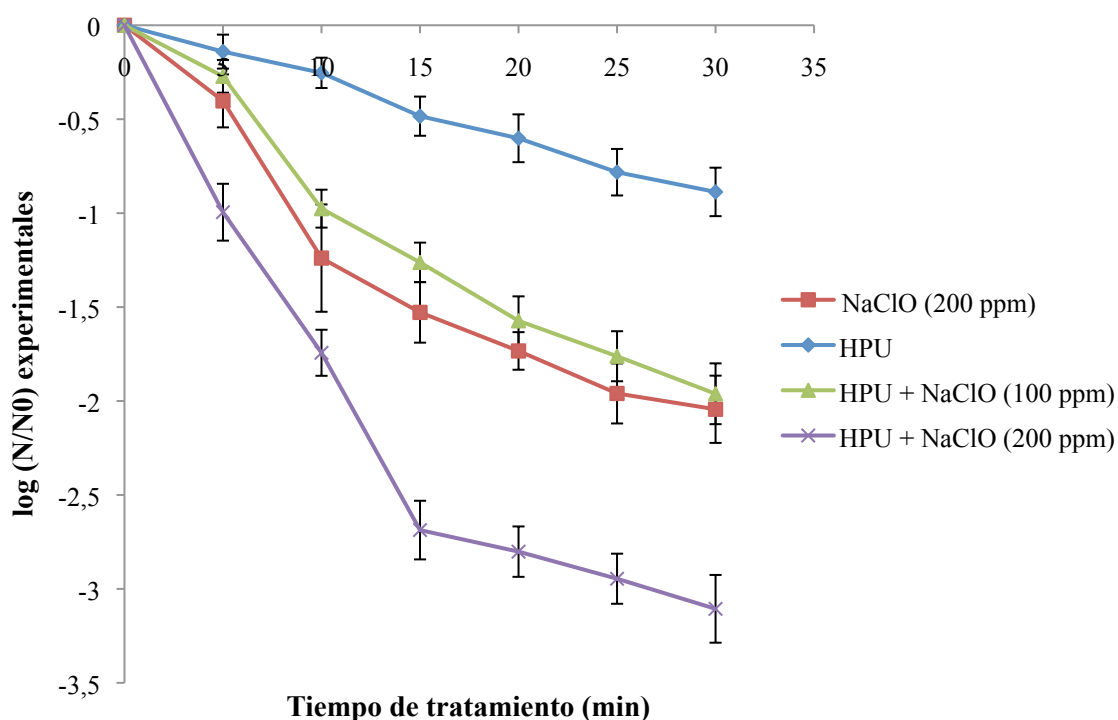


Figura 15 | Valores experimentales del contenido de microorganismos medio y su desviación estándar a diferentes tiempos de tratamiento para los métodos de desinfección considerados.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede observar que el tratamiento con una disolución de hipoclorito sódico de 200 ppm resultó un método de higienización medianamente eficaz, con una fuerte acción de desinfección durante los 10 primeros minutos (reducción de 1.239 ciclos-log). Sin embargo, sólo se consiguió reducir hasta 1.733 ciclos-log la población durante los siguientes 20 minutos. Esto podría ser debido a que durante los primeros minutos se inactivan los microorganismos más accesibles a la acción del NaClO, mientras que posteriormente la efectividad se reduce.

El tratamiento con ultrasonidos durante 30 min a la máxima potencia del equipo (1500 W) redujo la carga microbiana hasta un valor de 0.88 ciclos-log. La reducción de microorganismos es menor que la obtenida empleando NaClO durante 10 minutos. Por tanto, los ultrasonidos por sí solos se pueden considerar un método poco eficaz para la higienización de estas muestras en comparación con la disolución de hipoclorito. Probablemente el efecto de los ultrasonidos sea únicamente un efecto de limpieza, eliminando los microorganismos de la superficie, y no tanto de inactivación microbiana.

Por otro lado, el comportamiento de la curva de reducción microbiana del tratamiento que combinaba HPU con NaClO a 100 ppm fue similar al obtenido en los tratamientos en disolución de hipoclorito sódico de 200 ppm (Figura 15). Durante los 10 primeros minutos, la población de microorganismos de las muestras de lechuga se redujeron 0.976 ciclos-log, es decir, sólo 0.263 ciclos-log menos que en el tratamiento con disolución de NaClO a 200 ppm. A los 30 min de tratamiento se llegó a una reducción de 1.961 ciclos-log, lo que supone 0.083 ciclos-log menos que con la disolución de NaClO a 200 ppm. Estos resultados parecen indicar que la aplicación de ultrasonidos de potencia combinada con NaClO podría emplearse para reducir el uso de hipoclorito como agente desinfectante.

Respecto al tratamiento combinado de una disolución de mayor concentración de NaClO (200 ppm) y ultrasonidos presentó una acción desinfectante más poderosa que el resto de tratamientos ensayados. Así, durante los primeros 10 minutos se redujo la carga microbiana en 1,74 ciclos-log, valor superior al obtenido con el tratamiento realizado únicamente con una disolución de hipoclorito a la misma concentración y al mismo tiempo. A un tiempo de tratamiento de 15 min, la utilización combinada de ultrasonidos e hipoclorito sódico a 200 ppm redujo la carga microbiana hasta 2,687 ciclos-log, valor muy superior al que se obtuvo por el resto de tratamientos al máximo tiempo de exposición. A partir de este tiempo, la reducción de microorganismos se ralentizó.

