

UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA

Escuela de Ingeniería

Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental

DOCTORADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS



“Evaluación de pulsos de luz de alta intensidad (PLAI) y de luz UVC para la desinfección de semillas de trigo, alfalfa y chía para germinados”

Tesis que, en cumplimiento parcial de los requisitos para obtener el grado de Doctor/a en

Ciencia de Alimentos, es presentada por

Abril Estefanía García Santiesteban

Directora: Dra. María Teresa Jiménez Munguía

Codirector: Dr. Enrique Palou García

Santa Catarina Mártir, San Andrés Cholula, Puebla

Verano 2024

ACTA DE REVISIÓN Y AUTORIZACIÓN DE TESIS

ESCUELA DE INGENIERÍA

Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental

Doctorado en Ciencia de Alimentos

Nombre del estudiante: Abril Estefanía García Santiesteban.

ID: 164703.

Nombre de la directora de tesis: Dra. María Teresa Jiménez Munguía.

Título de la tesis: “Evaluación de pulsos de luz de alta intensidad (PLAI) y de luz UVC para la desinfección de semillas de trigo, alfalfa y chíá para germinados”.

Integrantes del Comité Doctoral	Firma
Dra. María Teresa Jiménez Munguía	
Dr. Enrique Palou García	
Dr. Aurelio López Malo	
Dra. Emma Mani López	
Dra. Fátima Reyes Jurado	

Los integrantes del Comité Doctoral expresamos que hemos leído y revisado el manuscrito de la tesis de Doctorado en Ciencia de Alimentos anteriormente descrita, por lo que estamos de acuerdo en que se proceda a generar la versión definitiva de la tesis y programar el examen de grado en la fecha, horario y lugar que se indican a continuación:

Fecha y hora de examen: 17 de junio de 2024; 10:00 am.

Lugar: Aula Magna de la Biblioteca (Bi-310).

INDICE GENERAL

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Justificación	5
3. Objetivos	6
3.1. Objetivo general	6
3.2. Objetivos específicos	6
4. Marco Teórico	7
4.1. Semillas para germinados	7
4.1.1. Trigo	8
4.1.2. Alfalfa	9
4.1.3. Chía	10
4.2. Riesgos microbiológicos asociados al consumo de germinados	11
4.3. Métodos de desinfección de semillas para germinar	13
4.3.1. Tratamientos químicos	13
4.3.2. Tratamientos térmicos	15
4.3.3. Tecnologías Emergentes	18
5. Metodología	25
5.1. Materiales y caracterización	25
5.1.1. Caracterización física y fisicoquímica	25
5.1.2. Caracterización microbiológica	27
5.2. Inoculación microbiológica de las semillas	28
5.2.1. Sanitización de semillas	28

5.2.2.	Inoculación de las semillas con <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella Typhimurium</i>	29
5.3.	Tratamiento de las muestras con luz UVC	30
5.4.	Tratamiento de las muestras con PLAI	31
5.5.	Evaluación termográfica de las semillas durante los tratamientos con luz UVC y con PLAI	32
5.6.	Evaluación de la inactivación de los microorganismos por luz UVC y por PLAI	33
5.7.	Descripción de las cinéticas de inactivación mediante modelos no lineales....	33
5.8.	Evaluación de los efectos de los tratamientos con luz UVC y PLAI en los parámetros de germinación de las semillas	35
5.7.1.	Evaluación de la tasa de germinación o porcentaje de germinación	36
5.7.2.	Cinéticas de crecimiento de los brotes de semillas de alfalfa, trigo y chíá tratadas con UVC o PLAI	36
5.7.3.	Modelado de superficies de respuesta y optimización de los tratamientos con luz UVC y PLAI.....	36
5.8.	Análisis sensorial de los germinados de las semillas de PLAI y UVC.....	37
5.9.	Evaluación de los efectos de los tratamientos de PLAI y UVC en la actividad antioxidante de semillas de alfalfa, trigo y chíá, y sus germinados	37
5.9.1.	Evaluación de la actividad antioxidante mediante la neutralización del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH)	38
5.9.2.	Evaluación del contenido de fenoles totales (TPC).....	38
5.10.	Evaluación sensorial de germinados y semillas tratadas con luz UVC o PLAI	38
5.11.	Análisis estadístico.....	39
6.	Resultados y discusión	41

6.1. Materiales y caracterización	41
6.1.1. Características físicas y fisicoquímicas de las semillas de trigo, alfalfa y chía	41
6.1.2. Características microbiológicas de las semillas de trigo, alfalfa y chía ...	42
6.2. Evaluación de los cambios de temperatura en las semillas por la aplicación de tratamientos con luz UVC ó PLAI	43
6.3. Evaluación de la eficacia de los tratamientos con luz UVC y con PLAI para la inactivación de BMN, <i>S. Typhimurium</i> y <i>L. monocytogenes</i> en semillas.....	46
6.3.1. Efectos de la aplicación de luz UVC en la inactivación de microorganismos en semillas de alfalfa, trigo y chía.....	46
6.3.2. Efectos de la aplicación de PLAI en la inactivación de microorganismos en semillas de alfalfa, trigo y chía, en comparación con luz UVC	50
6.4. Análisis matemático de las curvas de inactivación de BMN y patógenos en trigo, alfalfa y chía, por medio de modelos no-lineales.....	60
6.5. Análisis de los efectos de los tratamientos de PLAI y UVC en los parámetros de germinación de las semillas	68
6.5.1. Tasa de germinación.....	68
6.5.2. Cinética de crecimiento	72
6.6. Optimización de los parámetros de germinación y la inactivación de BMN por superficie de respuesta.....	75
6.7. Análisis de los efectos de los tratamientos de PLAI y UVC en la actividad antioxidante de semillas y germinados.....	79
6.7.1. Evaluación de actividad antioxidante (DPPH) en semillas y germinados de semillas tratadas por UVC o por PLAI.....	79
6.7.2. Evaluación del contenido de fenoles totales (TPC) en semillas y germinados de semillas tratadas con luz UVC o PLAI.....	83

6.8. Análisis sensorial de los germinados de las semillas de PLAI y UVC.....	86
7. Conclusiones	89
8. Recomendaciones	90
9. Bibliografía	91
8. Anexos	105
ANEXO 1 FORMATOS DE EVALUACIÓN SENSORIAL PARA SEMILLAS	105
ANEXO 2 FORMATOS DE EVALUACIÓN SENSORIAL PARA GERMINADOS DE SEMILLAS	106
ANEXO 3 FORMATO DE ENCUESTA PRE-EVALUACIÓN SENSORIAL	107
9. Evidencias de participación en congresos y publicaciones	108

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización física y fisicoquímica de semillas de alfalfa, trigo y chía.....	41
Tabla 2. Población total de mesófilos aerobios, mohos, levaduras y coliformes totales en semillas de alfalfa, trigo y chía.....	42
Tabla 3. Incrementos promedio de temperatura en las semillas tras los tratamientos con luz UVC y PLAI.....	46
Tabla 4. Inactivaciones totales de los microorganismos en semillas de alfalfa, trigo y chía, tras 180 min (UVC) ó 150 s (PLAI).....	51
Tabla 5. Tasas de fluencia (J/cm^2s) energética de los equipos utilizados y sus correspondientes tasas de energía aplicadas por gramo de muestra (J/s).....	52
Tabla 6. Covarianza entre temperatura ($^{\circ}C$) y reducción microbiana ($\log_{10} N/N_0$).	53
Tabla 7. Valores p obtenidos por ANOVA de una (UVC) y dos vías (PLAI), con $\alpha=0.05$	56
Tabla 8. Parámetros obtenidos de los modelos no lineales ajustados para las curvas de inactivación de BMN.....	62
Tabla 9. Parámetros obtenidos de los modelos no lineales ajustados para las curvas de inactivación de BMN.....	67
Tabla 10 Parámetros obtenidos de los modelos de superficie de respuesta para las semillas tratadas por luz UVC.....	76
Tabla 11. Parámetros obtenidos de los modelos de superficie de respuesta para las semillas tratadas por luz UVC.....	76
Tabla 12. Condiciones de procesamiento optimizadas a partir de los modelos de superficie de respuesta.....	78
Tabla 13. Valores de ΔE obtenidos para cambio de color de semillas tratadas con UVC (120 y 180 min) y PLAI (150 s; 5 y 10 cm).....	86
Tabla 14 Número de respuestas acertadas dadas por los panelistas no entrenados en la evaluación triangular de cada muestra.....	88

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cámara para tratamientos con luz UVC. Vista exterior (izquierda) e interior (derecha).....	30
Figura 2. Equipo SteriPulse PL Z-1000 modelo LH-840 donde se realizaron los experimentos de PLAI.....	32
Figura 3. Montaje experimental para las pruebas de parámetros de germinación de las semillas de trigo, alfalfa y chíá.....	35
Figura 4. Termografías de alfalfa durante la aplicación de (a) luz UVC, (b) PLAI a 5 cm de distancia de la lámpara y (c) PLAI a 10 cm de distancia de la lámpara, en los tiempos inicial, intermedio y final de cada tratamiento.....	44
Figura 5. Termografías de chíá durante la aplicación de (a) luz UVC, (b) PLAI a 5 cm de distancia de la lámpara y (c) PLAI a 10 cm de distancia de la lámpara, en los tiempos inicial, intermedio y final de cada tratamiento.....	44
Figura 6. Termografías de trigo durante la aplicación de (a) luz UVC, (b) PLAI a 5 cm de distancia de la lámpara y (c) PLAI a 10 cm de distancia de la lámpara, en los tiempos inicial, intermedio y final de cada tratamiento.....	45
Figura 7. Curvas de inactivación de bacterias mesófilas nativas (BMN), Salmonella Typhimurium y Listeria monocytogenes en trigo (●), alfalfa (◆) y chíá (▲).....	47
Figura 8. Semillas de alfalfa antes (superior izquierda y derecha) y después (inferior izquierda y derecha) de la presanitización por “método húmedo”.....	48
Figura 9. Semillas de trigo antes (superior izquierda y derecha) y después (inferior izquierda y derecha) de la presanitización por “método húmedo”.....	49
Figura 10. Curvas de inactivación de bacterias mesófilas nativas (BMN), S. Typhimurium y L. monocytogenes en semillas de alfalfa tratadas con luz UVC y PLAI a 5 ó 10 cm de distancia.....	55
Figura 11. Curvas de inactivación de bacterias mesófilas nativas (BMN), S. Typhimurium y L. monocytogenes en semillas de trigo tratadas con luz UVC y PLAI a 5 ó 10 cm de distancia.....	57

Figura 12. Curvas de inactivación de bacterias mesófilas nativas (BMN), <i>S. Typhimurium</i> y <i>L. monocytogenes</i> en semillas de chía tratadas con luz UVC y PLAI a 5 ó 10 cm de distancia.	59
Figura 13. Curvas de inactivación de BMN ajustadas a los diferentes modelos no lineales	61
Figura 14. Curvas de inactivación de <i>S. Typhimurium</i> ajustadas a los modelos de Weibull y Weibull modificado por Mafart et al. (2002).	65
Figura 15. Curvas de inactivación de <i>L. monocytogenes</i> ajustadas a los modelos de Weibull y Weibull modificado por Mafart et al. (2002).	66
Figura 16. Porcentaje de semillas germinadas de alfalfa, trigo y chía durante 5 días de experimento. Se comparan controles de semillas sin tratamiento vs semillas tratadas con 120 y 180 min de exposición a luz UVC. Letras mayúsculas diferentes, dentro del mismo tiempo de germinación indica diferencia significativa ($p < 0.05$).	69
Figura 17. Porcentaje de semillas germinadas de alfalfa, trigo y chía durante 5 días de experimento. Se comparan controles de semillas sin tratamiento vs semillas tratadas con 150 s a 5 y 10 cm de distancia. Letras mayúsculas diferentes, dentro del mismo tiempo de germinación indica diferencia significativa ($p < 0.05$).	70
Figura 18. Cinética de crecimiento de semillas germinadas de alfalfa, trigo y chía, tratadas con 0 (control), 120 ó 180 min de luz UVC. Las líneas punteadas representan la altura mínima deseada para cada semilla.	73
Figura 19. Cinética de crecimiento de semillas germinadas de alfalfa, trigo y chía, tratadas con 0 (control), ó 150 s a 5 y 10 cm de distancia de la fuente lumínica. Las líneas punteadas representan la altura mínima deseada para cada semilla.	74
Figura 20. Actividad antioxidante del radical DPPH en mg equivalentes de Trolox por 100 g de muestra en base seca de semillas y germinados tratados con 120 y 180 min de luz UVC. Barras naranjas indican semillas o germinados de alfalfa, verdes, de trigo y grises de chía. Los resultados son promedio y desviación estándar de 3 repeticiones. Letras iguales dentro del mismo color indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).	79
Figura 21. Actividad antioxidante del radical DPPH, en mg equivalentes de Trolox por 100 g de muestra en base seca, de semillas y germinados tratados con HILP. Barras naranjas	

indican semillas o germinados de alfalfa, verdes, de trigo y grises de chía. Los resultados son promedio y desviación estándar de 3 repeticiones. Letras iguales dentro del mismo color indica que no hay diferencias significativas ($p>0.05$). 80

Figura 22. Contenido de fenoles totales (TPC) de semillas y germinados de alfalfa (barras naranjas), trigo (barras verdes) y chía (barras grises) tratados con luz PLAI. Letras diferentes dentro del mismo grupo de color indican diferencias significativas ($p<0.05$). 84

Figura 23. Contenido de fenoles totales (TPC) de semillas y germinados de alfalfa (barras naranjas), trigo (barras verdes) y chía (barras grises) tratados con luz UVC. Letras diferentes dentro del mismo grupo de color indican diferencias significativas ($p<0.05$). 84

Figura 24. Respuestas de encuesta pre-evaluación sensorial. 87

Resumen

Se probaron tratamientos con luz ultravioleta de onda corta (UVC) con tiempos de exposición de hasta 180 min, y de pulsos de luz de alta intensidad (PLAI) de hasta 150 s, a 5 y 10 cm de distancia de la fuente lumínica, para reducir la población de bacterias mesófilas nativas (BMN) y de patógenos (*S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*) inoculados en semillas de alfalfa, trigo y chíá. Para garantizar la máxima exposición de todas las caras de las semillas a la energía emitida por los equipos de UVC y PLAI, se aplicó una agitación manual cada 10 min y cada 5 s, (respectivamente). El análisis estadístico de las termografías de las semillas, colocadas en charolas durante los tratamientos, indicó que el tiempo de tratamiento con UVC y la distancia y el tiempo de PLAI tienen efecto significativo ($\alpha < 0.05$) en el incremento de temperatura de las semillas tratadas.

Además, los tratamientos de luz UVC (120 y 180 min) no influyeron en la germinación ni en las tasas de crecimiento de los brotes de alfalfa y trigo ($p > 0.05$), pero sí afectaron el porcentaje de germinación de las semillas de chíá ($p < 0.05$). La aplicación de PLAI a 5 cm tuvo efecto significativo en el porcentaje de germinación de alfalfa y chíá; y en la cinética de crecimiento de chíá. Los datos de germinación y reducción fueron analizados mediante modelos empíricos y gráficos de superficie de respuesta, y se definieron parámetros (% de germinación y tasa de crecimiento) de germinación adecuados mediante la optimización de las variables de proceso (tiempo para luz UVC, y distancia para PLAI).

Por otro lado, la capacidad antioxidante y el contenido total de fenoles de semillas de alfalfa y chíá aumentaron significativamente ($p < 0.05$) después de los tratamientos con UVC. Además, los tratamientos con PLAI mostraron un aumento ($p < 0.05$) en la actividad antioxidante de trigo germinado. La evaluación colorimétrica en las semillas produjo valores de $\Delta E < 3$, correspondientes a cambios no detectables por el ojo humano, lo cual fue corroborado por medio de una prueba triangular con 30 jueces no entrenados.

En conclusión; tanto la aplicación de luz UVC y de PLAI son alternativas para la sanitización de semillas de alfalfa y trigo destinadas para germinados, y de semillas de chíá destinadas para consumo directo. Sin embargo, en general se obtuvieron mejores resultados mediante la aplicación de PLAI a 5 cm de distancia; excepto en la reducción de BMN en trigo, para las cuales la luz UVC tuvo los mejores resultados. Además, la aplicación de estas tecnologías mejoró la actividad antioxidante y contenido de fenoles de semillas de chíá y de germinado de trigo.

Abstract

UVC treatments with exposure times up to 180 min, and HILP up to 150 s at 5 and 10 cm distance from the light source were tested to reduce the native bacterial population (NBP) and inoculated pathogens (*S. Typhimurium* and *L. monocytogenes*) on alfalfa, wheat, and chia seeds. To guarantee maximum exposure of all the sides of the seeds to the energy emitted by the UVC and HILP equipment, manual shaking was included every 10 min and every 5 s, (respectively). The statistical analysis of the seed's thermography showed that the treatment time for UVC and the distance and time for HILP treatments have a significant effect ($\alpha < 0.05$) on the increase in seed temperature.

UVC light treatments (120 and 180 min) did not influence germination or growth rates of alfalfa and wheat sprouts ($p > 0.05$) but did affect chia's germination percentage ($p < 0.05$). The application of HILP at 5 cm had a significant effect on the germination percentage of alfalfa and chia; and in chia's growth kinetics. The germination and reduction data were analyzed by a response surface approach, and it was possible to ensure adequate germination parameters (germination and growth rates) by optimizing the process variables (time and distance for UVC and HILP, respectively).

On the other hand, the antioxidant capacity (DPPH) and the total phenol content of alfalfa and chia seeds increased significantly ($p < 0.05$), after UVC light treatments. In addition, HILP treatments showed an increase ($p < 0.05$) in the antioxidant activity of sprouted wheat. The colorimetric evaluation of the seeds obtained values of $\Delta E < 3$, meaning that the changes are non-detectable by the human eye. This was corroborated by means of a triangular test with 30 untrained judges.

In conclusion, both the application of UVC light and HILP are alternatives for the sanitization of alfalfa and wheat seeds intended for sprouting, and chia seeds intended for direct consumption. However, in general, better results were obtained by applying HILP at 5 cm; except for the reduction of BMN in wheat, for which UVC light had the best results. In addition, the application of these technologies improved the antioxidant activity and phenol content of chia seeds and wheat sprouts.

1. Introducción

El agitado estilo de vida actual y el interés público por consumir alimentos que favorezcan la salud han incidido en las preferencias de los consumidores incrementando el consumo de alimentos listos para consumir (“*ready to eat*”), frescos y mínimamente procesados. Bajo este panorama el consumo de germinados ha ganado popularidad debido a los beneficios proporcionados por sus propiedades nutricionales; por ejemplo, su alto contenido en vitaminas, minerales, fibra y antioxidantes; además de tener comprobadas propiedades anticolesterolémicas y anticancerígenas (Kim et al., 2019; Kumar et al., 2006).