Los resultados analizados en este apartado concuerdan con lo observado en estudios similares de inactivación de *Listeria monocytogenes* (Lee *et al.*, 2014) y *Cronobacter sakazakii* (Young *et al.*, 2015). En los mismos, el tratamiento con HPU no se mostró efectivo para la desinfección, mientras que si supuso una mejora del tratamiento de higienización con NaClO.

4.3. ANÁLISIS DEL AGUA DE LAVADO

También se realizaron análisis del agua de lavado utilizada en cada uno de los tratamientos con el objetivo de diferenciar los efectos de lavado de las muestras de los efectos de inactivación de los microorganismos. En la Figura 16 se muestran los valores experimentales del logaritmo de la concentración de microorganismos en el agua de lavado a cada tiempo para cada uno de los tratamientos. Para poder realizar la comparación entre tratamientos, se consideró como referencia el valor inicial de contenido de microorganismos en las muestras de lechuga.

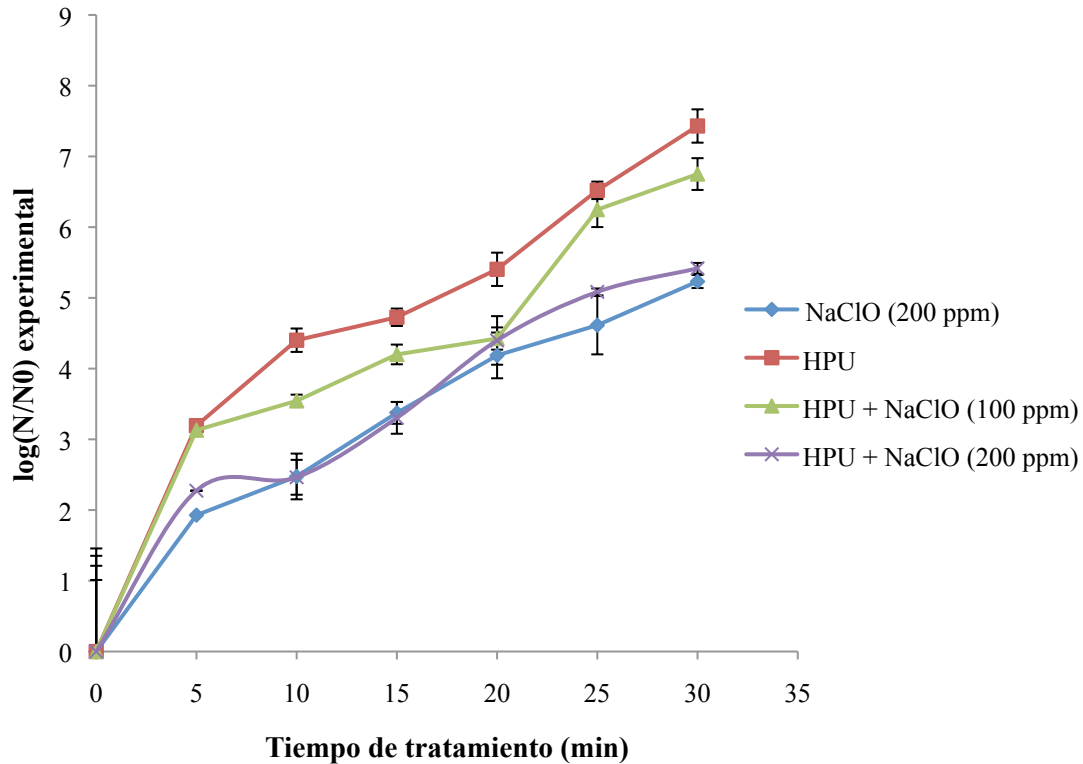


Figura 16 | Valores experimentales del análisis del agua de lavado de los diferentes métodos.

Como muestra la Figura 16, se observó un aumento de la concentración de microorganismos en el agua de lavado con el paso del tiempo de exposición en todos los tratamientos ensayados, en contraposición a lo encontrado en las muestras de lechuga.

En el caso del tratamiento con una disolución de NaClO (200 ppm), se observa un aumento casi lineal del contenido de microorganismos llegando hasta 5.23 ciclos-log.

En cuanto al tratamiento con aplicación de HPU, se observó que la carga microbiana que queda en el agua de lavado resultó mayor que la observada en el resto de métodos (7.43 ciclos-log). Esto podría atribuirse a que los HPU son más efectivos en cuanto a la limpieza de las muestras, transmitiendo los microorganismos al agua de lavado sin llegar a inactivarlos.

Respecto al método que combina HPU con una disolución de NaClO a menor concentración, la cinética de la carga microbiana en el agua de lavado resultó intermedia entre los tratamientos de aplicación de ultrasonidos y los realizados con una disolución de NaClO a 200 ppm. Así, se observó que su carga microbiana se redujo en 3.13 ciclos-log a los 5 minutos de tratamiento, valor similar al observado en el tratamiento con HPU (3.19 ciclos-log) y superior al observado en el tratamiento con la disolución de NaClO de 200 ppm (1.92 ciclos-log). Transcurridos 30 minutos la reducción aumentó hasta los 6.75 ciclos-log, valor intermedio entre el observado en el tratamiento con HPU (7.43 ciclos-log) y el de NaClO a 200 ppm (5.42 ciclos-log). En este caso, se combinaría la mayor acción de lavado de la aplicación de ultrasonidos, que aumentaría el contenido de microorganismos en el agua de lavado, con el efecto inactivador del cloro, que a su vez inactivaría parcialmente los microorganismos arrastrados por lavado.

Esto se confirmaría con los resultados obtenidos en el tratamiento combinado de aplicación de HPU y una disolución de NaClO a la máxima concentración ensayada, 200 ppm. En este caso, se puede observar (Figura 16) que la cinética de la carga microbiana en el agua de lavado es

similar a la observada para el mismo tratamiento, pero sin aplicación de ultrasonidos. Dado que en este caso la carga microbiana observada en las muestras de lechuga fue muy inferior a la de los otros tratamientos (Figura 15), cabe pensar que se combinan la mayor efectividad de los ultrasonidos en el lavado con el mayor poder de inactivación del NaClO.

4.4. MODELIZACIÓN MATEMÁTICA DE LA INACTIVACIÓN MICROBIANA

Los resultados del apartado 4.2., correspondientes al recuento microbiano en muestras de lechuga, se ajustaron en una primera aproximación a un modelo log-lineal para describir la cinética de inactivación de *E. coli* en función del tiempo (Ec. 1). Sin embargo, este modelo lineal no presentó un ajuste adecuado a los datos experimentales a excepción del tratamiento con HPU, como queda reflejado tanto por los bajos coeficientes R^2 y por altos valores de RMSE (Tabla 6), como por la forma de las curvas de inactivación mostradas en la Figura 15. Este comportamiento no lineal también ha sido observado previamente para *E. coli* por Mahmoud y Linton (2008) en la inactivación en lechuga mediante ClO₂ gas.

Tabla 6 | Parámetros y estadísticos obtenidos del ajuste del modelo lineal a los valores experimentales de inactivación microbiana.

Tratamiento	Modelo lineal		
	k	R ²	RMSE
NaClO (200 ppm)	0.080	0.879	12.080
HPU	0.030	0.993	5.597
HPU + NaClO (100 ppm)	0.072	0.950	13.458
HPU + NaClO (200 ppm)	0.126	0.809	19.001

Por esta razón, se optó por ajustar diferentes modelos no lineales a los valores experimentales. Concretamente, se emplearon el modelo de Weibull y los modelos de Peleg Tipo A y Tipo B (Peleg, 2006). Así, entre los modelos considerados para describir las cinéticas no lineales, el más empleado es el modelo de Weibull (Ec. 4), entre otras razones por su simplicidad y porque permite modelizar curvas de inactivación tanto lineales como patrones complejos.

Adicionalmente al modelo de Weibull, el ajuste se llevó a cabo mediante los modelos de Peleg Tipo A (Ec. 5) y Tipo B (Ec. 6) (Ortuño *et al.*, 2014). La aplicación del modelo Tipo A es típica para tratamientos en los que la población de microorganismos más sensibles se reduce en los primeros minutos (Peleg 2006). Por otro lado, el modelo Tipo B se ajusta en tratamientos que constan de una rápida eliminación de la población microbiana más débil, seguida de un aumento de la resistencia del resto de microorganismos (Ortuño *et al.*, 2014).

Las Tablas 7 y 8 muestran tanto los parámetros identificados para cada modelo como los estadísticos R^2 y RMSE calculados a partir del ajuste de las ecuaciones de cada modelo matemático a los datos experimentales. La identificación de los parámetros se llevó a cabo planteando un problema de optimización. Así, se minimizó el sumatorio de las diferencias al cuadrado entre los datos experimentales y los valores obtenidos por cada modelo. Para ello, se empleó el método del gradiente reducido generalizado (GRG) que se encuentra disponible en la herramienta Solver de Microsoft Excel.

Tabla 7 | *Parámetros y estadísticos obtenidos del ajuste del modelo de Weibull a los valores experimentales de inactivación microbiana.*

Tratamiento	Weibull			
	b	n	R ²	RMSE
NaClO (200 ppm)	-0.248	0.638	0.960	14.902
HPU	-0.028	1.026	0.993	4.787
HPU + NaClO (100 ppm)	-0.144	0.781	0.974	16.107
HPU + NaClO (200 ppm)	-0.530	0.539	0.963	8.605

Tabla 8 | *Parámetros y estadísticos obtenidos del ajuste de los modelos de Peleg Tipo A y Tipo B a los valores experimentales de inactivación microbiana.*