Sin embargo, a pesar de sus beneficios, los germinados son una importante fuente de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA’s), y por lo tanto pueden representar un riesgo a la salud de sus consumidores. En los últimos 20 años se han reportado mundialmente más de 40 brotes de ETA’s relacionados con el consumo de germinados (Kim et al., 2019). En la mayoría de los brotes de ETAS’s registrados, se ha encontrado que las semillas suelen ser la fuente de contaminación del patógeno involucrado en la mayoría de los casos. Esto se debe a que, durante la producción y recolección de las semillas, estas se encuentran expuestas a diversos contaminantes microbiológicos, provenientes principalmente del suelo de cultivo y heces de animales (Rowan, 2019). Los principales patógenos relacionados a estos brotes han sido *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus* (Himathongkham et al., 2001; Kim et al., 2019; Kumar et al., 2006).

Así, con el objetivo de prevenir la ocurrencia de ETA’s en germinados, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) ha recomendado la desinfección de las semillas con una solución de 20,000 ppm de cloro libre en agua previo al proceso de germinación. Sin embargo, existen estudios que relacionan los tratamientos de desinfección con soluciones de cloro en agua con la formación de compuestos peligrosos como trihalometanos (THM), los cuales son conocidos carcinógenos (Gill et al., 2003; Kim et al., 2019). Aunado a esto, Gill et al. (2003) señalan que no existe información suficiente sobre la efectividad de este tipo de tratamiento químico para la inactivación de patógenos en semillas y por lo tanto para la prevención de enfermedades en el consumidor; de esta forma una

desinfección insuficiente explicaría la prevalencia de ETA's por consumo de germinados a pesar del uso de compuestos clorados previo al proceso de germinación.

Por otro lado; los tratamientos térmicos, a pesar de su eficiencia para inactivar microorganismos, pueden alterar componentes en la matriz alimentaria y producir radicales libres. Estos cambios pueden afectar la funcionalidad del alimento, así como su sabor, textura, color e incluso valor nutricional debido a la degradación de nutrientes como las vitaminas termolábiles, entre otros. Además, para el caso específico de semillas para germinados, un exceso de calor reduce el potencial de germinación de estas (Bhavya y Hebbar, 2017).

Esta problemática ha llevado a investigadores a investigar tecnologías no-térmicas que garanticen la inocuidad para el consumidor, sin que las propiedades nutritivas, funcionales y sensoriales de los germinados se vean afectadas significativamente (Bhavya y Hebbar, 2017). Estas tecnologías, llamadas “tecnologías emergentes”, ocupan métodos físicos para inactivar los microorganismos. Dentro de estas se encuentran los Pulsos de Luz de Alta Intensidad (PLAI) y la luz ultravioleta de onda corta (UVC).

Tanto los PLAI como la luz UVC tienen numerosas ventajas ya que preservan las características sensoriales y nutricionales de los alimentos además de haber demostrado ser efectivas en la inactivación de patógenos como *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejunii*, *Bacillus cereus*; hongos como *Aspergillus flavus*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus niger*, entre otros; y microorganismos deteriorativos en general; por lo que ambas tecnologías representan una alternativa de tratamiento para alimentos (Hwang et al., 2019; Kramer et al., 2017a; Singh et al., 2021)

Por lo anteriormente descrito, el presente proyecto busca aplicar las tecnologías de PLAI y luz UVC para la desinfección de semillas de alfalfa, trigo y chíá para germinados. A la par, se busca analizar el efecto de dichas tecnologías en la composición química y la capacidad de germinación de estas semillas; además de su efecto en las propiedades sensoriales del producto germinado.

2. Justificación

Los germinados de semillas son alimentos popularmente consumidos por sus propiedades nutricionales y beneficios a la salud. Sin embargo, cada año son responsables de brotes de ETA's alrededor del mundo, debido a que las semillas utilizadas para su producción se encuentran expuestas a diversos riesgos microbiológicos desde su origen en el campo.

Aunque habitualmente, antes de la producción del germinado, las semillas suelen ser enjuagadas con una solución de cloro en agua (20,000 ppm de cloro libre), la tendencia de brotes de ETA's por el consumo de germinados continúa al alza, indicando que este tratamiento puede ser insuficiente. Por otro lado, el empleo de tratamientos térmicos con el objetivo de sanitizar las semillas para germinados es inviable debido a que éstos producen cambios químicos y físicos que inactivan a la semilla impidiendo su posterior germinación.

Debido a esto, es necesario investigar una solución a este problema dentro tecnologías emergentes como los PLAI y la luz UVC; los cuales, a pesar de haber demostrado ser efectivos para la inactivación de patógenos, han sido muy poco estudiados sus efectos al ser aplicados en semillas para germinados. A la fecha sólo existen algunos estudios donde se ha investigado su efecto en la inactivación de flora nativa en semillas de pak choi, rábano, sésamo, trigo y arroz (Hwang et al., 2017; Kim et al., 2019; Wang et al., 2016); un menor número donde se han aplicado con el objetivo de inactivar patógenos como *Salmonella* spp y *E. coli* en semillas (Reyes-Jurado et al., 2019; Sharma & Demirci, 2003); y entre ellos todavía es aún más reducida, o casi nula la información sobre su efecto en la capacidad de germinación de las semillas y composición química en el germinado.

Es por ello por lo que la presente tesis doctoral busca investigar la aplicación de PLAI y luz UVC como alternativas tecnológicas que permitan la sanitización de semillas para germinados reduciendo microbiota nativa y patógenos como *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*. Así mismo, brindar información sobre el efecto de ambas tecnologías en los parámetros de germinación de las semillas y composición química de los germinados; información que hasta ahora no ha sido ampliamente descrita en otros estudios.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Evaluar la efectividad de los tratamientos con pulsos de luz de alta intensidad (PLAI) y luz UVC para la desinfección de semillas para germinados de trigo, alfalfa y chíá; así como el efecto de estas tecnologías en los parámetros de germinación y la actividad antioxidante de las semillas tratadas.

3.2. Objetivos específicos

- Evaluar la efectividad antimicrobiana de tratamientos con luz UVC, determinando y modelando la inactivación de la flora nativa y microorganismos patógenos inoculados (*S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*), en semillas de trigo, alfalfa y chíá; correlacionando el efecto del aumento de la temperatura en las semillas durante dichos tratamientos.
- Evaluar la efectividad antimicrobiana de tratamientos con PLAI, determinando y modelando la inactivación de la flora nativa y microorganismos patógenos inoculados (*S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*), en semillas de trigo, alfalfa y chíá; correlacionando el efecto del aumento de la temperatura en las semillas durante dichos tratamientos.
- Analizar los efectos de los tratamientos con luz UVC y PLAI aplicados a las semillas de trigo, alfalfa y chíá, en la germinación, capacidad antioxidante, contenido de fenoles totales y evaluación sensorial de germinados y semillas.

4. Marco Teórico

4.1. Semillas para germinados

Técnicamente, se define como germen o germinado (“*sprout*”, en inglés) al producto obtenido a partir del proceso de germinación de semillas y su desarrollo inicial en agua; y que es cosechado antes de la aparición de hojas verdaderas (Shomodder et al., 2022). En los últimos años, los germinados de semillas han sido centro de atención como alimentos funcionales debido a sus beneficios nutricionales (S. M. Kim et al., 2019; Kumar et al., 2006).

Lo anterior se debe a que, se ha demostrado que durante el proceso de germinación, su perfil nutricional y químico se ve modificado favorablemente resultando en vegetales tiernos con mayores propiedades nutricionales y mejor digestibilidad en comparación con la semilla (Aborus et al., 2018; Zhou et al., 2021). Como resultado, los germinados son ricos en vitaminas (como la E y la C), minerales, aminoácidos y fibra (Ding, Fu y Smith, 2013). Además, son abundantes en fenoles, flavonoides y glucosinolatos los cuales son antioxidantes que contribuyen a la preservación de la salud humana (Aborus et al., 2018); brindando beneficios a la salud por tener propiedades anticolesterolémicas, antiartríticas y anticancerígenas (S. M. Kim et al., 2019; Kumar et al., 2006; Melaku, 2021). En comparación con las semillas, los germinados tienen muy bajo contenido de compuestos antinutritivos, como los inhibidores de tripsina, ácido fítico y taninos; los cuales se ven reducidos durante el proceso de germinación (Dal Bosco et al., 2015)

En adición a esto, los bajos costos de producción y mínimos requerimientos de equipo e insumos han aumentado el interés de productores y consumidores, incrementando la popularidad de estos productos. Así, crece el interés por cada vez mayor número de semillas que se suman al mercado de otros germinados como los de alfalfa, soya, frijol mungo, brócoli, repollo rojo, alforfón y trigo (*wheat grass*) que tradicionalmente se han encontrado entre los más populares (Melaku, 2021; Shomodder et al., 2022).

A continuación, se mencionan algunos datos generales sobre dos de las semillas más populares para germinados: alfalfa y trigo, así como de la chía, cuya popularidad va en aumento dentro de los consumidores de germinados

4.1.1. Trigo

El trigo (*Triticum aestivum*) es uno de los tres cereales más cultivados, abarcando más del 25% del total de cereales producidos a nivel mundial y es el primer cereal que fue domesticado hace más de 10 000 años (Aborus et al., 2018; Shewry & Hey, 2015). La semilla de trigo proviene de la planta anual herbácea *Triticum aestivum*, la cual se caracteriza por tallos erectos con estructura de caña y una altura que va de 30 cm hasta 1.2 m. El grano o semilla proviene de la fecundación de la “or” o espiga (Shewry & Hey, 2015).

Las semillas de trigo son ricas en carbohidratos, pero también son fuentes de aminoácidos esenciales, especialmente lisina, y minerales. Además, contienen importantes cantidades de vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina y folatos) (Shewry, 2009; Shewry & Hey, 2015). Se ha comprobado también que contienen compuestos fenólicos, especialmente flavonoles que incluyen pigmentos como la proantocianidina y las antocianinas (Han et al., 2020). Por otro lado, el germen del trigo (comúnmente llamado “*wheatgrass*”) contiene altas cantidades de clorofila, vitaminas, especialmente vitamina C, minerales, aminoácidos, fibra dietética y compuestos biológicamente activos tales como los flavonoides, pero en mayores cantidades que la semilla (Han et al., 2020; Minocha et al., 2022). Estos últimos confieren al “*wheatgrass*” diversas actividades biológicas, como antioxidante, antiinflamatorio, antihiper glucémico, antiadipogénico, inmunomodulatorio, antialérgico y hepatoprotector (Ki et al., 2017; Poudel et al., 2015; Rajoria et al., 2017). Incluso algunos estudios *in vitro* apuntan a sus beneficios para mejorar la fertilidad (Eissa et al., 2020).

Cifras de FAOSTAT indican que en 2020 se produjeron 760,925,831 ton de trigo a nivel mundial; siendo Asia y Europa los principales productores con más de 600,000,000 toneladas producidas. La producción en México para este año ascendió a 2,986,689 ton en total (FAOSTAT, 2022). En cuanto al germen de trigo, la FAOSTAT indica que entre los años

2017-2019 se produjeron un total de 24,745,376 ton, siendo Asia y Países Bajos los principales productores; mientras que en México solo se registró una producción equivalente a 306,833 ton de germen de trigo en este mismo periodo de tiempo (FAOSTAT, 2022).

4.1.2. Alfalfa

La alfalfa (*Medicago sativa*) es una planta ampliamente cultivada, principalmente con fines forrajeros (Zhao et al., 2022). Su semilla contiene importantes cantidades de proteínas, carbohidratos complejos, fibra, vitaminas (A, B₃, B₅, B₉, E y K) (Alekseeva et al., 2017) y ácidos grasos con efectos anticolesterolémicos. Además de ser rica también en minerales como fósforo, calcio, potasio, sodio, magnesio, hierro, manganeso y zinc (Fiala & Pospíšil, 2012). Sin embargo, para consumo humano es popular en forma de germinado debido a la mejora en su calidad nutricional.

El germen de alfalfa contiene de 1,250 y 10 veces más vitamina A y C, respectivamente, que su semilla. De igual manera, la alfalfa germinada es rica en fitoestrógenos como el cumestrol, y en flavonoides como la liquiritigenina y la isoliquiritigenina (Dal Bosco et al., 2015; Hong et al., 2011). Otros compuestos bioactivos y antioxidantes como tocoferoles, carotenos, retinol, luteína y zeaxantina se encuentran también presentes en diferentes cantidades (Aloo et al., 2021; Dal Bosco et al., 2015). Además, un número diverso de compuestos fenólicos, como el ácido gálico y cafeico, flavonoides (apigenina, kaempferol, miricetina, naringina, quercetina, rutina, daidzeína y genisteína) se pueden encontrar en cantidades sustanciales (Fan et al., 2004).

Otros compuestos no fenólicos, como las saponinas desempeñan también funciones biológicas clave para el cuerpo (Cui et al., 2020). Se ha informado que las prosapogeninas y las sapogeninas ejercen un alto poder antimicrobiano, contra levaduras y cepas bacterianas (Dal Bosco et al., 2015). Los estudios también revelan que las saponinas pueden inhibir la colesterol-esterasa, la acetil coenzima y las enzimas carboxilasa, evitando así síntesis de ácidos grasos en el cuerpo (Amraie et al., 2015). La función inhibitoria de las saponinas sobre la síntesis de ácidos grasos ayuda a equilibrar la relación entre el colesterol de alta densidad (HDL) y colesterol de baja densidad (LDL) (Dal Bosco et al., 2015).

En conjunto, todos estos compuestos son responsables de los efectos antioxidantes, anti diabetes, antiobesidad, antiarteroesclerosis y antiinflamatorios atribuidos al consumo del germen de alfalfa (Dal Bosco et al., 2015).

En cuanto a su producción, cifras oficiales reportan una superficie total cosechada equivalente a 20, 270,413 ha a nivel mundial; sin embargo, la mayor parte de la producción es utilizada como alimento para ganado y no se tienen reportes sobre el porcentaje utilizado como semillas para germinado (FAOSTAT, 2022).

4.1.3. Chía

La chía (*Salvia hispánica* L.), es una planta nativa del sur de México y norte de Guatemala, donde ha sido cultivada desde tiempos precoloniales, siendo una de las principales fuentes de alimentación prehispánica junto con el maíz, frijol y amaranto. Sin embargo, históricamente su importancia radicó también en las propiedades curativas de sus aceites esenciales (Martínez-Cruz & Paredes-López, 2014; Reyes-Caudillo et al., 2008).

La semilla de chía es de forma ovoide, ligeramente aplanada y de aproximadamente un par de milímetros de largo, con un color pardo oscuro o blanco (Valdivia-López & Tecante, 2015). En cuanto a composición, es rica en fibra y proteínas además de ácidos grasos. Su contenido de aceites varía entre 25-35% con altas concentraciones omega-3 (60%) y linolénico (20%). También contiene importantes cantidades de escualeno y fitoesteroles los cuales tienen efectos hipocolesterolémicos y anticarcinogénicos (Álvarez-Chávez et al., 2008; Martínez-Cruz y Paredes-López, 2014; Reyes-Caudillo et al., 2008; Song et al., 2018). Adicionalmente, se ha reportado que la semilla de chía es buena fuente de niacina, vitamina A y vitamina C (Valdivia-López y Tecante, 2015).

Los beneficios nutricionales de la chía han contribuido a incrementar su consumo como parte de ensaladas, batidos, “*topping*” en yogurt o como complemento alimenticio en polvo, así como aditivo para fortificar alimentos como galletas y panes por su alto contenido de omega-3, antioxidantes, proteínas, vitaminas, minerales y fibra dietética (Martínez-Cruz & Paredes-López, 2014).

Actualmente, la chía es cultivada con fines comerciales en México, Bolivia, Argentina, Ecuador y Guatemala (Martínez-Cruz & Paredes-López, 2014). Sin embargo, el principal centro productor de chía a nivel mundial continúa siendo México donde en el periodo comprendido entre 2019 y 2021 se cultivó un total de 13,191,590 ton, principalmente en los estados de Jalisco, Zacatecas y Puebla (SIAP, 2022).

4.2. Riesgos microbiológicos asociados al consumo de germinados

Las principales fuentes de contaminación de las semillas se presentan durante la precosecha y son todas aquellas a las que la semilla se encuentra expuesta durante su cultivo; como el agua de irrigación, heces de animales, excretas de aves, estiércol de ganado en abonos orgánicos y la propia calidad microbiológica del suelo de cultivo. Todas estas fuentes exponen a la semilla a un amplio rango de contaminación por microorganismos patógenos (Martínez-Villaluenga et al., 2008; Willis et al., 2009; Yang et al., 2013).

Durante la producción, los microorganismos patógenos se introducen en la flora microbiana de las semillas de diferentes maneras. La práctica frecuente del uso de estiércol como fertilizante representa una opción barata y fácil para mejorar la calidad del suelo; sin embargo, el estiércol puede contener bacterias patógenas como *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp. las cuales son introducidas al suelo y después, por diversos factores pueden migrar al producto (Yang et al., 2013). Cuando animales domésticos y salvajes tienen fácil acceso al cultivo, la probabilidad de contaminación por patógenos aumenta por la presencia de heces de estos animales. Bacterias patógenas como *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* O157:H7 pueden sobrevivir en restos de heces y en el suelo de cultivo por periodos prolongados de varios meses (Bolton et al., 2012).

Por otro lado, algunas características propias de la planta, como su altura, son también importante. Por ejemplo, las semillas de girasol suelen tener mejor calidad microbiológica debido a que la mata puede medir hasta 2 m de altura. Esta distancia del suelo le da una ventaja en comparación con semillas cuya planta en la que crecen tiene menor altura y por lo tanto la semilla se encuentra más cercana al suelo, como por ejemplo la semilla de chía o de alfalfa (Tamber et al., 2016; Willis et al., 2009).

Otro punto crítico dentro del proceso de producción de semillas es el momento de la cosecha. Esto debido a que, durante este proceso, son expuestas al suelo aumentando el riesgo de contaminación. Así mismo, el equipo utilizado durante la cosecha también juega un papel importante como factor de contaminación así como el sitio de almacenamiento de las semillas (Yang et al., 2013). Además, cuando las semillas son puestas a germinar, se remojan en agua, la cual puede ser otro vehículo de patógenos, y son mantenidas en condiciones de elevada humedad y temperatura de incubación (20-40°C) constante por periodos de 2 a 7 días. Aunado a la liberación de nutrientes durante este proceso, as condiciones de humedad, temperatura, condiciones aeróbicas, pH, ideales para la germinación son también propicias para el desarrollo de muchos tipos de microorganismos incluyendo patógenos (Weiss, Hertel, Grothe, Ha y Hammes, 2007; Stewart, Reineke, Ulaskez y Tortorello, 2001).

Es por este motivo, que la etapa de germinación es crítica en el desarrollo de contaminación bacteriana ya que algunas bacterias presentes en la semilla pueden internalizarse en los tejidos durante su germinación (Thomas, Palumbo, Farrar, Farver y Cliver, 2003; Yang et al., 2013). Diversos estudios han demostrado que la carga microbiana en las semillas suele estar entre 10^3 y 10^6 UFC/g, y que esta recuento puede incrementar entre 10^2 y 10^3 UFC/g durante el primer día de germinación de las semillas alcanzando poblaciones de hasta 10^9 UFC/g durante el periodo de germinación completo (Bari et al., 2009; Martínez-Villaluenga et al., 2008; Weiss et al., 2007; Yang et al., 2013).