Tratamiento	Peleg Tipo A					Peleg Tipo B				
	a ₁	a ₂	a ₃	R ²	RMSE	k ₁	k ₁	m	R ²	RMSE
NaClO (200 ppm)	-9.731	0.015	-65.777	0.979	10.871	2.195	109.637	2.080	0.995	4.294
HPU	-7.601	-0.004	-253.06	0.993	5.469	1.895	174.548	1.484	0.995	6.169
HPU + NaClO (100 ppm)	-10.059	0.008	-96.256	0.982	13.896	2.158	156.590	2.021	0.992	4.762
HPU + NaClO (200 ppm)	-13.463	0.020	-49.251	0.985	5.295	3.482	46.433	1.758	0.991	3.767

A continuación, en las Figuras 17, 18, 19 y 20 se representan los ajustes de los diferentes modelos a los datos experimentales para cada uno de los 4 tratamientos realizados donde se pueden observar la bondad de los ajustes realizados en cada caso:

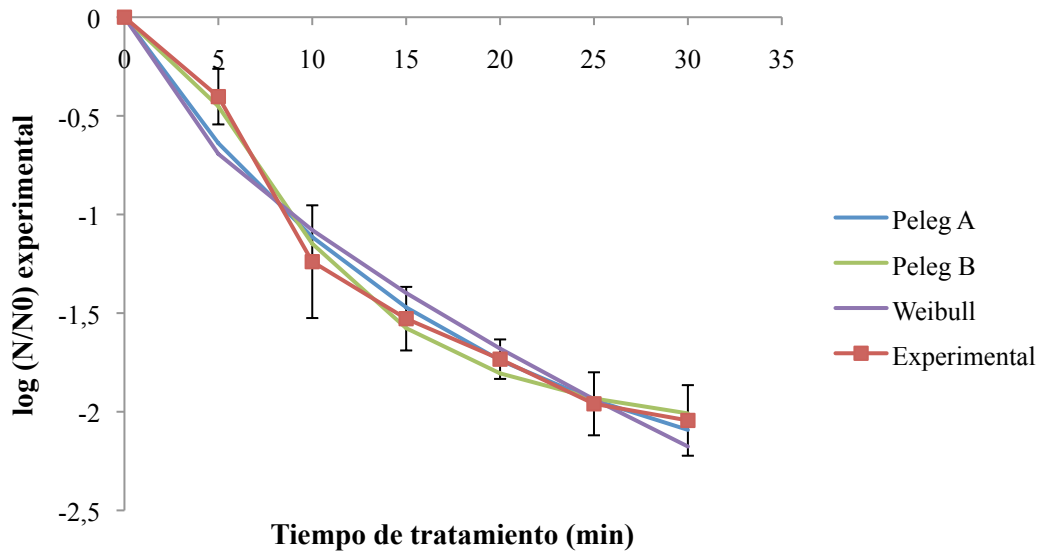


Figura 17| Cinéticas de inactivación experimental y predichas por los distintos modelos para los tratamientos de desinfección con una disolución de NaClO (200 ppm).

En el caso del tratamiento con una disolución de NaClO a una concentración de 200 ppm (Figura 17) se puede apreciar que la curva presenta un comportamiento no lineal, con aspecto sigmoide y con hombro durante los primeros minutos. Así, se observa una rápida reducción de los microorganismos durante los primeros 10 minutos, reduciéndose posteriormente la velocidad de inactivación.

Entre los diferentes modelos utilizados, el modelo de Peleg Tipo B es el que mejor se ajustó al comportamiento de este tratamiento presentando un valor de R^2 de 0.995 y de RMSE de 4.29%.

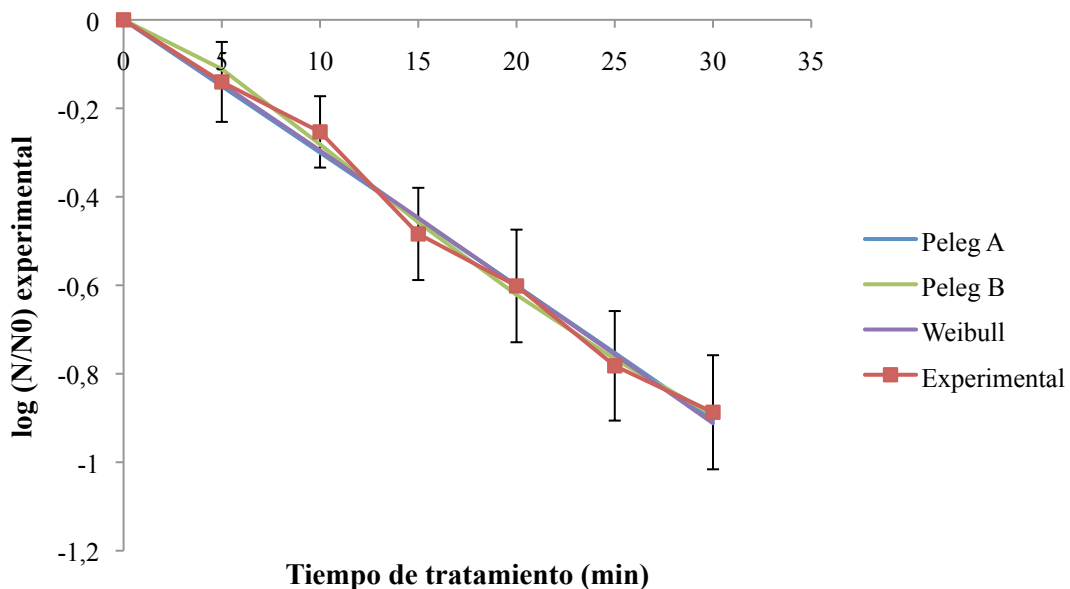


Figura 18| Cinéticas de inactivación experimental y predichas por los distintos modelos para los tratamientos de desinfección con HPU.

Respecto al tratamiento empleando únicamente ultrasonidos de potencia, el comportamiento de la curva se asemeja más a un modelo lineal. Así, el parámetro n del modelo de Weibull presenta

un valor de 1.03. Esto indicaría, que los ultrasonidos realizaron una higienización de las muestras con una eficacia constante con el tiempo (Figura 18).

Los tres modelos matemáticos parecen ajustarse bien a la cinética de inactivación, pues poseen un valor de R^2 por encima de 0.99. No obstante, el modelo de Weibull fue el que mejor se ajustó a los datos experimentales ya que presentó el menor valor de RMSE (4.78 %). Además, el valor del parámetro n es muy próximo a 1 (1.026) dando a entender que la curva tiene un comportamiento lineal como se ha comentado en el apartado 3.4.3.

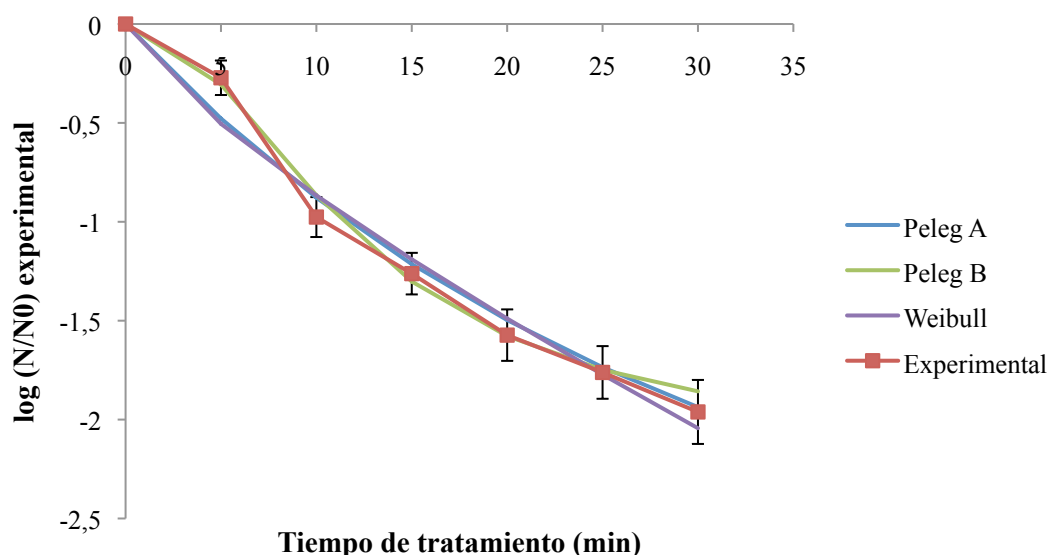


Figura 19 | Cinéticas de inactivación experimental y predichas por los distintos modelos para los tratamientos de desinfección combinando HPU con NaClO (100 ppm).

Por lo que se refiere al tratamiento combinado de ultrasonidos con una disolución de hipoclorito de sodio a menor concentración (100 ppm), la cinética de inactivación obtenida describió una sigmoide con cierto hombro (Figura 19). Como se ha comentado en el apartado anterior, la curva de los valores experimentales para este tratamiento es muy similar a la descrita por el tratamiento mediante únicamente con una disolución de NaClO de 200 ppm.

Tras el ajuste de los diferentes modelos matemáticos, el modelo de Peleg Tipo B resultó ser el más adecuado para la descripción del comportamiento de este método de higienización, ya que los otros dos modelos no describen correctamente el hombro que forma la curva durante los primeros minutos. Este modelo, además, presenta un valor de R^2 de 0.992 mayor que el obtenido por los otros dos modelos.