De 1996 a la fecha (noviembre de 2022) se han registrado más de 50 brotes de ETA's relacionadas con el consumo de germinados en EUA. En la mayoría de los casos, las semillas son reconocidas como la fuente de contaminación microbiana presente en el producto final. De acuerdo con información consultada en la base de datos del CDC (Centro para el Control de Enfermedades, por sus siglas en inglés), la alfalfa es la principal semilla involucrada en los brotes registrados en la última década. Igualmente se observa que los factores etiológicos comúnmente asociados con estos brotes son *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y con menor frecuencia *Bacillus cereus* (Adhikari et al., 2015; Bari et al., 2009; CDC, 2020; Stewart et al., 2001; Willis et al., 2009).

Para prevenir riesgos, la *Food and Drug Administration* (FDA) recomienda a los consumidores cocinar los germinados para inhibir o eliminar la presencia de bacterias (Weiss et al., 2007; Yang et al., 2013). Sin embargo, su consumo en crudo sigue siendo popular debido a que las temperaturas de cocción afectan nutrientes como los glucosinolatos, los cuales se ha demostrado que son potentes antioxidantes y que pueden inducir la apoptosis o muerte celular de células cancerígenas (Bellostas et al., 2007).

4.3. Métodos de desinfección de semillas para germinar

A partir del año 1999, la FDA ha emitido varios documentos guía para asegurar la producción de semillas seguras para su consumo. Entre sus recomendaciones se encuentran la implementación de buenas prácticas de agricultura y manufactura, desinfección de semillas, así como el muestreo de cada lote de producción para asegurar la ausencia de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7. En el caso específico de las semillas para germinados, el agua de irrigación durante el proceso de germinado se ha considerado un buen indicador del perfil microbiológico de los germinados, y por eso es frecuentemente utilizada para su monitoreo y análisis en lugar del producto final o germinado (Stewart et al., 2001).

Sin embargo, a pesar de estas recomendaciones, la prevalencia de ETA's por consumo de semillas tanto secas como en germinados incrementa, lo que indica un área de oportunidad importante en el aseguramiento de la inocuidad de estos alimentos por lo que algunos investigadores han buscado resolver esta problemática mediante el estudio y aplicación de nuevas tecnologías que aseguren una sanitización efectiva, que conserve las características nutricionales y sensoriales de las semillas (Himathongkham et al., 2001; Kim et al., 2019; Yang et al., 2013), a parte de los métodos tradicionalmente utilizados con este propósito.

4.3.1. Tratamientos químicos

En general, el cloro en sus diferentes formas (cloro, dióxido de cloro, hipoclorito de sodio o de calcio), ha sido el agente químico más ampliamente utilizado para la sanitización de productos frescos. Incluso, para el caso específico de las semillas para germinados, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO por sus siglas en inglés), ha recomendado tratamientos con 20,000 ppm de cloro libre, proveniente

de hipoclorito de calcio, durante 15 min para reducir el tamaño de la población microbiana (Yang et al., 2013).

El cloro es el agente químico más ampliamente utilizado para sanitizar productos frescos. Para el caso específico de las semillas para germinados, la FDA recomienda el uso de soluciones de 20,000 ppm de cloro activo, como hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$), durante 15 min. Además de esto, recomienda monitorear la calidad microbiológica del agua de irrigación para mitigar los riesgos de ETA's en relación al consumo de germinados (Yang et al., 2013b).

Probablemente, debido a lo anterior, diversos brotes de ETA's han puesto en duda la efectividad de las 20,000 ppm de hipoclorito de calcio para el tratamiento de semillas. Un brote de *Salmonella* Kottbus en germinados de alfalfa fue ligado a semillas que habían pasado por previa sanitización con este químico. Otro brote de *Salmonella* Typhimurium fue igualmente asociado a semillas previamente sanitizadas con este método. Estudios derivados de estos casos indicaron que los productores que desinfectaban sus semillas con este método tenían menos casos atribuidos a sus productos en comparación con los que no lo realizaba; pero el paso de sanitización no eliminaba por completo los incidentes (Montville y Schaffner, 2004). De igual manera, existen estudios que han demostrado que este tratamiento es incapaz de prevenir el resurgimiento de poblaciones de *E. coli* O157:H7 y de *Salmonella* Typhimurium durante la germinación de semillas inoculadas (Feng et al., 2007; Stewart et al., 2001).

De manera alternativa, los productores pueden utilizar cualquier otro método de sanitización que demuestre una reducción equivalente a 5 log UFC/g (Montville y Schaffner, 2004). Por ello, se han estudiado gran número de métodos químicos para la desinfección de semillas, utilizando diversos agentes químicos como, agua electrolizada, ozono y otros compuestos ácidos (Yang et al., 2013); aunque se ha demostrado que los métodos químicos suelen tener resultados altamente variables (Ding et al., 2013).

Así mismo, en EUA se permite la utilización de dióxido de cloro (ClO_2) y ozono en una concentración máxima de 3 ppm para reducir o eliminar patógenos. Sin embargo, algunos

estudios han reportado que estas concentraciones no son efectivas para eliminar patógenos de las semillas (Adhikari et al., 2015). Por ejemplo, la dosis efectiva para la reducción de *E. coli* O157:H7 inoculado en semillas de alfalfa para germinado se encuentra por arriba de la concentración permitida, requiriendo por lo menos 3 ppm (Sharma et al., 2002).

Las semillas de alfalfa inoculadas con *Salmonella* Stanley, y tratadas con 20,000 ppm de hipoclorito de calcio durante 10 min a temperatura ambiente tuvieron una reducción de más de 10^5 UFC/g de la población inoculada, hasta alcanzar niveles no detectables; pero durante la etapa de germinación, la población de este microorganismo alcanzó rápidamente cuentas superiores a 10^7 UFC/g en germinados de 2 días (Gandhi y Matthews, 2003). Otro estudio reportó que las semillas de alfalfa inoculadas con *E. coli* O157:H7, tratadas por 15 min a temperatura ambiente, alcanzaron una reducción hasta niveles no detectables; pero estos mismos niveles incrementaron hasta 10^8 UFC/g durante la etapa de germinación, por lo que concluyeron que el tratamiento no logró garantizar la muerte total de los patógenos presentes en la semilla (Lang et al., 2000). Por otro lado, la desinfección de semillas para germinados inoculadas con *Listeria monocytogenes* mediante la aplicación de tratamientos de ozono durante 10 y 20 minutos con una concentración inicial de 21.8 µg/mL no causó una reducción significativa en la población de *L. monocytogenes* (Wade et al., 2003).

Así, tras un análisis de la literatura existente sobre los métodos químicos de sanitización de semillas, se puede concluir que no existe uniformidad en los estudios realizados sobre sanitización de semillas para germinados y muchos de ellos incluso han demostrado no ser efectivos en la reducción de patógenos como *Salmonella* o *Listeria* (Montville y Schaffner, 2004). Una inactivación parcial o ineficiente de patógenos en las semillas es de crítica relevancia debido a que estos pueden crecer nuevamente hasta alcanzar niveles significativos de población en el germinado; representando una desventaja de este método (Stewart et al., 2001).

4.3.2. Tratamientos térmicos

La temperatura juega un rol vital en la afección de los mecanismos de supervivencia de los microorganismos patógenos, por lo que los tratamientos térmicos son efectivos para

incrementar la seguridad microbiana de las semillas, dado que la temperatura juega un rol vital en la afección de los mecanismos de supervivencia de los microorganismos. Debido a esto se han realizado diversos estudios sobre la eficacia de dos tipos de tratamiento térmicos: calor seco y calor húmedo para la inactivación de patógenos (Yang et al., 2013).

Las principales variables de control en este tipo de tratamientos son la temperatura y el tiempo, las cuales dependen de factores como el tipo de semilla, su composición y, microorganismo patógeno que se busque inactivar (Yang et al., 2013). Estos tratamientos se pueden clasificar en base al medio y fuente de calor ya sea seco o húmedo. El calor seco es propicio para las semillas de consumo directo, mientras que el calor húmedo se ha estudiado principalmente en semillas para germinados.

En el caso particular de las semillas de consumo directo (secas), uno de los puntos críticos para el control de su calidad microbiológica se encuentra dentro del proceso de deshidratación de las semillas. Cuando es pertinente, un tratamiento térmico en seco, como parte del proceso de secado es deseable. En algunos estudios se ha encontrado que las temperaturas óptimas de secado se encuentran entre 60 y 80°C. Sin embargo, si la temperatura utilizada está más cercana a los 60°C, se requiere mantenerla por largos periodos de tiempo para asegurar una reducción significativa en el número de organismos patógenos (Willis et al., 2009).

El tratamiento de semillas a temperaturas alrededor de 50°C por periodos prolongados de tiempo, que van de varias horas a días, ha resultado en eficacias variables en la desinfección de estas (Ding et al., 2013). Un estudio reciente estableció que una temperatura de 50°C es adecuada para la inactivación de *E. coli* O157:H7 en diversas semillas, siempre y cuando se mantenga a por periodos superiores a 17 h. Esto lo convierte en un método costoso y poco práctico debido a la cantidad de energía invertida, así como el tiempo utilizado cuando es utilizado por sí solo (Bari, Nei, et al., 2009).

Hu, Churey y Worobo (2004), reportaron una reducción de 10^5 UFC/g de *E. coli* y de 10^3 UFC/g de *Salmonella* en frijol mungo, utilizando una temperatura de 55°C. De manera similar Feng, Churey y Worobo (2007) lograron reducciones de 10^2 y 10^8 UFC/g

respectivamente para *Salmonella* y *E. coli* O157:H7, pero utilizando semillas de alfalfa, y tiempos de hasta 6 días (Feng et al., 2007; Hu et al., 2004). Esto indica que es difícil estandarizar las variables de control ya que la respuesta dependerá, en gran medida, de la composición y estructura de la semilla utilizada, así como del mecanismo de supervivencia aplicado por el patógeno objetivo.

Otra desventaja de los tratamientos térmicos, además del tiempo y energía invertidos, es la deterioración de nutrientes. En el caso del tostado de semillas para consumo directo, se llevan a cabo una serie de reacciones de oscurecimiento que implican una degradación de nutrientes, a pesar de mejorar sus propiedades sensoriales (Song, Joung, Shin y Kim, 2018).

Los lípidos, componentes importantes de las semillas, determinan las características fisicoquímicas y nutricionales y pueden ser modificadas durante el tostado provocando pérdida de componentes funcionales como por ejemplo los omega-3 por la oxidación de estos (Álvarez-Chávez et al., 2008; Yoshida, Hirakawa y Abe, 2001).

Yoshida et al. (2001) estudiaron la pérdida de nutrientes de semillas de girasol durante el tostado a diferentes tiempos. En sus resultados encontraron relación entre la temperatura alcanzada por la semilla y la pérdida de nutrientes, principalmente tocoferoles, vitaminas liposolubles y ácidos grasos esenciales como el linoleico. En un estudio realizado en chíá sobre el efecto del tostado a diferentes temperaturas (160-200 °C) por 5 a 15 min, se demostró que la capacidad de retención de agua de la semilla cambió rápidamente a los 180°C lo que indica cambios en la estructura de la semilla, así como cambios en componentes químicos. (Song et al., 2018).

Por otro lado, un tratamiento rápido a temperaturas superiores a los 90°C durante 90 s, seguidos de un choque térmico, a 0°C por 30s, mejoró la desinfección en comparación con los tratamientos a menores temperaturas y tiempos más prolongados (Bari, Inatsu, Isobe y Kawamoto, 2008). Sin embargo, debido a la disminución en las tasas de germinación en temperaturas mayores a 75°C, este método no es aplicable para su uso en semillas para germinados (Bari, Sugiyama, et al., 2009), pero podría utilizarse para semillas de consumo directo.

En muchos casos, la combinación entre diferentes tipos de tratamiento puede llevar no sólo a mejores resultados en la inactivación microbiológica, sino también en cuanto a la preservación de las características sensoriales y nutricionales propias del producto. Por ejemplo, la combinación de tratamientos prolongados (17 h) de calor seco a 50°C con tratamientos químicos (1% ácido oxálico, 0.03% ácido fítico, 50% etanol) dio como resultado la reducción a niveles no detectables de *E. coli* O157:H7 inoculada en semillas de alfalfa (mayor a 10^5 UFC /g), rábano, brócoli, sin comprometer la calidad sensorial de sus germinados. Sin embargo, estas mismas condiciones no fueron suficientes para eliminar completamente el patógeno en semillas de alfalfa y rábano, en cuyos germinados se alcanzó una población de 10^7 UFC /g de *E. coli* O157:H7 posterior a su germinación. La aplicación de calor seco bajo estas condiciones más una dosis de irradiación de 1.0 kGy eliminó por completo la población de *E. coli* O157:H7 en semillas de rábano y frijol mungo, mientras que una radiación mínima de 0.25 kGy fue suficiente para eliminar el patógeno en las semillas de brócoli y alfalfa. La combinación de calor seco con radiación a dichas dosis, no afectó significativamente la tasa de germinación de las semillas de alfalfa, brócoli o rábano, pero sí disminuyó el tamaño de los brotes de frijol mungo (Bari, *et al.*, 2009)

Por otra parte, los tratamientos con calor húmedo pueden emplear agua caliente o vapor de agua. La desinfección con agua caliente fue uno de los primeros tratamientos estudiados y aplicados para la sanitización de semillas para germinados; sin embargo, este tipo de tratamientos muestra una pérdida de viabilidad de la semilla cuando se utilizan tiempos y temperaturas elevadas (Yang *et al.*, 2013). Los tratamientos con calor húmedo pueden ser aplicables, de igual manera, en el germinado; tal como ha sido demostrado en algunos estudios (Pao, Kalantari y Khalid, 2008).

4.3.3. Tecnologías Emergentes

Dentro de este grupo de tecnologías, que aparecieron el siglo pasado, se han realizado estudios con tratamientos físicos, no térmicos, aplicados en semillas con el objetivo de asegurar su inocuidad y reducir la presencia de microorganismos patógenos en estas. Entre los métodos aplicados en algunas semillas se encuentran, por ejemplo, la aplicación de altas presiones hidrostáticas, irradiación, tratamientos con dióxido de carbono supercrítico (SC-

CO₂), pulsos de luz de alta intensidad (PLAI), luz UV de onda corta, entre otras tecnologías (Erdoğdu & Ekiz, 2011, 2013; Kim et al., 2020). A continuación, se hablará únicamente sobre los pulsos de luz de alta intensidad (PLAI) y la luz ultravioleta de onda corta (UV-C), por ser las tecnologías que se aplicarán durante el desarrollo de la presente tesis doctoral y porque además entre las tecnologías emergentes no han sido ampliamente estudiadas en semillas para para germinados, lo que se traduce en un vacío de conocimiento en esta área.

4.3.3.1. Pulsos de Luz de Alta Intensidad (PLAI)

Los PLAI utilizan pulsos de luz de amplio espectro ricos en luz ultravioleta de onda corta (UVC) para la descontaminación de superficies y son más eficientes para la sanitización de alimentos que los tratamientos convencionales con luz UV-C (Demirci & Keklik, 2012; Gómez-López et al., 2007).

El tratamiento con PLAI es un método no químico y se considera también un tratamiento no térmico cuando es aplicado por cortos periodos de tiempo. Los PLAI se producen almacenando la energía eléctrica y la potencia en un capacitor por fracciones de segundo para ser liberados en un pulso de duración equivalente a una millonésima de segundo. El resultado es una potencia elevada durante el ciclo con un gasto moderado en el consumo de energía (Fernández Molina et al., 2001; Gómez-López et al., 2007; Rowan, 2019).

En un sistema de PLAI, una lámpara de gas xenón energizado emite pulsos intensos de luz con un espectro de luz continua que va de UV-C al infrarrojo. La luz emitida, con altos picos de poder, posee longitudes de onda entre 200 y 1100 nm de la cual el infrarrojo contribuye con aproximadamente 30%, luz visible el 25% y luz UV entre 25% y 45%, por lo que los pulsos de luz emitidos son particularmente ricos en luz UV (Heinrich et al., 2016). Durante cada pulso, la intensidad de la luz es de unas 200,000 veces la intensidad de la luz en la superficie terrestre (Demirci & Keklik, 2012; Fernández Molina et al., 2001) Se ha observado que un solo pulso con mayor fluencia es considerado más efectivo que un número mayor de pulsos con una fluencia más baja (Heinrich et al., 2016).

El principal mecanismo de acción de los PLAI es el daño efectuado por los fotones de luz en el ADN de los microorganismos. Los efectos antimicrobianos por las longitudes de onda

utilizadas en el tratamiento con PLAI, son principalmente mediados a través de la absorción de sistemas conjugados de dobles enlaces carbono-carbono en proteínas y ácidos nucleicos (Fernández-Molina et al., 2001).

Sin embargo, para el caso de los PLAI, los efectos para la inactivación de microorganismos no se limitan al daño fotoquímico al ADN microbiano. Se ha propuesto que parte de su acción se debe a cierto efecto fototérmico y fotofísico en la célula microbiana (Demirci y Keklik, 2012; Fine y Gervais, 2004).

Una fluencia mayor a 0.5 J/cm^2 causa el sobrecalentamiento temporal y subsecuente ruptura celular sin incrementar significativamente la temperatura de la matriz alimentaria (Heinrich et al., 2016). Este fenómeno es causado por el estrés térmico ocasionado por la diferencia entre la absorción de la luz pulsada por un microorganismo y el medio circundante, lo cual causa la vaporización del agua en la célula bacteriana y lleva a cabo la ruptura de la célula. Dicho efecto es inducido principalmente por los componentes en el espectro UV dentro del pulso de luz (Demirci & Keklik, 2012).

Aunado a estos efectos fotoquímicos y fototérmicos, los PLAI, por su naturaleza policromática de alta intensidad, pueden promover reacciones que produzcan la formación de radicales causando la generación de químicos germicidas como el ozono, radicales hidroxilo o peróxido de hidrógeno (Demirci y Keklik, 2012; Fine y Gervais, 2004; Krishnamurthy et al., 2007).

Los parámetros de proceso, más importantes a considerar en la aplicación de PLAI en semillas son:

La tasa de fluencia (W/m^2): Describe la potencia radiante total incidente desde todas las direcciones que es recibida por una pequeña esfera dividida por el área de la sección transversal de esa esfera.

Fluencia, F (J/m^2): Describe la energía total recibida en la matriz alimentaria por unidad de área durante el tiempo que dura el tratamiento (en segundos).

Número de pulsos (n): El número de pulsos aplicados durante el tratamiento

Duración de pulso, t (s): La duración de un pulso, intervalo de tiempo en la cual la energía es liberada de la fuente de luz.

Tiempo de exposición (s): El tiempo total del tratamiento. Es igual al producto del número de pulsos (n) por la duración del pulso (t).