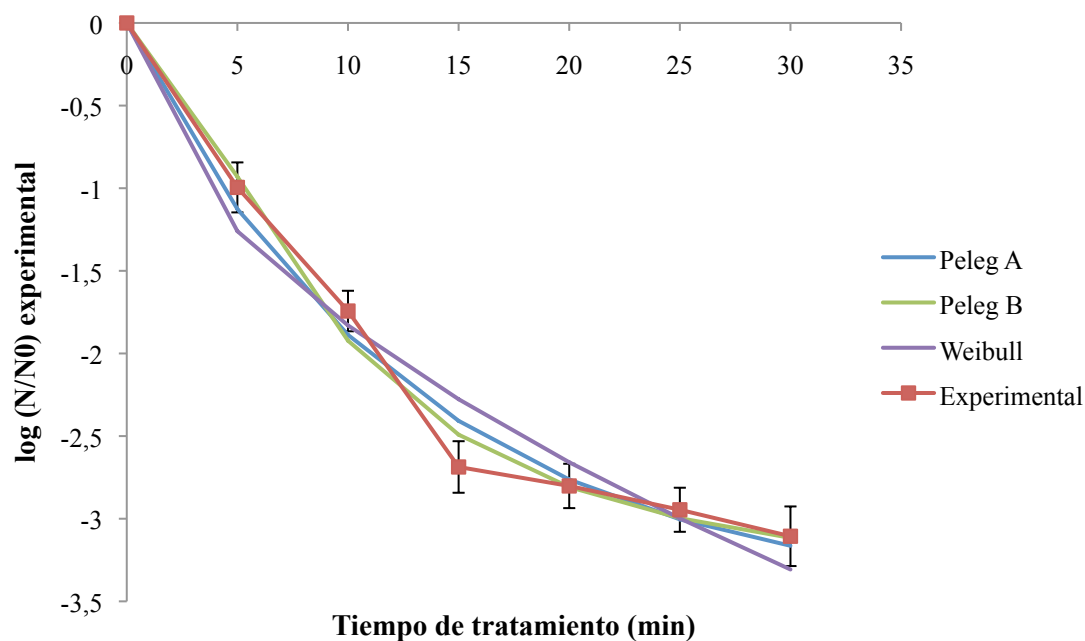


Figura 20 | *Cinéticas de inactivación experimental y predichas por los distintos modelos para los tratamientos de desinfección combinando HPU con NaClO (200 ppm).*

En cuanto al método que combinó la aplicación de ultrasonidos con una disolución de hipoclorito sódico con una concentración de 200 ppm (Figura 20), presentó un comportamiento similar a los tratamientos descritos en las Figuras 16 y 18, a excepción de que, en este caso, la curva no presentó un hombro al inicio del tratamiento.

A la vista de los resultados obtenidos con los modelos matemáticos aplicados, el modelo de Peleg Tipo B es el que mejor se ajustó a la cinética de inactivación microbiana en este caso, con un valor de R^2 de 0.991.

Tras la realización del ajuste de los tres modelos en cada uno de los tratamientos aplicados, se puede concluir que el modelo de Peleg Tipo B es el que mejor se ajustó a todos los tratamientos. Por lo tanto, sería el más indicado para describir la cinética de inactivación microbiana en los diferentes métodos que se han utilizado en el presente trabajo. En todos los casos es el que mejor se ajusta, con un valor de R^2 superior y un valor de RMSE inferior al del resto de modelos.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones más importantes obtenidas en el presente trabajo se muestran a continuación:

- En general, en el proceso de desinfección se observaron dos fases, una de rápida eliminación hasta 15 minutos de tratamiento y posteriormente otra en la que el proceso es más lento.
- El agua de lavado tuvo un efecto de arrastre de microorganismos que favoreció a los métodos de higienización. Esto fue principalmente importante en los tratamientos con ultrasonidos.
- El lavado de las muestras en una disolución de hipoclorito sódico de 200 ppm resultó un método relativamente eficaz para la desinfección de las mismas, teniendo su mayor efecto en los primeros 10 minutos de tratamiento.
- La aplicación de ultrasonidos de potencia no resultó tan eficaz para la desinfección de lechuga. Su principal contribución a la desinfección podría ser mejorar el proceso de lavado y no tanto la inactivación microbiana.
- La aplicación combinada de ultrasonidos de potencia con disolución de hipoclorito sódico a concentración de 100 ppm consiguió resultados similares a los obtenidos con un tratamiento exclusivamente con hipoclorito sódico a una concentración de 200 ppm. Esto indicaría que la aplicación de ultrasonidos permitiría reducir la cantidad de hipoclorito sódico empleado en la desinfección de productos de IV Gama.
- El modelo matemático de Peleg Tipo B fue el más adecuado para describir el comportamiento de los métodos de desinfección asistido por ultrasonidos o hipoclorito sódico.
- La metodología desarrollada debería validarse en trabajos posteriores, realizándose un mayor número de repeticiones, además de pruebas a mayor temperatura para poder conocer la influencia de esta variable sobre los tratamientos.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

AHMAD-QASEM, M.H.; CÁNOVAS, J.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; MICOL, V.; CÁRCEL, J.A. & GARCÍA-PÉREZ, J.V. (2013). Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. *Serrana*) by using power ultrasound. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 17: 120-129.

AINIA DISAL (2016). *Análisis de tendencias en productos de IV Gama*. Consultado el 19 de junio de 2016. Disponible en:

<http://www.ainiadisal.es/publico/docs/Prospección%20y%20tendencias%20IV%20gama.pdf>

AGUERRI, I. (2014). *Análisis de la situación actual del consumo de productos de IV Gama en Pamplona*. Proyecto Fin de Carrera en Ingeniería Técnica Agrícola. Universidad Pública de Navarra. Pamplona.

ALONSO, P. (2007). *Situación de la IV Gama en España*, consultado el 23 de mayo de 2016. Disponible en:

<http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf%5Fhortint%2Fhortint%5F2007%5F58%5F54%5F58%2Epdf>

BOTULISMO.ORG (2016). *Botulismo: síntomas*, consultado el 7 de junio de 2016. Disponible en: <http://botulismo.org/sintomas/>

CASTILLO, M.A.; BOTELLA, S.; GARCÍA, J. (2014). *Apuntes de la asignatura "Fundamentos y Aplicaciones Biotecnológicas"*. Universitat Politècnica de València. Valencia.

CASTILLO, R.I. (2015). *Inactivación microbiana en matrices cárnicas mediante fluidos supercríticos asistidos por ultrasonidos de potencia*. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València. Valencia.

CÁRCEL, J.A.; BENEDITO, J.; BON, J. & MULET, A. (2007). High intensity ultrasound effects on meat brining. *Meat Science*, 76(4): 611-619.

CÁRCEL, J.A.; GARCÍA-PÉREZ, J.V.; BENEDITO, J. & MULET, A. (2012). Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. *Journal of Food Engineering*, 110(2): 200-207.

CESVBC (2016). *Manual técnico de desinfección poscosecha*. Consultado el 31 de mayo de 2016. Disponible en:

<http://www.cesavebc.com/PIA/documentos/Manual%20de%20desinfeccion.pdf>

CHAVESTE, S. (2006). *Uso de ultrasonido como técnica alternativa en la desinfección de vegetales*. Tesis Doctoral. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Monterrey.

DEPARTMENT OF HEALTH. NEW YORK STATE (2003). *Listeriosis*, consultado el 7 de junio de 2016. Disponible en:

https://www.health.ny.gov/es/diseases/communicable/listeriosis/fact_sheet.htm

DÍAZ, K. (2014). *Sistema de control "on-line" del proceso de salado de productos cárnicos*. Trabajo Final de Grado. Universitat Politècnica de València. Valencia.

FAO (2003). *Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas. Del campo al mercado*. Consultado el 31 de mayo de 2016. Disponible en:
<http://www.fao.org/docrep/006/y4893s/y4893s07.htm>

FAO (2016). *Slaughterhouse cleaning and sanitation*. Consultado el 31 de mayo de 2016. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/003/x6557e/x6557e05.htm>

FOOD DRINK EUROPE (2013). *Data & Trends of the European Food and Drink Industry 2013-2014*, consultado el 23 de mayo de 2016. Disponible en:
http://www.fooddrinkeurope.eu/uploads/publications_documents/Data_Trends_of_the_European_Food_and_Drink_Industry_2013-20141.pdf

GAMENDIA, G.; VERO, S.; (2006). *Métodos para la desinfección de frutas y hortalizas*, consultado el 21 de junio de 2016. Disponible en:
http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Hort/Hort_2006_197_18_27.pdf

GÁRCIA-PÉREZ, J.V.; ORTUÑO, C.; PUIG, A.; CÁRCEL, J.A. & PÉREZ-MUNUERA, I. (2012). Enhancement of water transport and microstructural changes induced by high-intensity ultrasound application on orange peel drying. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6): 2256-2265.

GÓMEZ, A.M. (2001). *Variedades de lechuga más utilizadas en España*. Consultado el día 24 de mayo de 2016. Disponible en:
<http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf%5Fvrural%2FVrural%5F2001%5F128%5F27%5F29%2Epdf>

GÓMEZ-DÍAZ, J. & LÓPEZ-MALO, A. (2009). Aplicaciones del ultrasonido en el tratamiento de alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1): 59-73.

HAN, I.H. & BAIK, B.K. (2006). Oligosaccharide content and composition of legumes and their reduction by soaking, cooking, ultrasound, and high hydrostatic pressure. *Cereal Chemistry*, 83(4): 428-433.

INSHT (1994). *Fichas Internacionales de Seguridad Química. Hipoclorito de sodio (disolución > 5%)*. Consultado el 31 de mayo de 2016. Disponible en:

<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/1101a1200/nspn1119.pdf>

JANISIEWICZ, W.J.; CONWAY, W.S. & LEVERENTZ, B. (1999). Biological control of postharvest decays of apple can prevent growth of *Escherichia coli* O157:H7 in apple wounds. *Journal of Food Protection*, 62(2): 1372-1375.

JOHANNESSEN, G.S.; LONCAREVIC, S. & KRUSE, H. (2002). Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. *International Journal of Food Microbiology*, 77(3): 199-204.

LEE, Y. & BAEK, S.Y. (2008). Effect of chemical sanitizer combined with modified atmosphere packaging on inhibiting *Escherichia coli* O157:H7 in commercial spinach. *Food microbiology*, 25(4): 582-587.

LEE, N.Y.; KIM, S.W. & HA, S.D. (2014). Synergistic effects of ultrasound and sodium hypochlorite (NaClO) on reducing *Listeria monocytogenes* ATCC19118 in broth, stainless steel, and iceberg lettuce. *Foodborne pathogens and disease*, 11(7): 581-587.

LÓPEZ, S.; MIGUEL, A.; BAIXAULI, C. (1999). Manejo del cultivo, en: *La lechuga y la escarola*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, 71-83.