Frecuencia (Hz): También llamada tasa de repetición de pulso, o pulsos por segundo. Es el número de pulsos generados en un segundo.

Peak power (W): Describe la proporción del pulso de energía respecto de su duración

Densidad de energía por pulso (mJ ó J): Es la cantidad de energía del pulso depositada por cm^2 de la superficie del alimento, durante la duración del pulso (Luksiene et al., 2007).

Dosis total (D): El producto de la energía de un pulso por el número de pulsos durante el tratamiento completo (Luksiene et al., 2007).

A pesar de ser una tecnología que está siendo ampliamente investigada, aún no existen suficientes estudios sobre su aplicación en semillas para la inactivación de patógenos (Gómez-López et al., 2007). Uno de los primeros estudios, realizado por Sharma y Demirci, (2003), demostró que un tratamiento por 90 s a una distancia de 8 cm de la fuente logró una reducción mayor a 10^4 UFC/g en semillas de alfalfa inoculadas con *E. coli* O157:H7. El modelo matemático desarrollado en este estudio permitió optimizar el proceso para lograr obtener una reducción teórica de hasta 8 ciclos logarítmicos del patógeno estudiado; sin embargo, estas condiciones optimizadas no fueron comprobadas experimentalmente. Este estudio cobra relevancia pues también demostró que el grosor de la muestra es un factor importante, dado que una de las variables de estudio fue el grosor de la capa de semillas de alfalfa. Los resultados mostraron que este factor afecta significativamente, haciendo el tratamiento más efectivo a medida que la capa de muestra es más delgada.

Kim et al. (2019), estudiaron la aplicación de PLAI en semillas de rábano y pak choi para la reducción de la cuenta bacteriana de estas semillas. Las condiciones del tratamiento incluyeron una distancia fija de 20 cm de la fuente lumínica y tiempos entre 0-180 s (fluencia de 0 a 37.80 J/cm^2). El tiempo de 180s brindó la mejor inhibición bacteriana con una

reducción de 1.41 log UFC/g de mesófilos aerobios en las semillas de rábano, y 1.78 ciclos log UFC/g en las semillas de pak choi. Ninguna de las condiciones mostró un efecto significativo en la tasa de germinación de las semillas. Sin embargo, el mayor efecto inhibitorio de bacterias se dio en una fluencia mayor al límite máximo permitido por la FDA (12 J/cm²) (Kim et al., 2019).

Hwang, Cheigh y Chung, (2017), estudiaron la aplicación de esta tecnología para la descontaminación de semillas de sésamo, obteniendo reducción máxima de 1.46 ciclos log UFC/g en semillas cuya carga inicial de mesófilos aerobios se encontraba entre 10⁴-10⁵ UFC/g, con 120 s de tratamiento. Una de las complicaciones que presenta este método en su aplicación, está relacionada con el tipo de equipo disponible; en los cuales resulta complicado asegurar la distribución uniforme de los pulsos de luz por todas las caras del alimento. Es por ello que el estudio realizado por Hwang et al. (2017) resulta valioso ya que, además, propone un diseño de equipo de flujo continuo para la aplicación de los PLAI. Sin embargo, se requieren más estudios en equipos con este diseño para comprobar si existe una diferencia significativa en su efecto descontaminante para el caso específico de semillas (Hwang et al., 2017).

Reyes-Jurado et al. (2019), aplicaron la tecnología de PLAI en semillas de chía inoculadas con *Salmonella* Typhimurium, obteniendo una reducción de 10⁴ UFC/g con un tratamiento de 15 s (19.35 J/cm²). La relevancia de este estudio se debe a que la chía es una semilla cuya desinfección por otros métodos es complicada, ya que una elevada humedad produce la absorción de agua por parte del mucílago contenido en la semilla; lo que lleva a una alteración en las características fisicoquímicas y sensoriales en la semilla. Esto es un claro ejemplo de que los PLAI pueden ser una novedosa alternativa para la desinfección de semillas sin producir cambios en sus propiedades.

Por otro lado, el uso de PLAI tiene algunas desventajas. Tal vez la principal de estas es el “efecto de sombra” que tienen algunas superficies rugosas o porosas en los alimentos. Debido a esto, las bacterias encuentran refugio en la topografía característica del alimento, lo que lo hace menos efectivo. Tratamientos prolongados pueden producir un calentamiento en el

producto de acuerdo con su composición, lo que podría afectar la composición y características de textura del producto (Gómez-López et al., 2007; Sharma Demirci, 2003).

Se ha reportado que la Luz Pulsada de Alta intensidad puede inducir la oxidación de lípidos y cambios en color en los alimentos, así como alteraciones en materiales de plástico en empaques. Sin embargo, comparado con la aplicación de luz UV-C continua, las reacciones de oxidación son limitadas debido a la corta duración y bajo número de los pulsos (Demirci & Keklik, 2012; Keklik et al., 2012).

En EUA, la FDA aprobó el tratamiento de alimentos con Luz Pulsada en el año 1999 para la producción, procesamiento y manejo de alimentos. La dosis acumulada permitida de UV de acuerdo con esto es de hasta 12 Jcm^{-2} con el espectro de emisión entre 200 y 1100 nm (Rowan, 2019).

4.3.3.2. Luz UVC

La luz UV se define como la radiación dentro del espectro electromagnético correspondiente a longitudes de onda entre 100 a 400 nm. Se clasifica en cuatro diferentes tipos, según su longitud de onda; UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315nm), UV-C (200-280 nm) y UV vacío (100-200 nm). Dentro de estos cuatro tipos, la luz UV-C es la responsable de causar daños en la estructura del ADN de los microorganismos por la formación de dímeros de pirimidina en el ADN microbiano. La formación de estos compuestos impide a la célula microbiana su reproducción al bloquear la replicación del ADN (Singh et al., 2021).

La inactivación de microorganismos es causada principalmente por las reacciones fotoquímicas que toman lugar cuando los fotones en el rango de luz UV son absorbidos por los constituyentes microbianos. Los fotones, partículas elementales de la luz, cargan una alta cantidad de energía por lo que tienen la habilidad de romper o formar enlaces químicos. En el caso de las células microbianas, las reacciones químicas inducidas por los fotones ocurren principalmente en la estructura de las proteínas de ADN. La luz UV induce el rompimiento de la cadena de ADN, el entrecruzamiento de las hebras de ADN, hidratación de las pirimidinas y formación de dímeros de pirimidinas entre residuos adyacentes (Demirci & Keklik, 2012; Kramer et al., 2017).

En las reacciones fotoquímicas, los enlaces químicos se disocian cuando la energía de un fotón dependiente de la longitud de onda es por lo menos igual a la energía del enlace molecular sobre el cual la luz incide. Al tener fotones con alta energía, la luz UV es capaz de disociar un gran número de enlaces químicos produciendo nuevas especies químicas (Demirci y Keklik, 2012).

Las tecnologías con luz UVC representan un enfoque no químico, no térmico, sencillo y de bajo costo para la desinfección, que además requiere poco mantenimiento. Por este motivo se consideran una alternativa prometedora para los tratamientos térmicos tradicionales. Su aplicación incluye la pasteurización de jugos y superficies de contacto con alimentos (Demirci y Keklik, 2012; Koutchma, 2008).

En Estados Unidos, la FDA y el Departamento de Agricultura (USDA) concluyeron que el uso de radiación UV es completamente segura, por lo que en el año 2000 la FDA aprobó su uso como tratamiento alternativo a la pasteurización térmica de jugos frescos. El criterio de operación definido por la FDA en el caso del procesamiento de jugos es una reducción de 10^5 UFC/g en el número del patógeno objetivo (Koutchma, 2008). Sin embargo, a pesar de haber sido aprobado su uso para jugos, aún no existe un marco normativo que hable sobre su aplicación en semillas u otro tipo de alimentos sólidos, por lo que generar información a este respecto podría proporcionar el marco de referencia apropiado para impulsar su normatividad.

A pesar de su eficacia para desinfectar superficies lisas, existen relativamente pocas aplicaciones de esta tecnología en la industria de procesamiento de los alimentos. El restringido rango de equipo comercialmente disponible para desinfectar sólidos puede ser el principal factor que contribuye a su limitado uso. Adicionalmente la mayor parte de los datos disponibles sobre la inactivación microbiana utilizando esta tecnología, fue obtenida en suspensión acuosa o en aire. De igual manera, pueden ocurrir interacciones complejas entre los microorganismos y la superficie del material, como efectos de ensombrecimiento del rayo incidente de luz UV, por lo que la eficacia de la luz UV dependerá también de la estructura y topografía de la superficie (Koutchma, 2008).

5. Metodología

5.1. Materiales y caracterización

Las semillas de trigo, alfalfa y chíá fueron adquiridas en una tienda especializada en semillas de la ciudad de Puebla y se almacenaron a temperatura ambiente en frascos herméticos a temperatura ambiente.

5.1.1. Caracterización física y fisicoquímica

5.1.1.1. Morfología

Se realizó una caracterización física de las semillas, midiendo manualmente con un vernier calibrado con una precisión de 0.01 mm el largo y el diámetro de 50 semillas de alfalfa, trigo y chíá. Se calculó el diámetro y el largo equivalente del área proyectada mediante la Ecuación 1; y éstos fueron utilizados para el cálculo del área proyectada de acuerdo con la Ecuación 2, donde, a es la mitad del largo y b la mitad del ancho de la semilla la cual toma el área de una elipse como referencia.

$$D_{3,2} = \frac{\sum_1^{50} D^3}{\sum_1^{50} D^2} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$Ap = \pi \cdot a \cdot b \quad \text{Ecuación 2}$$

5.1.1.2. Densidad

Se determinó la densidad a granel de las semillas utilizando una probeta de 10 mL, la cual se llenó con semillas de alfalfa, trigo o chíá. Posteriormente se determinó la masa de las semillas utilizando una balanza analítica (Ohaus, H-5276, EE. UU.). Posteriormente se calculó la densidad con base a la relación masa/volumen obtenido a temperatura ambiente.

La densidad compactada se determinó efectuando 50 golpes en la base de la probeta con las semillas y registrándose el volumen final. La densidad se expresó como la relación masa/volumen ocupado a temperatura ambiente de estos datos (Porrás-Loaiza et al., 2014).

5.1.1.3. Peso de 1000 semillas

Para determinar el peso de 1000 semillas, se contaron manualmente 100 semillas de alfalfa, trigo o chíá, y se pesaron en una balanza analítica (Ohaus, H-5276, EE. UU.); el peso obtenido se multiplicó por 10 (Kim et al., 2019). Las mediciones se realizaron por triplicado.

5.1.1.4. Porcentaje de humedad (%H_{bh}) y actividad de agua (a_w)

La humedad se determinó por el método oficial de la AOAC para determinación de humedad en semillas y cereales (método 14.003). Se molieron 10 g de cada muestra en mortero y posteriormente se pesaron por triplicado aproximadamente 3 g de la semilla molida en un crisol previamente a peso constante. Los crisoles se colocaron en una estufa de aire a 135 °C, hasta alcanzar peso constante. El porcentaje de humedad en base húmeda se calculó de acuerdo con la Ecuación no. 3; donde p_i es el peso inicial de la muestra, p_f es el peso de la muestra deshidratada y %H_w es el porcentaje de humedad en base húmeda.

$$\%H_w = \frac{p_i + p_f}{p_i} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

La actividad de agua (a_w) se midió utilizando un higrómetro marca AquaLab (Aqua Lab, 4TEV, USA). Se colocó la muestra molida en la celda, hasta la marca indicada. Los resultados fueron registrados y se reportaron como media y desviación estándar de cinco réplicas.

5.1.1.5. Determinación de color

El color de las semillas se midió utilizando un colorímetro (Konica Minolta, CR-400, Japón), utilizando una celda de acrílico de 4.5 x 5 x 1 cm la cual se llenó con semillas hasta la marca y se instaló en el aditamento de soporte incluido con el colorímetro, como se observa en la Figura 1. Se registraron los valores L*, a* y b* dados por el colorímetro. El procedimiento se realizó por triplicado para cada semilla.

La determinación de color se realizó antes y después de los tratamientos con UVC y PLAI con los parámetros de proceso seleccionados en base a la reducción de log N/N₀ obtenidas

para bacterias mesófilas nativas. Para determinar si existe diferencia, se utilizó el valor ΔE , calculado de acuerdo con la Ecuación 4; donde un valor $\Delta E^* \leq \pm 3$ corresponde a una diferencia no perceptible por el ojo humano (Mathias-Rettig & Ah-Hen, 2014).

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{Ecuación 4}$$

5.1.2. Caracterización microbiológica

5.1.1.1. Preparación de las muestras

Las muestras fueron preparadas conforme con la NOM-110-SSA1-1994; de acuerdo con la cual, se pesaron 10 g de muestra de alfalfa o trigo según el caso, y fueron diluidos en 90 mL de agua peptonada estéril. La muestra fue homogenizada en el “Stomacher” durante 2 min hasta obtener una suspensión completamente homogénea. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas. Cada tubo fue homogenizado utilizando un mezclador de vórtice antes de realizar la siguiente dilución.

5.1.1.2. Determinación de mesófilos aerobios

Se determinó el contenido de mesófilos aerobios por el método de cuenta en placa de acuerdo con el método oficial AOAC 990.12. La siembra se realizó por la técnica de extensión en superficie, en cajas Petri con Agar Cuenta Estándar (PCA por sus siglas en inglés) previamente estéril y gelificado. Se transfirieron 0.1 mL de cada dilución por medio de una micropipeta en el centro de una placa de Petri con el agar PCA gelificado. El inóculo se extendió cuidadosamente en forma uniforme y lo más rápido posible sobre la superficie del agar con un asa de Drigalsky, procurando evitar las orillas. Este ensayo se realizó por triplicado para cada dilución. Las placas fueron incubadas en estufa a 35 ± 2 °C por 48 ± 2 h en posición invertida. Los resultados se reportaron como UFC/g.

5.1.1.3. Determinación de coliformes totales y fecales

Las muestras se prepararon de acuerdo con el procedimiento indicado en la sección 5.1.1.1. Para la determinación de Coliformes Totales y Fecales se empleó el método del número más probable (AOAC 966.24).

Se tomó la dilución de mayor concentración, y se transfirió 1 mL de esta a cada uno de tres tubos con 9 mL de caldo Lauril Sulfato con una campana de Durham en el medio previamente esterilizado. Para las diluciones subsecuentes se continuó inoculando de la misma manera. Posteriormente, el inóculo y el medio se mezclaron suavemente evitando la introducción de aire en la campana de vidrio para evitar inducir a falsos positivos en la lectura de resultados. Todos los tubos se rotularon debidamente y se incubaron a $35 \pm 0,5$ °C por 48 ± 2 h. Al finalizar este periodo se observó si existió formación de gas, para marcarlo positivo (+) o negativo (-) en caso de no existir indicios de formación de gas. Para expresar los resultados, se tomó la serie de tubos que dé formación de gas (+) y se buscó el resultado de acuerdo con las tablas para NMP correspondientes. Los inóculos correspondientes se sembraron también en agar RBVA para determinar el contenido de coliformes fecales.

5.1.1.4. Determinación de mohos y levaduras

La preparación de la muestra se realizó de acuerdo con lo previamente descrito en la sección 5.1.1.1. La determinación y cuenta general de hongos se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994. Brevemente, se vertieron 1 ml de cada dilución, entre 10^{-1} a 10^{-6} , en cajas Petri estériles. Posteriormente se agregaron de 15 a 20 ml de agar papa dextrosa (PDA) fundido estéril y acidificado con 0.1% de ácido tartárico estéril. El inóculo y el agar se mezclaron de acuerdo con lo señalado por la metodología, con seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en el sentido contrario y seis de atrás hacia adelante, sobre una superficie lisa. Tras haber solidificado el agar, las cajas se incubaron invertidas a 25 ± 2 °C durante al menos 5 días. Tras este tiempo se contaron y reportaron las colonias contadas como UFC/g a 25°C.

5.2. Inoculación microbiológica de las semillas

5.2.1. Sanitización de semillas

Las semillas fueron previamente sanitizadas con la finalidad de minimizar la población de microbiota nativa y asegurar una población homogénea del patógeno inoculado, para evitar desviaciones por interacciones entre microorganismos. Para la inoculación de las semillas para las pruebas con luz UVC se utilizó una sanitización líquida para semillas de alfalfa y

trigo; y un método “seco” en chíá para evitar la absorción de agua por el mucílago. Ambos métodos se describen a continuación.

Las semillas de alfalfa y trigo se sumergieron en una solución de 0.75% de hipoclorito de sodio (NaClO) durante 3 min con agitación ligera ocasional. Posteriormente, se enjuagaron 4 veces con agua destilada estéril. Las semillas se secaron durante un periodo de 3 h en papel filtro, en una campana de flujo laminar a 30°C (Kotan et al., 2013).

Las semillas de chíá (5 g) fueron colocadas sobre una toalla sanitizante de marca comercial extendida, rodándolas con el apoyo de otra toalla y buscando el mayor contacto posible de todas las caras de la semilla con la superficie de la toalla sanitizante. Cabe mencionar que no existe reportado un método similar de sanitización previa a técnicas de inoculación, por ningún otro autor.

Para los tratamientos con PLAI, la sanitización de las tres semillas se realizó por el método “seco” con la toalla sanitizante. Ambos métodos se validaron por medio del recuento de mesófilos aerobios (sección 5.1.1.2) y de hongos y levaduras (sección 5.1.1.3). Esto se realizó con la finalidad de corroborar la efectividad de los métodos de sanitización.

5.2.2. Inoculación de las semillas con *Listeria monocytogenes* y *Salmonella Typhimurium*

Las cepas de *Salmonella Typhimurium* y *Listeria monocytogenes* se obtuvieron del cepario del Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la UDLAP. Los cultivos se recuperaron inoculándolos por separado en 10 mL de Caldo Soya Tripticaseína (TSB; Difco, BD, Sparks, MD) e incubándose a 35°C por 24 h. El inóculo obtenido tuvo una población de $\sim 10^8$ UFC/g (Lorenzo-Leal et al., 2019).

El inóculo obtenido se ajustó a una población entre 10^6 y 10^7 y se colocó en un frasco de vidrio estéril al cual se le incorporó una tapa con atomizador. El atomizador se desinfectó previamente con etanol al 70% y se enjuagó con agua destilada estéril. Para la inoculación de las semillas, se pesaron 10 g de semillas sanitizadas y se colocaron extendidas en una caja Petri de vidrio estéril. Estas fueron atomizadas un total de 4 veces, con una agitación intermedia, con el inóculo ajustado y se dejaron secar en una campana de flujo laminar a

temperatura ambiente. La inoculación de cada lote de semillas se validó sembrando por vertido en placa en agar soya tripticaseína (TSA, por sus siglas en inglés). El resultado obtenido se registró como población inicial.

5.3. Tratamiento de las muestras con luz UVC

Los tratamientos con luz UVC se llevaron a cabo en una cámara de luz UV modelo XS-052-1 (Roentgen, Florida, USA); la cual consta de una lámpara germicida UVC de baja presión con una longitud de onda de 253 nm aproximadamente, ubicada verticalmente en la puerta de esta (Figura 1). La potencia del equipo equivale a 15 W. El interior de la cámara está cubierto con acero inoxidable reflejante y cuenta con 10 niveles para 9 charolas de 23 x 14 cm, cada una.