LÓPEZ-GÁLVEZ, F.; ALLENDE, A.; TRUCHADO, P.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A.; TUDELA, J.A.; SELMA, M.V. & GIL, M.I. (2010). Suitability of aqueous chlorine dioxide versus sodium hypochlorite as an effective sanitizer for preserving quality of fresh-cut lettuce while avoiding by-product formation. *Postharvest Biology and Technology*, 55(1): 53-60.

MAGRAMA (2013). *Características nutricionales de los principales alimentos de nuestra dieta*. 75. *Lechuga*, consultado el 30 de mayo de 2016. Disponible en:

http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:iUQudTXDSj4J:www.magrama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/caract-nutricionales_tcm7-321635.xls+composición+lechuga&ie=UTF-8&oe=UTF-8&gws_rd=cr&ei=WvZLV7KmJIHzasTqmIAI

MAGRAMA (2016). *Informe Anual de la Industria Alimentaria Española periodo 2014-2015*, consultado el 23 de mayo de 2016. Disponible en:

http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/_informeanualindustriaalimentaria2014-2015_tcm7-421229.pdf

MAGRAMA (2016). *Superficies y producciones anuales de cultivo de acuerdo con el Reglamento (CE) 543/2009*, consultado el 27 de mayo de 2016. Disponible en:

<http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>

MAHMOUD, B.S. & LINTON, R.H. (2008). Inactivation kinetics of inoculated *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* on lettuce by chlorine dioxide gas. *Food microbiology*, 25(2): 244-252.

MAROTO, J.V. (1999). Botánica (taxonomía y fisiología) y adaptabilidad, en: *La lechuga y la escarola*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, 25-43.

MEDSCAPE (2016). *Escherichia Coli Infections*, consultado el 7 de junio de 2016. Disponible en: <http://emedicine.medscape.com/article/217485-overview#a5>

MIGUEL, A.; BAIXAULI, C.; JIMÉNEZ, J.; GARCÍA, M.J. (1999). Material vegetal y calendarios de producción, en: *La lechuga y la escarola*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, 45-70.

MULET, A.; BENEDITO, J.; BON, J. & SANJUÁN, N. (1999). Low intensity ultrasonics in food technology. *Food Science and Technology International*, 5(4): 285-297.

MULET, A.; CÁRCCEL, J.A.; SANJUÁN, N. & BON, J. (2003). New food drying technologies. Use of ultrasound. *Food Science and Technology International*, 9(3): 215-221.

PEFAUR, J. (2014). *IV Gama, una industria alimentaria en crecimiento*. Consultado el 19 de junio de 2016. Disponible en:

http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1418325564AgroindustriaIVGama.pdf

- ÖLMEZ, H. & KRETZSCHMAR, U. (2009). Potencial alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT-Food Science and Technology*, 42(3): 686-693.
- ORTOLÁ, M.D. (2016). *Apuntes de la asignatura "Procesado de productos de origen vegetal"*. Universitat Politècnica de València. Valencia.
- ORTUÑO, C.; MARTÍNEZ-PASTOR, M.T.; MULET, A. & BENEDITO, J. (2012). Supercritical carbon dioxide inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* in different growth stages. *The Journal of Supercritical Fluids*, 63: 8-15.
- ORTUÑO, C.; QUILES, A & BENEDITO, J. (2014). Inactivation kinetics and cell morphology of *E. coli* and *S. cerevisiae* treated with ultrasound- assisted supercritical CO₂. *Food Research International*, 62: 955-964.
- OZUNA, C.; PUIG, A.; GARCÍA-PÉREZ, J.V.; CÁRCEL, J.A. (2014). Ultrasonically enhanced desalting of cod (*Gadus morhua*). Mass transport kinetics and structural changes. *LWT-Food Science and Technology*, 59(1): 130-137.
- PARISH, M.E.; BEUCHAT, L.R.; SUSLOW, T.V.; HARRIS, L.J.; GARRETT, E.H.; FARBER, J.N. & BUSTA, F.F. (2003). Methods to Reduce/Eliminate Pathogens from Fresh and Fresh-Cut Produce, en: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Ed. Staff, 161-173.
- PARK, S.Y.; MIZAN, M.F.R. & HA, S.D. (2016). Inactivation of *Cronobacter sakazakii* in head lettuce by using a combination of ultrasound and sodium hypochlorite. *Food Control*, 60: 582-587.
- PELEG, M. (2006) Isothermal Microbial Heat Inactivation, en: *Advanced Quantitative Microbiology for Foods and Biosystems*. Ed. CRC Press. 1-47.
- PIYASENA, P.; MOHAREB, E. & MCKELLAR, R.C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3): 207-216.
- SALYERS, A., WHITT, D. (2002). *Bacterial Pathogenesis: a molecular approach*. ASM press, Washington. Second edition, 681-695.
- SORIA, A.C. & VILLAMIEL, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science y Technology*, 21(7): 323-331.
- YUTING, X.; LIFEN, Z.; JIANJUN, Z.; JIE, S.; XINGQIAN, Y. & DONGHONG, L. (2013). Power ultrasound for the preservation of postharvest fruits and vegetables. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 6(2): 116-125.