Figura 1. Cámara para tratamientos con luz UVC. Vista exterior (izquierda) e interior (derecha)

El cálculo de la tasa de fluencia para este equipo se calculó de acuerdo con la Ecuación 5, donde F es la tasa de fluencia (J/cm^2*s), P_l es la potencia del equipo (J/s) y A (cm^2) es el área de tratamiento de las charolas (Heinrich et al., 2016).

$$F = \frac{P_l}{A} \quad \text{Ecuación 5}$$

La tasa de energía efectivamente aplicada sobre la muestra se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación; donde Et es la tasa de energía aplicada por gramo de muestra (J/s); F , la tasa de fluencia del equipo (J/cm^2*s) y A_p es el área proyectada de un g de muestra (cm^2).

$$E_t = F * A_p$$

Ecuación 6

Para realizar las curvas de inactivación, se colocaron y extendieron un total de 40 g de semillas repartidos en 4 bandejas de acero diferentes (10 g de semillas por bandeja) previamente desinfectadas. Las bandejas se colocaron equidistantemente (~4,5 cm) entre sí, para maximizar la exposición a la luz de cada bandeja y minimizar desviaciones producidas por la distribución de energía en el interior de la cámara. Durante el experimento, las semillas se agitaron manualmente cada 10 min. Esta agitación se realizó para maximizar la exposición a la luz UVC en las diferentes caras de las semillas.

El muestreo se realizó en los tiempos de exposición 0 (control), 10, 20, 40, 60, 90, 120, 150 y 180 min; retirando 1 g de muestra de una de las bandejas, elegida aleatoriamente, para evaluar la inactivación microbiana. Este proceso se realizó por triplicado para cada semilla para obtener la media y la desviación estándar. Para minimizar las fluctuaciones en la intensidad y obtener resultados reproducibles, la lámpara se encendió 20 min antes de iniciar cada ensayo.

5.4. Tratamiento de las muestras con PLAI

Los experimentos se llevaron a cabo en un equipo SteriPulse PL Z-1000 modelo LH-840 con una lámpara lineal de Xenón marca Wilmington, MA (Figura 2). Este sistema consiste en un módulo de control y una cámara de tratamiento (con una lámpara de xenón libre de mercurio), la cual genera un espectro de luz entre 100 y 1,100 nm. Aproximadamente el 20, 26 y 54% de la energía transmitida se encuentra entre la región infrarroja, visible y UV, respectivamente. De acuerdo con las especificaciones del fabricante, la tasa de aplicación de los pulsos es de tres pulsos por segundo (3 Hz), con una duración por pulso de 360 μ s. La tasa de fluencia del equipo se obtuvo de acuerdo con las especificaciones del manual del fabricante basándose en la distancia y tiempos de tratamiento, dando un valor de 2.49 y 1.32 (J/cm^2*s) para tratamientos a 5 y 10 cm de distancia, respectivamente. La tasa de energía aplicada en las muestras se calculó utilizando la ecuación 6.



Figura 2. Equipo SteriPulse PL Z-1000 modelo LH-840 donde se realizaron los experimentos de PLAI.

Para la evaluación de la efectividad de los tratamientos con PLAI en la inactivación de BMN y de patógenos (*S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*) en semillas de alfalfa, trigo y chíá, se evaluaron dos distancias diferentes (5 y 10 cm). El muestreo se realizó en los tiempos de exposición 0 (control), 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120 y 150 s; retirando 1 g de muestra de la charola, cuyo contenido inicial se calculó de acuerdo con el área proyectada de cada semilla; siendo 26, 27 y 70 g de semillas de alfalfa, chíá o trigo, respectivamente. Estas cantidades son suficientes para formar una unicapa uniforme de semillas con un A_p de $\sim 2,000 \text{ cm}^2$.

5.5. Evaluación termográfica de las semillas durante los tratamientos con luz UVC y con PLAI

La temperatura de las semillas durante el proceso de inactivación con luz UVC y con PLAI fue monitoreado cada 10 min y cada 5 s, respectivamente. La temperatura se midió con una cámara de espectro infrarrojo (64 max, Fluke, WA, EE.UU.). Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software Smart View ® Classic 4.4 (Fluke Corporation, WA, EE. UU.), seleccionando el área ocupada por semillas para cada cuadrante. Los datos de temperatura obtenidos se exportaron a Excel, obteniéndose la temperatura promedio de las semillas, y la temperatura alcanzada en el punto máximo.

5.6. Evaluación de la inactivación de los microorganismos por luz UVC y por PLAI

Las semillas asépticamente recolectadas (1 g) de los ensayos experimentales con los equipos de luz UVC y de PLAI, para cada tiempo determinado, se diluyeron en 9 mL de agua peptonada estéril (10^1). A partir de esta dilución se prepararon diluciones seriadas hasta la 10^3 . Cada dilución se sembró por vertido en placa con agar cuenta estándar (para BMN) ó en agar TSA (en las curvas de inactivación de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*) (AOAC 966.23.C).

La efectividad de cada tratamiento se midió con base en la reducción logarítmica ($\log N/N_0$), reportada como variable de respuesta para el análisis estadístico correspondiente a cada tratamiento.

5.7. Descripción de las cinéticas de inactivación mediante modelos no lineales

Las curvas de inactivación obtenidas para los diferentes patógenos en cada semilla se ajustaron a cuatro modelos no lineales diferentes: Weibull, Weibull modificado, bifásico y doble Weibull, los cuales se describen a continuación.

Modelo de Weibull

El modelo de Weibull tradicional (Peleg & Cole, 1998), expresado como se presenta en la Ecuación 7, describe la inactivación en función del logaritmo de la tasa de supervivencia (N/N_0). Brevemente, en esta ecuación, N representa la población sobreviviente después de los tratamientos con luz UVC o HILP; N_0 es el número inicial de microorganismos, b (min^{-1}) se relaciona con la constante de tasa de inactivación, n indica la forma de la curva ($n < 1$, curva cóncava; $n > 1$, curva convexa) y D_T se refiere a la dosis total (J/cm^2) requerida para lograr una reducción microbiana $\log N/N_0$ (UFC/g).

$$\log \frac{N}{N_0} = -b \cdot (D_T)^n \quad \text{Ecuación 7}$$

Modelo Weibull modificado (Mafart et al., 2002)

La segunda versión, propuesta por Mafart et al. (2002) se expresa en la ecuación 8; donde, δ es un parámetro de escala que se puede denotar como el tiempo para la primera reducción decimal (equivalente a D_V), y p es un parámetro de forma similar al parámetro n en el modelo tradicional de Weibull.

$$\log(N) = \log(N_0) - \left(\frac{D_T}{\delta}\right)^p \quad \text{Ecuación 8}$$

Modelo bifásico

El modelo bifásico, al igual que el de doble Weibull, presupone la existencia de una subpoblación microbiana que es más resistente al estrés aplicado. El modelo se presenta en la Ecuación 9; donde, f es la fracción de la población inicial que es menos resistente al estrés, $(1-f)$ es la fracción de la población inicial que es más resistente al estrés, y k_{max1} y k_{max2} son las tasas de inactivación específicas para ambas poblaciones respectivamente (Xiong et al., 1999).

$$\log(N) = \log(N_0) + \log(f \cdot e^{-k_{max1} \cdot D_T} + (1-f) \cdot e^{-k_{max2} \cdot D_T}) \quad \text{Ecuación 9}$$

Doble Weibull

Este modelo presupone, al igual que el modelo bifásico, la existencia de dos subpoblaciones con distinta resistencia al factor estrés. Este modelo se expresa en la Ecuación 10, donde N es la población sobreviviente después de un tratamiento dado, N_0 es el tamaño del inóculo, p es el parámetro de forma, D_T es la dosis total (J/cm^2), δ_1 y δ_2 es el tiempo para la primera reducción decimal de las dos subpoblaciones diferentes (generalmente $\delta_1 < \delta_2$) y α se obtiene de la Ecuación 11 (Coroller et al., 2006).

$$\log(N) = \log\left[\frac{10^N}{(1+10^\alpha)} \cdot \left(10^{-\left(\frac{D_T}{\delta_1}\right)^p + \alpha} + 10^{-\left(\frac{D_T}{\delta_2}\right)^p}\right)\right] \quad \text{Ecuación 10}$$

$$\alpha = \log\left(\frac{f}{1-f}\right) \quad \text{Ecuación 11}$$

Cálculo de los valores D_{UV} y D_{PLAI}

El valor D_V representa el equivalente de D en procesos térmicos (John & Ramaswamy, 2020). En este estudio, D_{UV} y D_{PLAI} se definen como el tiempo total (min o s) necesario para inactivar

el 90 % de las células viables (Hwang et al., 2019). Los valores de D_{UV} y D_{PLAI} se obtuvieron sustituyendo $\log(N/N_0)$ por 1 o $\log(N)$ por el valor correspondiente a una reducción logarítmica y resolviendo para D_T , para cada conjunto de datos en cada modelo.

5.8. Evaluación de los efectos de los tratamientos con luz UVC y PLAI en los parámetros de germinación de las semillas

En esta sección, así como para las subsecuentes, se evaluaron los efectos de las tecnologías (UVC y PLAI) en los parámetros de germinación de las semillas tratadas con los parámetros de proceso que hayan logrado la reducción significativa de patógeno o BMN; siendo, 120 y 180 min con luz UVC y 150 s a 5 y 10 cm de distancia con PLAI.

Para el examen visual, conteo y medición de las semillas germinadas, se colocaron 40 semillas de alfalfa, trigo o chíá en bandejas de germinación de plástico reutilizables. Cada bandeja tenía 40 cavidades con un diámetro de 2.3 cm y una profundidad de 3.5 cm. Cada cavidad se llenó con un hisopo de algodón estéril para sostener las semillas y se colocó una semilla por cavidad. Cada algodón con semilla se humedeció con 7 mL para iniciar el proceso de imbibición. El montaje de estos experimentos se muestra en la Figura 3.



Figura 3. Montaje experimental para las pruebas de parámetros de germinación de las semillas de trigo, alfalfa y chíá.

Las charolas de germinación se colocaron en cajas de plástico y se incubaron a 25°C durante al menos 5 días. Estos experimentos se realizaron por triplicado para semillas no tratadas (control) y semillas tratadas con UVC (120 y 180 min) y con PLAI (150 s; 5 y 10 cm).

5.7.1. Evaluación de la tasa de germinación o porcentaje de germinación

Para calcular la tasa de germinación se contó cada 24 h el número de semillas que presentaban una radícula de al menos 2 mm (Kim et al., 2019). La tasa de germinación se expresó como porcentaje según la Ecuación 12; donde S_G es el número de semillas germinadas y S_T es el número total de semillas (40 para estos experimentos). Cada experimento se realizó por triplicado.

$$\text{Germination rate (\%)} = \left(\frac{S_G}{S_T} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 12}$$

5.7.2. Cinéticas de crecimiento de los brotes de semillas de alfalfa, trigo y chíá tratadas con UVC o PLAI

La tasa de crecimiento se evaluó midiendo la longitud de los brotes cada 24 h desde que alcanzaron los 2 mm hasta 5 días después de la aparición de la primera radícula (Kim et al., 2019). Estos experimentos se realizaron por triplicado. La media y la desviación estándar de la altura de 40 semillas germinadas se registraron y graficaron cada 24 h.

Para evaluar el efecto de la exposición a la luz UVC y a los PLAI sobre el crecimiento de los germinados, se establecieron alturas meta de 3.5 cm (trigo) y 3.0 cm (chía) y 4.0 (alfalfa) y se compararon gráficamente. Estos valores se eligieron de acuerdo con la altura mínima requerida para fines comerciales en el caso de la alfalfa y la chíá. Para el trigo, 3.5 cm es la altura promedio a la que se desarrolla la primera hoja verdadera; a partir de este punto, se considera un “*microgreen*” según las definiciones técnicas (Di Gioia et al., 2017).

5.7.3. Modelado de superficies de respuesta y optimización de los tratamientos con luz UVC y PLAI

Se utilizó un enfoque de superficie de respuesta para optimizar la inactivación y el proceso de germinación en alfalfa, trigo y chíá. Los valores de reducción de BMN, la tasa de germinación y la altura de los germinados se analizaron utilizando MINITAB 19 (Minitab Inc., State College, Pa., EE. UU.). Los factores estudiados fueron: tiempos de tratamiento UVC (0, 120 y 180 min) y PLAI (control, 5 y 10 cm), tiempo de germinación (24, 48, 72, 96 y 120 h) y el tipo de semilla (alfalfa, trigo y chíá).

Cada respuesta se ajustó a la Ecuación 13, correspondiente a un modelo cuadrático polinomial; donde, β_i son los coeficientes del modelo, A es el tiempo o distancia de tratamiento (min o s), B es el tiempo de germinación (h), y y es la respuesta correspondiente: ya sea población final (log UFC/g), tasa de germinación (%) o altura (cm); dando un total de tres modelos diferentes por semilla. Los factores significativos y sus interacciones se determinaron con un nivel de confianza del 95%.

$$y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3A^2 + \beta_4B^2 + \beta_5AB \quad \text{Ecuación 13}$$

Los modelos resultantes se utilizaron para optimizar el proceso minimizando la población bacteriana final (log UFC/g), maximizando el porcentaje de germinación y estableciendo una altura meta de 4,0 cm para alfalfa, 3 cm para chíá y 3,5 cm para trigo; priorizando el mayor peso el porcentaje de germinación y la reducción microbiana.

5.8. Análisis sensorial de los germinados de las semillas de PLAI y UVC

Se realizó por medio de una evaluación dúo-trío, utilizando la semilla sin tratamiento como referencia. El estudio se realizó en el Laboratorio de Análisis Sensorial de la Planta Piloto del Departamento de Ingeniería Química y de Alimentos de la UDLAP. Todas las pruebas sensoriales se llevaron a cabo con un panel de 50 jueces no entrenados.

Dado que el producto comestible es el germinado, previo al análisis sensorial, se prepararon las muestras poniendo las semillas previamente tratadas con las respectivas tecnologías, a remojar en un recipiente de vidrio con agua estéril durante un periodo de 6 a 8 horas. Transcurrido este periodo, las semillas fueron escurridas y se colocaron en un germinador con agua estéril suficiente para generar una humedad adecuada hasta que los brotes alcanzaron un tamaño suficiente, mínimo de 1.5 cm.

5.9. Evaluación de los efectos de los tratamientos de PLAI y UVC en la actividad antioxidante de semillas de alfalfa, trigo y chíá, y sus germinados

Para la evaluación de la actividad antioxidante de los germinados, las semillas previamente tratadas fueron germinadas y cosechadas después de 3 (trigo) y 5 días (alfalfa y chíá). Estas se congelaron inmediatamente después, almacenándose a -80 °C hasta su uso. Luego, se homogeneizaron 5 g de la muestra congelada con 20 mL de etanol 80% en un mortero. La

mezcla se agitó a 100 rpm a temperatura ambiente durante 1,5 h y posteriormente se centrifugó (6000 x g, 15 min, 4 °C) (Han, 2021). El sobrenadante se utilizó para evaluar la capacidad de captación de radicales DPPH y el contenido fenólico total (TPC) (Abdel-Aty et al., 2021).

Los extractos etanólicos de semillas tratadas se realizaron siguiendo la misma metodología, pero con la semilla molida previamente con ayuda de un Nutribullet ®.

5.9.1. Evaluación de la actividad antioxidante mediante la neutralización del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH)

La actividad antioxidante se evaluó midiendo la capacidad de captación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) según lo descrito por Han, (2021) con algunas modificaciones. Brevemente, se mezclaron 20 µL de extracto del germinado o semilla con 200 µL de DPPH 0,4 mM, en una microplaca de 96 pocillos. Las microplacas se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. Se midió la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se expresan como mg equivalentes de Trolox por cada 100 g de muestra en base seca (mg.eq.Trolox/100g bh).

5.9.2. Evaluación del contenido de fenoles totales (TPC)

El contenido de fenoles totales (TPC) se evaluó mediante el método de Folin-Ciocalteu (FC) descrito por Sánchez-Rangel et al., (2013). Brevemente, se mezclaron 20 µL del extracto de germinado o semilla y 100 µL de reactivo FC 0,25 N en una microplaca de 96 pocillos y se incubaron a temperatura ambiente. Después de 3 minutos, se agregaron 100 µL de Na₂CO₃ a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h. Pasado este tiempo, se leyó la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro; los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de muestra en base seca.

5.10. Evaluación sensorial de germinados y semillas tratadas con luz UVC o PLAI

Se realizó una evaluación sensorial con 30 jueces no entrenados, para determinar si existe diferencia en el color entre semillas tratadas con UVC (180 min) o PLAI (150s, 5cm) y controles no tratados. De igual manera se evaluó si existe diferencia perceptible entre los

germinados de estas semillas y los germinados de semillas no tratadas. Los niveles de tratamiento a evaluar se eligieron con base en los parámetros de proceso que obtuvieron valores de ΔE más grandes en la evaluación colorimétrica de color de las semillas.

La evaluación sensorial se realizó mediante una prueba triangular de acuerdo con la metodología propuesta por Sinkinson (2017). Brevemente; se presentó ante cada juez un set con 3 muestras de las cuales, una era diferente. Las muestras fueron servidas en orden aleatorio para evitar sesgos por la posición de la muestra. En el caso de las semillas se les indicó que eligieran la muestra diferente en color; mientras que para los germinados no se indicó ningún atributo, pero se les pidió que indicaran que atributo consideraron diferente. Los resultados obtenidos se interpretaron de acuerdo con el número de respuestas correctas obtenidas, de acuerdo con las tablas estadísticas propuestas por Roessler et al. (1948).

Los cuestionarios se presentaron en formato digital, proporcionándose un código QR para enlazar con el cuestionario en Google Forms®. Además, se contempló un formato en papel de reserva, para quienes prefirieran responderlo así. Tanto el formato de los cuestionarios como el enlace a la versión digital se encuentran en los Anexos 1 y 2.

Previo a la evaluación sensorial, se realizó una encuesta entre los participantes sobre frecuencia de consumo de productos germinados y su disposición a probar germinados de semillas menos comunes. El formato de la encuesta se incluye en el Anexo 3.

5.11. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos para los experimentos de este trabajo se realizaron por triplicado y se expresan como promedio \pm desviación estándar. Para determinar diferencias significativas entre resultados se utilizó un análisis de varianza de una vía, para todos los resultados obtenidos de tratamientos con luz UVC y ANOVA de dos vías para los resultados de PLAI; con prueba de diferencias de Fisher utilizando el Software Minitab 19 (Minitab Inc., State College, Pa., U.S.A). Para todas las pruebas estadísticas se utilizó un nivel de significancia del 95% ($\alpha=0.05$), a menos que se indique lo contrario.

6. Resultados y discusión

6.1. Materiales y caracterización

6.1.1. Características físicas y fisicoquímicas de las semillas de trigo, alfalfa y chíá

Los parámetros obtenidos para la caracterización física y fisicoquímica de las semillas; tamaño de partícula, peso de 1000 semillas, área proyectada, densidad de bulto y compactada, actividad de agua, humedad en base húmeda y color, son presentados en la Tabla 1. Estos parámetros están relacionados con la calidad de la semilla y pueden relacionarse tanto con la eficacia de la tecnología (tamaño de partícula, peso de 1000 semillas, área proyectada, densidad); como también con las condiciones requeridas por el microorganismo para favorecer su supervivencia (a_w , humedad).

Tabla 1. Caracterización física y fisicoquímica de semillas de alfalfa, trigo y chíá.

	Alfalfa	Trigo	Chía
Tamaño de semilla (mm)	1.96 ± 0.21	7.02 ± 0.47	1.53 ± 0.12
Peso de 1000 semillas (g)	2.18 ± 0.10	58.20 ± 0.77	1.32 ± 0.08
Densidad de bulto (kg/L)	0.821 ± 0.02	0.855 ± 0.007	0.687 ± 0.004
Densidad compactada (kg/L)	0.864 ± 0.007	0.878 ± 0.002	0.708 ± 0.003
a_w (a 25 ± 0.01 °C)	0.4020 ± 0.001	0.4084 ± 0.031	0.4079 ± 0.009
%H_{wb} (a 135 °C ± 2°C)	8.18 ± 0.02	9.53 ± 0.06	6.54 ± 0.033
Color CIE (L*; a*; b*)	L: 41.73 ± 0.84 a: 3.04 ± 0.44 b: 9.38 ± 0.42	L: 45.90 ± 1.38 a: 3.17 ± 0.34 b: 10.78 ± 0.93	L: 36.22 ± 0.30 a: 0.79 ± 0.13 b: 2.34 ± 0.23

**Promedio y desviación estándar de tres repeticiones.*

El peso obtenido de 1000 semillas de alfalfa es similar a los resultados de Rashidi, Zand y Golami (2009), quienes reportan un rango de 2.24-2.29 g. En el caso del trigo, el peso obtenido (58.20 ± 0.77 g) difiere de otros pesos reportados entre 31 y 39.2 g (Milosevic, Tintor, Tropic y Dimitrijevic, 2012; Zecevic, Boskovic, Knezevic y Micanovic, 2014). Sin embargo, esto puede deberse a que este parámetro es dependiente de factores como la tasa de producción de semillas, el genotipo de la planta y la suplementación de nitrógeno de esta, que afectan el tamaño de la semilla durante su crecimiento (Milosevic et al., 2012; Zecevic et al., 2014).

El contenido de humedad, tanto para trigo como para alfalfa, se encuentra entre el 8 al 9% en base húmeda. Este valor está considerado dentro del rango óptimo para asegurar la calidad funcional de las semillas (Schoeman y Manley, 2019). Por otro lado, la a_w del trigo es similar al valor de referencia (0.410). Las semillas de alfalfa utilizadas presentaron un valor de 0.402; reflejando una actividad de agua óptima para prevenir cambios enzimáticos durante su almacenamiento (Carter et al., 2015).

Por otra parte, la importancia del color radica en su relación con la calidad de la semilla y también con su viabilidad de germinación. Los resultados obtenidos muestran que tanto la semilla de trigo como de alfalfa tienen valores de luminosidad con tendencia al blanco. Sin embargo, los valores obtenidos para trigo reflejan una luminosidad mayor lo cual está en concordancia con el color claro característico del trigo en comparación con la alfalfa. En el caso de los parámetros a^* y b^* , las semillas de alfalfa muestran algunos matices verdes dentro de una tendencia mayoritaria hacia el rojo, esto se debe probablemente a la presencia de carotenoides y antocianinas en el pericarpio de la semilla (Punia, Sandhy y Siroah, 2019).

6.1.2. Características microbiológicas de las semillas de trigo, alfalfa y chía

La población total de mesófilos aerobios, mohos, levaduras y coliformes totales fueron analizadas y se presentan en la Tabla 2 como \log_{10} UFC/g. La población de mesófilos aerobios fue considerada como la población inicial de bacterias mesófilas nativas (BMN) para cada semilla, previo a la aplicación de los tratamientos con luz UVC o PLAI.

Tabla 2. Población total de mesófilos aerobios, mohos, levaduras y coliformes totales en semillas de alfalfa, trigo y chía.

	Bacterias mesófilas nativas (BMN)	Mohos	Coliformes totales
	\log_{10} UFC/g		NMP/g
Trigo	2.6 ± 0.10	1.48 ± 0.04	
Alfalfa	3.5 ± 0.05	1.30 ± 0.14	No detectado
Chía	2.0 ± 0.11	1.20 ± 0.03	

* Promedio \pm desviación estándar de 3 réplicas.

El trigo demostró tener la mayor cantidad de mohos entre las tres semillas, mientras que la alfalfa fue la semilla con la mayor cuenta de bacterias mesófilas. Así mismo, se contó una población de levaduras de 1.0 y 1.2 \log_{10} UFC/g para alfalfa y trigo, y no se detectaron para chíá. En el recuento de coliformes totales, no se observó formación de gas en 3 diluciones sucesivas en ningún ensayo. Este resultado se confirmó sembrando 1 mL de la dilución 10^1 en agar RVBA, donde tampoco se observó formación de colonias, para ninguna de las semillas, tras 48 ± 2 h de incubación.

En general, los resultados obtenidos indican una calidad microbiológica relativamente buena, ya que no se detectó la presencia de coliformes fecales y los niveles de mesófilos aerobios, de hongos y levaduras se encuentran dentro de los parámetros reportados en otros estudios. Por ejemplo, Berghofer et al. (2003) realizaron un estudio extensivo a 58 muestras de trigo, de diversa procedencia, y reportaron valores para recuentos de mesófilos aerobios entre 10^1 a 10^6 UFC/g, y coliformes en el rango de 10^0 - 10^3 NMP/g. A su vez, Soylemez et al. (2001) reportaron poblaciones de mesófilos alrededor de 10^4 UFC/g y coliformes $\sim 1.5 \log_{10}$ UFC/g en alfalfa. Por lo tanto, los resultados obtenidos se consideran dentro del rango esperado dado que las semillas adquiridas estaban etiquetadas como uso específico para producción de germinados y/o consumo humano, en el caso de la chíá.

6.2. Evaluación de los cambios de temperatura en las semillas por la aplicación de tratamientos con luz UVC ó PLAI

Las Figura 4 muestra imágenes termográficas de las semillas de alfalfa, antes, a la mitad y al finalizar los tratamientos de UVC y PLAI. Las Figuras 6 y 7 muestran termografías de los mismos momentos de tratamiento para semillas de chíá y trigo, respectivamente.

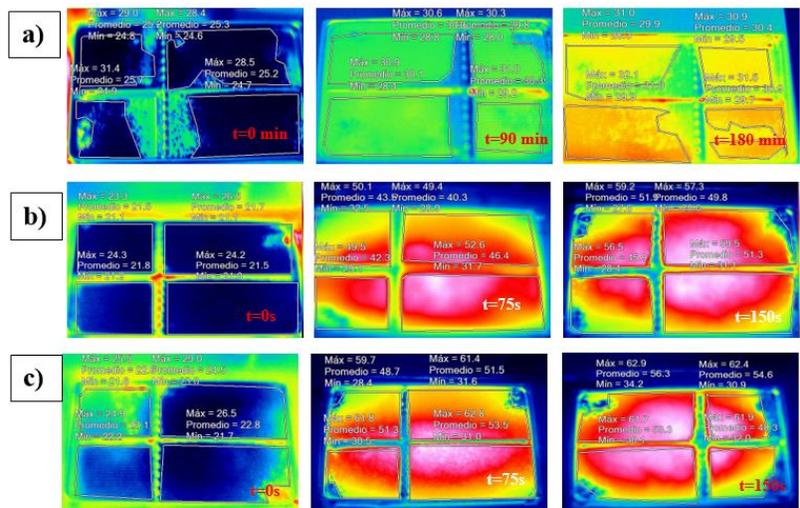


Figura 4. Termografías de alfalfa durante la aplicación de (a) luz UVC, (b) PLAI a 5 cm de distancia de la lámpara y (c) PLAI a 10 cm de distancia de la lámpara a diferentes tiempos de tratamiento.

En general se observa que, para los tratamientos con PLAI, los puntos con máxima temperatura se encuentran en la parte central de la charola, independientemente de la semilla, mientras que con los tratamientos UVC, se generan perfiles de temperatura más uniformes sobre la superficie de las semillas y el cambio total de temperatura durante el proceso es menor.

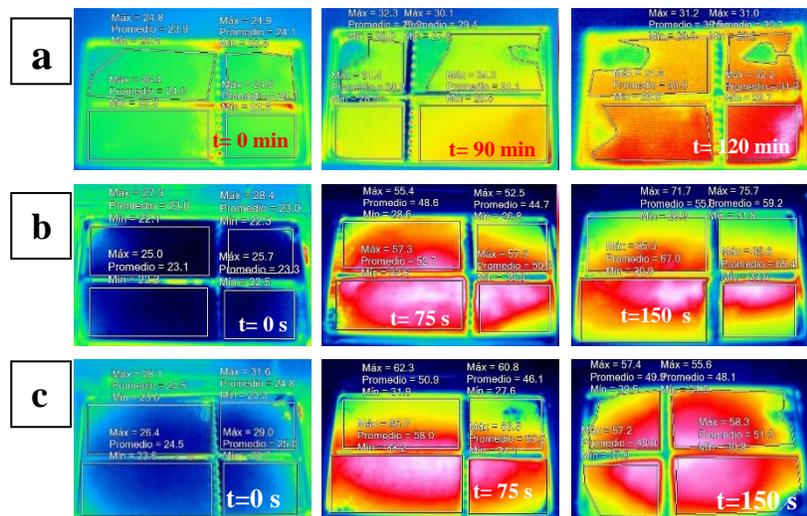


Figura 5. Termografías de chíá durante la aplicación de (a) luz UVC, (b) PLAI a 5 cm de distancia de la lámpara y (c) PLAI a 10 cm de distancia de la lámpara a diferentes tiempos de tratamiento.

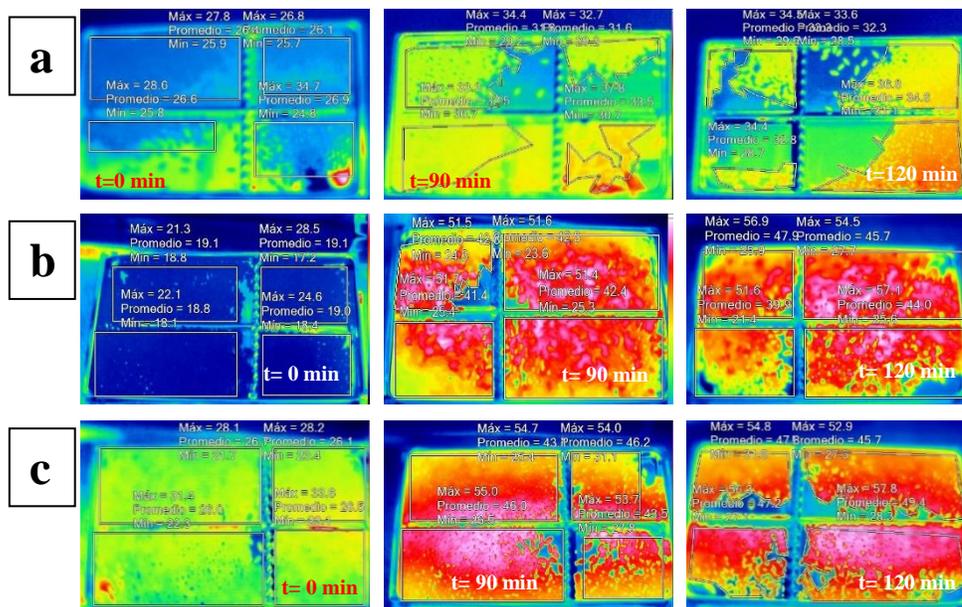


Figura 6. Termografías de trigo durante la aplicación de (a) luz UVC, (b) PLAI a 5 cm de distancia de la lámpara y (c) PLAI a 10 cm de distancia de la lámpara, a diferentes tiempos de tratamiento.

Los datos de temperatura recabados con las termografías realizadas a las semillas cada 10 min (tratamiento UVC) o cada 5 s (tratamientos con PLAI), fueron utilizados para determinar si las condiciones de tratamiento tienen efecto significativo ($\alpha=0.05$) en el cambio de temperatura. El ANOVA mostró que para los tratamientos con PLAI, tanto la distancia, el tiempo y la interacción de ambos, afectan significativamente ($p<0.05$) el incremento de temperatura en semillas de alfalfa y de trigo; mientras que, en semillas de chíá, la distancia no tiene un efecto significativo ($p=190$) en el incremento de la temperatura, pero el tiempo de tratamiento y la interacción de ambos factores sí ($p<0.05$). Particularmente para esta semilla, el incremento de temperatura independientemente de la distancia puede relacionarse con la composición de ésta, ya que contiene hasta un 45% de ácidos grasos.

Para el caso de los tratamientos con UVC, el tiempo de tratamiento sí afecta la temperatura de las semillas ($p<0.05$). Sin embargo, hay que resaltar que el incremento de temperatura (ΔT) alcanzado al final del tratamiento completo con luz UVC, es mucho menor que los incrementos alcanzados con los tratamientos con PLAI, que pueden incluso duplicar la temperatura inicial de la semilla. Tal es el caso de la chíá tratada a 5 cm de distancia de la fuente de luz. La Tabla 3 muestra el aumento promedio de la temperatura de las semillas tras

los tratamientos completos y la temperatura del punto con la temperatura máxima dentro de la charola, al final del tratamiento.

Tabla 3. Incrementos promedio de temperatura en las semillas tras los tratamientos con luz UVC y PLAI.

Semilla	UVC (180 min)		PLAI (150 s, 5 cm)		PLAI (150 s, 10 cm)	
	ΔT	Tmax	ΔT	Tmax	ΔT	Tmax
			°C			
Alfalfa	5.8	33.3	28.1	59.5	29.9	62.9
Trigo	6.2	35.6	25.4	57.1	21.2	57.8
Chía	6.9	33.2	38.6	85.6	24.9	68.3

Del análisis de los datos obtenidos, se puede deducir que el incremento de temperatura, al igual que la eficiencia en la inactivación, está fuertemente relacionada con la dosis energética aplicada a la muestra, y con la composición química de esta.

6.3. Evaluación de la eficacia de los tratamientos con luz UVC y con PLAI para la inactivación de BMN, *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* en semillas

En esta sección se discuten los resultados de inactivación microbiana obtenidos por el tratamiento con luz UVC, y posteriormente con PLAI; comparándolos entre sí y explicando los factores que afectan la eficiencia de ambas tecnologías.

6.3.1. Efectos de la aplicación de luz UVC en la inactivación de microorganismos en semillas de alfalfa, trigo y chía

Las curvas de inactivación por luz UVC (Figura 7) en bacterias mesófilas nativas (BMN) muestran que 180 min de tratamiento son significativamente más efectivos ($p < 0.05$) para inactivar BMN en trigo (2.08 log₁₀ UFC/g) que en alfalfa o chía (1.26 y 0.96 log₁₀ UFC/g, respectivamente). La diferencia entre los niveles de inactivación de BMN para las diferentes semillas puede deberse en primer lugar a factores relacionados con las características particulares de las colonias microbianas presentes en las semillas.

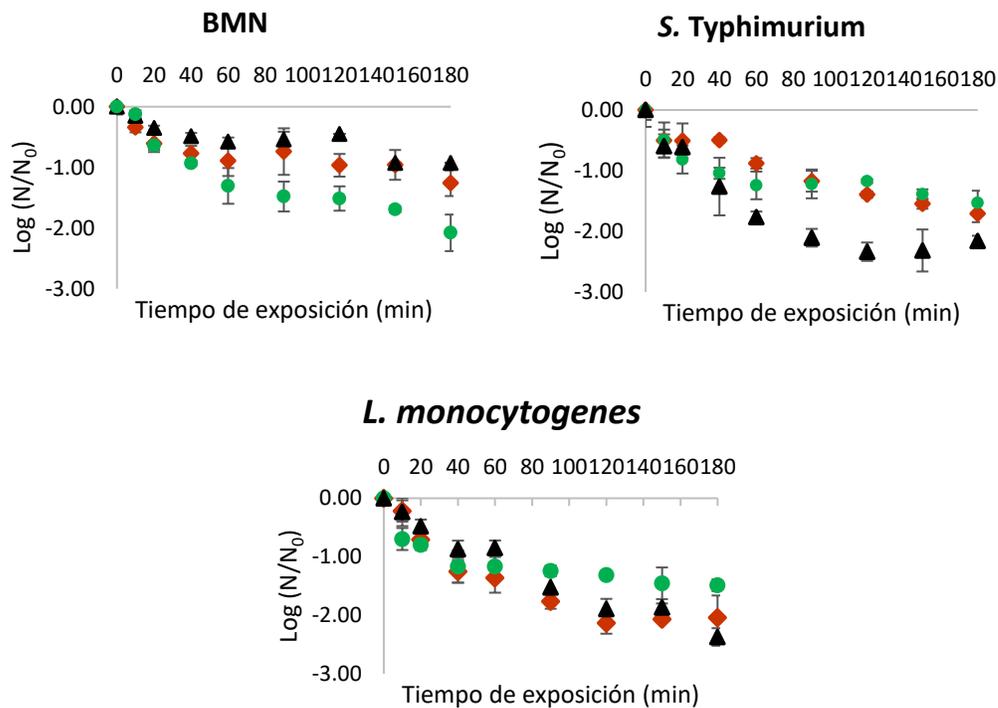


Figura 7. Curvas de inactivación de bacterias mesófilas nativas (BMN), *Salmonella Typhimurium* y *Listeria monocytogenes* en trigo (●), alfalfa (◆) y chía (▲).

Debido a que la inactivación microbiana por UVC es causada principalmente por sus efectos sobre el material genético, la sensibilidad de microorganismos específicos a esta, se encuentra relacionada con intercambios genéticos como los mecanismos de reparación del ADN y la extensión del daño del ADN (Gayán et al., 2014). Se ha descrito que factores como el tipo de microorganismo, (bacterias vegetativas, esporas, mohos, virus), fase de crecimiento microbiano (las bacterias son más sensibles a los rayos UVC durante la fase de crecimiento exponencial), condiciones de crecimiento (como la temperatura), tamaño celular, grosor de la pared celular, pigmentación y composición, afectan la sensibilidad de los microorganismos a la luz UVC y a los PLAI (Kramer et al., 2017a; Singh et al., 2021).

Dado que las BMN para las diferentes semillas, se tratan de poblaciones mixtas, las relaciones generadas entre los diversos géneros de bacterias presentes y el medio en el que se encuentran se vuelven complejas, lo que dificulta describir y/o predecir el nivel de

resistencia que estas poblaciones puedan tener a las tecnologías utilizadas en este estudio (Kramer et al., 2017b).

Se observa también que, al aplicar los mismos tiempos para inactivar *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* (Figura 8), el tratamiento es significativamente menos efectivo ($\alpha < 0.05$) en trigo en comparación con semillas de chíá y alfalfa, es decir que se invierte el orden de efectividad.

Para explicar este fenómeno se debe tomar en cuenta el manejo previo de la muestra; dado que poblaciones mixtas de microorganismos generan interacciones entre estos, afectando su sensibilidad a las tecnologías aplicadas, es necesario minimizar la presencia de BMN antes de realizar la inoculación con patógenos en las semillas. En esta fase de estudio se optó por utilizar un “método húmedo” de presanitización para semillas de trigo y alfalfa, el cual incluía el lavado de las semillas con 0.7% de hipoclorito de sodio, y su posterior enjuague en múltiples ocasiones; mientras que para la chíá se utilizaron toallitas sanitizantes.

Aunque en ambos casos se procuró minimizar la manipulación de las semillas, el método aplicado para alfalfa y trigo produjo daño en el pericarpio de estas semillas (Figuras 9 y 10). Este daño fue más pronunciado en el trigo, sobre todo en el extremo opuesto al embrión.



Figura 8. Semillas de alfalfa antes (superior izquierda y derecha) y después (inferior izquierda y derecha) de la presanitización por “método húmedo”.



Figura 9. Semillas de trigo antes (superior izquierda y derecha) y después (inferior izquierda y derecha) de la presanitización por “método húmedo”.

Dado que tanto la luz UVC, como los PLAI poseen bajo poder de penetración en los alimentos, es importante considerar que el manejo previo de las semillas a lo largo de la cadena de producción debe ser adecuado; ya que un manejo “rudo” puede producir no solo la fractura total del grano o de la semilla; sino también grietas o descamaciones en el pericarpio. Esto implica que las características físicas, morfológicas y topográficas de las semillas, ya sea naturales o producidas por el manejo, impactan la eficiencia de estas tecnologías (Hinojosa-Dávalos et al., 2020; Kim et al., 2019), y deben ser considerados como factor extrínseco al seleccionar la luz UVC para la sanitización de semillas.

Cuando la superficie de las semillas es áspera e irregular, con poros y/o grietas que ofrecen lugares donde las bacterias pueden encontrar refugio de los efectos de la luz UVC (Kim et al., 2019); se produce lo que se conoce como el “efecto sombra” (Hwang et al., 2019). Dado que el tamaño de muchos microorganismos es de alrededor de 5 μm , o incluso menor (Kim et al., 2019), se les facilita encontrar un poro natural en la superficie, o incluso una grieta en la cariósida (o pericarpio) de la semilla causada por manipulación inadecuada del producto. Esto permite que las bacterias se protejan y sobrevivan a tratamientos con luz UVC ó PLAI aún más agresivos.

Cuando esto sucede, la reducción microbiana no mejora significativamente, independientemente de la magnitud de la radiación UVC o el tiempo de exposición (Hwang et al., 2019; Kramer et al., 2017). Kim et al. (2019) calcularon la rugosidad superficial promedio de semillas de rábano y pak-choi y reportaron que existe correlación entre este parámetro y la cantidad de energía requerida para inactivar bacterias aerobias mesófilas en estas semillas, ya que, a mayor factor de rugosidad, menor la inactivación alcanzada incluso a energías mayores.

Por otro lado, es importante tomar en cuenta que este efecto sombra no solo se da en relación con las características microscópicas de la superficie de las semillas, sino que también se da a nivel macroscópico (Gayán et al., 2014; Kramer et al., 2017a, 2017b); por lo que la distribución general superficial de las semillas en la bandeja puede generar solapamiento de las semillas propiciando de igual manera sitios con efecto sombra

Dado que, de las semillas estudiadas, la de chíá es la más pequeña, y tiene un “peso de 1000 semillas” significativamente menor a las demás, el número de semillas tratadas por charola es el doble de semillas que la alfalfa y alrededor de cinco veces la cantidad de semillas de trigo, ya que para UVC se utilizaron cantidades iguales de muestra. Esto provoca que las semillas de alfalfa y chíá tiendan a superponerse durante la agitación de estas, a diferencia de las semillas de trigo que por lo general se extendían con mayor facilidad sobre la charola.

Esta superposición parcial de las semillas conduce al efecto de sombra explicado anteriormente; pero para este caso, provocada por la cobertura que ofrecen unas semillas sobre otras. Sharma y Demirci (2003), encontraron que la eficiencia en la inactivación de *E. coli* en alfalfa tratada con PLAI disminuye significativamente a mayor grosor de muestra debido a la superposición generada por las semillas.

6.3.2. Efectos de la aplicación de PLAI en la inactivación de microorganismos en semillas de alfalfa, trigo y chíá, en comparación con luz UVC

En general, se observa que para todas las semillas se alcanzan mayores niveles de inactivación (Tabla 4) (reducciones entre 2-3 log₁₀ CFU/g) cuando son tratadas por PLAI a

5 cm de distancia de la fuente lumínica; en comparación con PLAI a 10 cm (1.5-2.5 log₁₀ CFU/g) y luz UVC continua (1-2.3 log₁₀ CFU/g).

Tabla 4. Inactivaciones totales de los microorganismos en semillas de alfalfa, trigo y chía, tras 180 min (UVC) o 150 s (PLAI).

BMN		S. Typhimurium				L. monocytogenes		
PLAI		UVC		PLAI		UVC		
UVC	5 cm	10 cm	5 cm	10 cm	5 cm	10 cm		
Alfalfa								
-1.26 ^C _c	-2.34 ^B _a	-1.82 ^A _{b,c}	-1.71 ^A _b	-2.95 ^B _a	-2.57 ^B _a	-2.04 ^B _a	-3.0 ^B _a	-2.3 ^B _a
Trigo								
-2.08 ^B _a	-1.75 ^A _{a,b}	-1.47 ^A _b	-1.53 ^A _b	-1.99 ^A _a	-1.61 ^A _b	-1.49 ^A _b	-3.0 ^B _a	-2.5 ^B _a
Chía								
-0.93 ^A _a	-2.26 ^B _a	-1.99 ^A _a	-2.16 ^B _c	-2.98 ^B _a	-2.46 ^B _b	-2.37 ^B _b	-1.98 ^A _b	-1.73 ^A _a

Nota: Superíndices en letras mayúsculas diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) del efecto entre semillas. Subíndices con letras minúsculas diferentes dentro de la misma fila indican también diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos aplicados.

Estos resultados están de acuerdo con lo descrito por la bibliografía donde se reporta que los PLAI son más eficientes que los tratamientos con luz continua (Collazo et al., 2019; Pedrós-Garrido et al., 2018), dado que su efectividad está directamente en función de la cantidad de energía absorbida por el microorganismo objetivo; que a su vez está en relación con la energía emitida por el equipo (Abuagela et al., 2018).

Los pulsos de luz emitidos con los equipos de PLAI son 20,000 veces más intensos que la luz del sol recibida por la superficie terrestre (Heinrich et al., 2016). Esto se logra almacenando y concentrando energía eléctrica de alto voltaje en un capacitor; liberándola rápidamente hacia una lámpara de cuarzo, lo que produce un pulso de luz de amplio espectro (200-1,100 nm) que tiene entre 25-40% de luz UVC (Bhavaya & Umesh Hebbar, 2017; Kramer et al., 2017a). Así, la energía recibida por la muestra puede ser medida por radiometría o calculada teóricamente de acuerdo con las especificaciones del equipo utilizado.

Como se observa en la Tabla 5, la tasa de fluencia emitida por segundo de tratamiento (J/cm^2s) de PLAI es de 33 a 62 veces mayor que la calculada para el tratamiento UVC, de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes. Sin embargo, se debe considerar también que las características físicas de la muestra inciden en la cantidad de energía total aplicada efectivamente sobre ésta (Abuagela et al., 2018).

En la Tabla 5, se puede observar que la dosis energética efectiva en las distintas semillas puede diferir ampliamente incluso cuando son tratadas con el mismo equipo y bajo las mismas condiciones ya que se debe considerar el área superficial tratada en la muestra. Por ejemplo, las semillas de alfalfa y de chíá reciben cantidades similares de energía por gramo de muestra, al ser tratadas con el mismo equipo y parámetros de uso; mientras que, las semillas de trigo reciben dosis mucho menores por gramo de muestra.

Lo anterior se explica porque un gramo de semillas de trigo tiene un área proyectada ~ 2.7 y ~ 2.65 veces mayor que un gramo de semillas de alfalfa o chíá, respectivamente.

Tabla 5. Tasas de fluencia (J/cm^2s) energética de los equipos utilizados y sus correspondientes tasas de energía aplicadas por gramo de muestra (J/s).

	UVC	PLAI, 5 cm	PLAI, 10 cm
Tasa de fluencia (J/cm^2s)			
Condiciones equipo	0.04	2.49	1.32
Tasa de energía por gramo de muestra tratada (J/s)			
Alfalfa	3.25	197.39	104.64
Trigo	1.17	71.16	37.72
Chía	3.11	188.58	99.97

Por otro lado, es importante considerar también que la aplicación de PLAI tiene un importante efecto fototérmico (Abida et al., 2014; Kramer et al., 2017a), que genera un incremento significativo de la temperatura en las semillas. Como se observó en las termografías, el promedio de temperatura de las semillas tratadas con UVC permaneció por debajo de los $40^{\circ}C$, teniendo un incremento total de entre $5-7^{\circ}C$; a diferencia de los

tratamientos con PLAI, que llegaron a duplicar la temperatura inicial de la muestra en algunos casos. Por ejemplo, las semillas de chía a 5 cm de distancia alcanzaron temperaturas promedio de ~60°C y la temperatura medida en el punto máximo fue mayor a 80°C al final del tiempo completo de tratamiento.

Los valores de la prueba de covarianza entre el incremento de temperatura (°C) y la reducción microbiana ($\log_{10} N/N_0$) (Tabla 6) muestran que existe una relación positiva entre ambos; de tal manera que, a mayor incremento de temperatura se tendrán mayores niveles de inactivación. Sin embargo, esta correlación es en general mayor en los tratamientos con PLAI, mientras que para el caso de las semillas tratadas con UVC se tienen valores menores (entre 1-2) o tendiente a 0 (nula); con excepción del trigo donde se observan valores similares para los tratamientos con UVC y con PLAI.

Tabla 6. Covarianza entre temperatura (°C) y reducción microbiana ($\log_{10} N/N_0$).

UVC			PLAI, 5 cm			PLAI, 10 cm		
BMN	<i>S. Typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>	BMN	<i>S. Typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>	BMN	<i>S. Typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Alfalfa								
0.64	0.96	1.6	6.05	7.73	6.92	5.62	7.64	6.26
Trigo								
5.62	7.64	6.26	4.35	5.18	6.56	3.83	2.89	4.93
Chía								
1.01	1.76	1.68	6.58	8.75	6.44	6.42	7.43	5.27

Estos resultados tienen coherencia con los mecanismos de acción reportados en PLAI. Se ha documentado que además del efecto fotoquímico generado por la acción de la porción de luz UVC sobre el ADN de las bacterias (Cheigh et al., 2012), los PLAI, pueden producir un sobrecalentamiento temporal del citoplasma celular de los microorganismos seguido del colapso de la pared, produciendo muerte celular (Abida et al., 2014; Wekhof, 2000).

Este incremento de temperatura se lleva a cabo no sólo en los microorganismos. En el caso de las semillas, tanto la distancia como el tiempo de tratamiento tienen efecto significativo en el incremento de la temperatura, lo que podría producir un efecto de sinergia entre los

fenómenos térmicos y químicos (en el ADN) descritos, que inciden en la inactivación bacteriana (Abida et al., 2014).

Sin embargo, el efecto fototérmico y la dosis energética no son los únicos factores relevantes que inciden en la inactivación bacteriana producida por PLAI, ya que su eficiencia para la desinfección de alimentos depende de varios factores: desde la composición química y física del producto alimenticio, las características del equipo, hasta factores microbianos como la sensibilidad de diferentes microorganismos a los PLAI (Hinds et al., 2019; Singh et al., 2021).

Las curvas de inactivación de bacterias mesófilas nativas (BMN), *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes* en alfalfa, trigo y chíá se encuentran respectivamente en las Figuras 11, 12 y 13. Cada figura compara el efecto de la aplicación de los tratamientos de luz UVC con los efectos de los tratamientos por PLAI a 5 y 10 cm de distancia. La temperatura promedio y la temperatura máxima alcanzada dentro de la muestra en cada tiempo de agitación son también incluidas en las gráficas.

6.3.2.1. Comparación de la eficacia de inactivación microbiana entre los tratamientos con luz UVC y PLAI en semillas de alfalfa

Las curvas de inactivación en semillas de alfalfa (Figura 10) muestran que el tratamiento con UVC tuvo un efecto mucho menor en comparación con los tratamientos con PLAI (5 ó 10 cm) para la reducción de BMN y para la inactivación de *S. Typhimurium*; mientras que para *L. monocytogenes* el tratamiento con UVC alcanzó una reducción cercana a la obtenida con PLAI a 10 cm (2.04 y 2.3 log₁₀ UFC/g, respectivamente), mostrándose sin diferencias significativas ($p>0.05$).

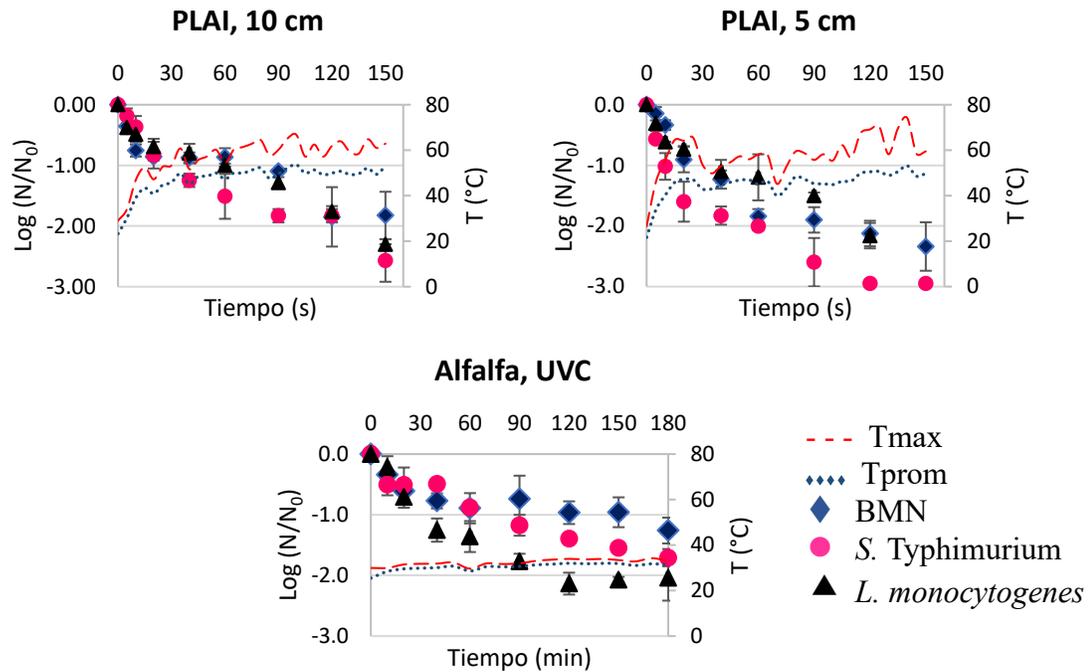


Figura 10. Curvas de inactivación de bacterias mesófilas nativas (BMN), *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* en semillas de alfalfa tratadas con luz UVC y PLAI a 5 ó 10 cm de distancia.

Los tratamientos con PLAI a 5 cm de distancia tuvieron el mejor desempeño ya que lograron la inactivación total de los 3 log₁₀ UFC/g inoculados para estas pruebas; además de alcanzar una reducción de BMN significativamente mayor ($p > 0.05$) en comparación con PLAI a 10 cm y con los tratamientos con UVC. Estos resultados son similares a los obtenidos por Sharma y Demirci (2003), quienes lograron reducciones entre 4-5 ciclos log con tratamientos de hasta 90 s a 3 cm de distancia de la lámpara, variando el grosor de la muestra.

Las curvas de inactivación de BMN, a 5 cm de distancia, muestran un comportamiento sigmoideal característico de poblaciones microbiológicas mixtas donde una subpoblación tiene mayor resistencia al factor de estrés. (Peleg & Corradini, 2011). Sin embargo, este comportamiento puede deberse también al efecto fototérmico que tiene esta tecnología. Específicamente, en chíá y alfalfa, se observa que esta aparente resistencia es vencida tras 60 s de tratamiento. Alrededor de este tiempo, para el caso específico de chíá y alfalfa, la agitación se vuelve insuficiente y la temperatura de las semillas alcanza en promedio temperaturas $>60^{\circ}\text{C}$, lo cual contribuye al daño físico efectuado en la célula. En cambio,

cuando la distancia se duplica, la existencia de una subpoblación se hace menos evidente en trigo y chía, donde se presenta más bien una curva cóncava.

Los coeficientes de covarianza indican que el mejor desempeño de los PLAI frente a luz UVC está positivamente relacionado con el incremento de temperatura. De acuerdo con los coeficientes de covarianza (Tabla 6), la relación entre el incremento de temperatura y la reducción ($\log_{10} N/N_0$) de BMN y *S. Typhimurium*, por luz UVC, es casi nula; mientras que todos los coeficientes de covarianza obtenidos para los tratamientos con PLAI son mucho mayores indicando una mayor correlación.

Por otro lado, el análisis de varianza de las variables de tratamiento (Tabla 7) indica que el tiempo siempre es significativo cuando las semillas de alfalfa son tratadas con UVC; mientras que para PLAI, tanto la distancia, el tiempo y la interacción entre ambos tienen un efecto significativo ($p < 0.05$) en la inactivación microbiana.

Tabla 7. Valores p obtenidos por ANOVA de una (UVC) y dos vías (PLAI), con $\alpha=0.05$

		BMN	S. Typhimurium	<i>L. monocytogenes</i>
UVC				
Alfalfa		$2.37 \cdot 10^{-4}$	$1.11 \cdot 10^{-10}$	$4.11 \cdot 10^{-5}$
Trigo	tiempo	$1.31 \cdot 10^{-6}$	$1.17 \cdot 10^{-7}$	$2.90 \cdot 10^{-8}$
Chía		0.008	$2.42 \cdot 10^{-10}$	$4.79 \cdot 10^{-12}$
PLAI				
Alfalfa	distancia	0.006	$1.24 \cdot 10^{-10}$	$1.3 \cdot 10^{-4}$
	tiempo	$3.85 \cdot 10^{-14}$	$1.0 \cdot 10^{-17}$	$4.9 \cdot 10^{-15}$
	d*t	0.014	0.052	0.0186
Trigo	distancia	0.042	$3 \cdot 10^{-16}$	0.002
	tiempo	$1.48 \cdot 10^{-13}$	$1.0 \cdot 10^{-17}$	$1.74 \cdot 10^{-14}$
	d*t	0.699	$8.12 \cdot 10^{-6}$	0.109
Chía	distancia	$4.9 \cdot 10^{-3}$	$1.9 \cdot 10^{-4}$	0.868
	tiempo	$1.52 \cdot 10^{-14}$	$1.0 \cdot 10^{-17}$	$1.72 \cdot 10^{-12}$
	d*t	0.181	0.021	0.286

6.3.2.2. Comparación de la eficacia de inactivación microbiana entre los tratamientos con luz UVC y PLAI en semillas de trigo

Las curvas de inactivación en semillas de trigo (Figura 10) muestran que el tratamiento con PLAI a 5 cm de distancia logró inactivar, hasta niveles no detectables, los 3 log₁₀ UFC/g de *L. monocytogenes* inoculados; mientras que los tratamientos a 10 cm de distancia redujeron significativamente la población de este patógeno, sin inactivarlo. Sin embargo, para la población de *S. Typhimurium* solo se alcanzó una inactivación máxima de ~2 log₁₀ UFC/g. Aun así, esta fue significativamente mayor que la lograda con los tratamientos por luz UVC (1.5 log₁₀ UFC/g). Por el contrario, para la reducción de BMN los tratamientos con luz UVC fueron significativamente más efectivos ($p < 0.05$).

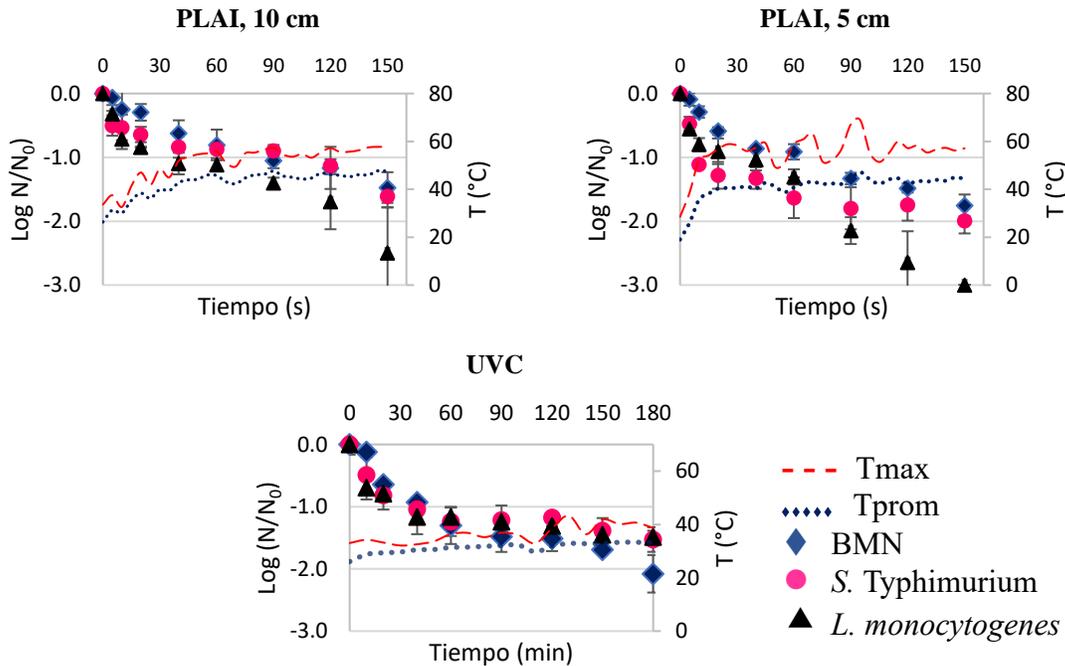


Figura 11. Curvas de inactivación de bacterias mesófilas nativas (BMN), *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* en semillas de trigo tratadas con luz UVC y PLAI a 5 ó 10 cm de distancia.

Por otro lado, los coeficientes de correlación entre temperatura y reducción microbiana para trigo (tabla 6) muestran que esta relación es mayor en los tratamientos con UVC, que en los

tratamientos con PLAI, a pesar de que la temperatura promedio en los tratamientos con PLAI es mayor. Esto demuestra nuevamente que las características físicas de la muestra, en este caso el área proyectada y cantidad de la muestra, afectan la dosis efectivamente recibida por la muestra. Dado que para los tratamientos con PLAI, se fijó la misma área proyectada ($\sim 2,000 \text{ cm}^2$) para todas las semillas, la cantidad de muestra tratada fue casi triplicada en comparación con la utilizada para los tratamientos con UVC. Debido a esto, la mayor cantidad de semillas de trigo en la charola, pueden distribuirse con menor facilidad sobre la superficie de la charola durante las agitaciones, produciendo efecto sombra por solapamiento entre estas, lo que disminuye la eficacia de los PLAI (Hinojosa-Dávalos et al., 2020).

Aunque no existen referencias bibliográficas sobre la inactivación con PLAI o UVC de bacterias mesófilas o patógenas en trigo, Aron-Maftei et al., (2014) aplicaron PLAI para inactivar mohos presentes de forma natural en semillas de trigo de dos variedades diferentes; trigo español y rumano. Estos autores reportaron una reducción de mohos significativamente mayor en trigo rumano, en comparación con trigo español, aun cuando la dosis específica teórica fue la misma (51.2 J/g) y los niveles iniciales de contaminación también fueron similares. Esta diferencia está relacionada con diferentes características correspondientes a la diferencia entre variedades, tales como tamaño y contenido de humedad, pero también a las diferentes poblaciones presentes dentro de los mohos encontrados naturalmente para cada semilla (Aron-Maftei et al., 2014).

6.3.2.3. Comparación de la eficacia de inactivación microbiana entre los tratamientos con luz UVC y PLAI en semillas de chía

En las semillas de chía, se lograron las máximas inactivaciones de BMN, *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* (2.26 , ~ 3 y $\sim 2 \log_{10} \text{ UFC/g}$) mediante la aplicación de PLAI a 5 cm de distancia (Table 7). Sin embargo, tanto los coeficientes de correlación entre temperatura y reducción ($\log N/N_0$) (Tabla 6), como las curvas de inactivación en semillas de chía (Figura 12) muestran que existe un efecto significativo del incremento de temperatura en la reducción microbiana. Además, los ANOVA muestran que en el caso de *S. Typhimurium*, microorganismo para el cual se obtuvo la mayor reducción, tanto la distancia, el tiempo y su interacción tienen efecto significativo en la reducción microbiana.

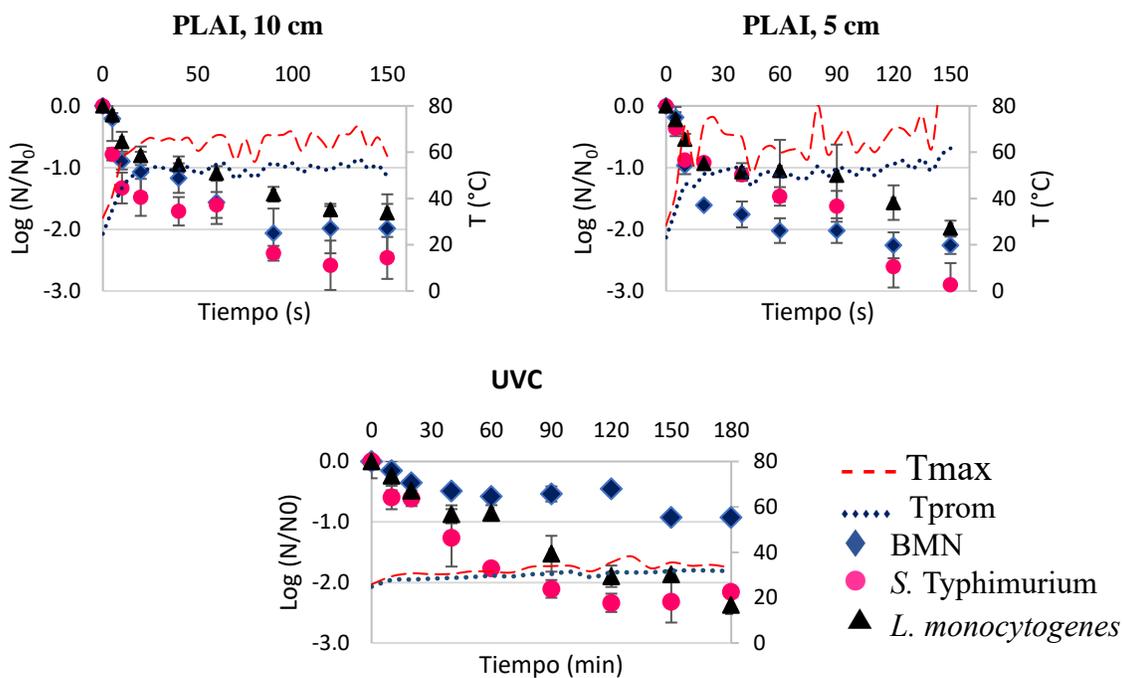


Figura 12. Curvas de inactivación de bacterias mesófilas nativas (BMN), *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* en semillas de chía tratadas con luz UVC y PLAI a 5 o 10 cm de distancia.

Sin embargo, para la inactivación de BMN por PLAI, no existe diferencia significativa entre distancias; además, los perfiles de temperatura promedio no se modificaron significativamente con la distancia, sin embargo, los puntos con temperaturas máximas sí tuvieron picos más marcados hacia el final del tratamiento, alcanzando temperaturas de hasta ~80°C, lo cual contribuye a la inactivación casi completa de la población inicial de BMN presentes de forma natural, y de *S. Typhimurium* inoculada en las semillas. (Reyes-Jurado et al., 2019).

Además, para los tratamientos con PLAI se encontró que la *S. Typhimurium* es más sensible a los efectos de esta tecnología; lo cual concuerda con lo reportado por la bibliografía. Es generalmente aceptado que las bacterias grampositivas son más resistentes a los PLAI que las bacterias gramnegativas, debido a la gruesa pared de peptidoglicano que rodea la membrana citoplasmática (Hinds et al., 2019, 2020; Jeon & Ha, 2018). Por lo tanto, la *L.*

monocytogenes se considera uno de los patógenos más resistentes, mientras que *Salmonella* spp. es de los más sensibles a la luz UVC y PLAI en general (Jeon & Ha, 2018). Esto coincide con los resultados obtenidos para PLAI, pero no en los de chía. Sin embargo, cabe señalar que, para ambos patógenos, se alcanzó una inactivación significativamente mayor en la chía en comparación con las otras semillas (con excepción de *L. monocytogenes* en trigo). Estos fenómenos pueden ser causados por interacciones más complejas entre el patógeno y su entorno.

Tanto la luz UVC como los PLAI pueden también afectar otros objetivos biológicos, como los lípidos y los esteroides, y producir fotooxidación y producción de especies reactivas de oxígeno. Estas sustancias están presentes no sólo en los microorganismos sino también en las semillas; tal como el caso de la chía la cual tiene un contenido de entre 25-40% de aceites, lo que puede conducir a la producción de especies reactivas que modifican la sensibilidad de ambos patógenos en esta semilla (Hinds et al., 2019). Estas especies reactivas producidas en el alimento por la acción de ambas tecnologías, son llamadas fotosensibilizadores y pueden afectar la sensibilidad de los diversos microorganismos a los tratamientos por luz UVC o por PLAI (Koh et al., 2019).

6.4. Análisis matemático de las curvas de inactivación de BMN y patógenos en trigo, alfalfa y chía, por medio de modelos no-lineales

Las curvas experimentales de inactivación de BMN por luz UVC y PLAI (Figura 10) se ajustaron a los modelos de Weibull (Peleg & Cole, 1998) y Weibull modificado (Mafart et al., 2002). Además, considerando que las BMN se tratan de una población mixta, estas curvas se ajustaron también a los modelos doble Weibull (Coroller et al., 2006) y bifásico (Xiong et al., 1999); mientras que las curvas de inactivación de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* se ajustaron únicamente a los modelos de Weibull. Para casi todos los casos se observaron curvas cóncavas, sigmoidales, o con una aparente cola.

A partir de cada modelo se generó un valor D_{UV} o D_{PLAI} que corresponde al tiempo de tratamiento necesario para lograr una reducción del 90% de las bacterias presentes. Estos valores, los parámetros de proceso calculados para cada modelo y los coeficientes de ajuste (R^2) se encuentran en las Tablas 8 y 9 para BMN y patógenos, respectivamente.

Para el caso de las BMN (Figura 13), se obtuvieron coeficientes de ajuste (R^2) superiores a 0.90 en casi todos los casos excepto para chíá (UVC) y alfalfa (PLAI 10 cm) en los modelos modificados, doble Weibull y bifásico. Sin embargo, la precisión del valor D_{UV} y D_{PLAI} en comparación con los valores experimentales de los modelos de Weibull y Weibull modificado fue mejor en comparación con doble Weibull y bifásico.

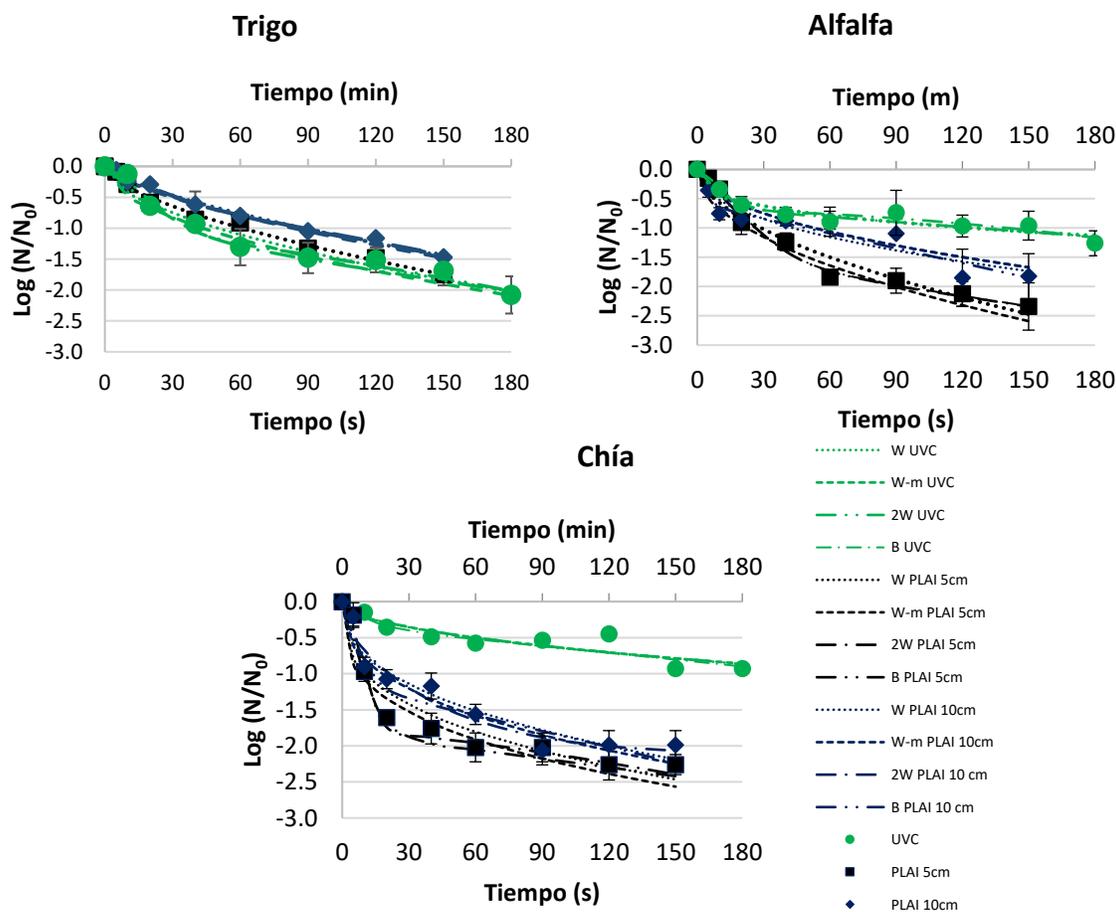


Figura 13. Curvas de inactivación de BMN ajustadas a diferentes modelos no lineales: Weibull (W), Weibull modificado (W-m), Doble Weibull (2W) y Bifásico (B).

Para los modelos de inactivación de BMN en trigo, los modelos doble Weibull y bifásico subestiman el tiempo requerido para inactivar un ciclo logarítmico a pesar de haber obtenido valores de $R^2 > 0.90$, debido a que no existe una subpoblación significativamente más

resistente a las tecnologías aplicadas, observándose en el menor grado de concavidad de sus curvas ($n=0.551$). Además, el modelo bifásico de la inactivación de BMN en trigo por UVC da un valor $f=0.90$. Este parámetro corresponde a la población inicial considerada población mayor y menos resistente a la tecnología aplicada (Xiong et al., 1999). Por lo tanto, podría decirse que las BMN presentes en trigo tienen una resistencia casi uniforme a la luz UVC. Sin embargo, al ser inactivadas por PLAI a 5 y 10 cm, se obtienen valores de 0.72 y 0.63, respectivamente; es decir que, aunque la resistencia a luz UVC continua sea uniforme para este conjunto de bacterias, puede existir una subpoblación que es más resistente, coincidiendo con una mayor concavidad en comparación con la curva de inactivación por UVC (Kramer et al., 2017b).

Tabla 8. Parámetros obtenidos de los modelos no lineales ajustados para las curvas de inactivación de BMN.

		UVC			PLAI, 5 cm			PLAI, 10 cm		
		Trigo	Alfalfa	Chía	Trigo	Alfalfa	Chía	Trigo	Alfalfa	Chía
Valor experimental (min ó s)		40-60	150-180	>180	~60	20-40	~10	~90	60-90	10-20
Weibull	b	0.115	0.203	0.068	0.079	0.160	0.449	0.043	0.185	0.291
	n	0.551	0.331	0.490	0.618	0.545	0.340	0.700	0.446	0.403
	D_v	50	124	242	61	29	11	88	44	21
	R²	0.9792	0.9614	0.9229	0.9931	0.9807	0.9487	0.9953	0.9411	0.9681
Weibull modificado	δ	43.55	122.4	243.7	55.95	22.30	7.97	83.88	53.19	18.22
	p	0.52	0.33	0.50	0.59	0.50	0.32	0.67	0.50	0.38
	D_v	44	123	244	56	22	8	84	53	18
	R²	0.9596	0.9242	0.8518	0.9865	0.9636	0.9008	0.9910	0.8869	0.9377
Doble Weibull	δ₁	27.71	16.93	243.7	19.55	23.48	10.09	35.33	53.19	19.79
	p	1.31	1.73	0.50	1.28	0.98	1.34	1.11	0.50	0.55
	δ₂	182.6	277.2	243.7	137	170	215	155.5	53.2	6954.8
	R²	0.9844	0.9598	0.8518	0.9939	0.9901	0.9888	0.9933	0.8869	0.9541
Bifásico	f	0.90	0.77	0.53	0.72	0.96	0.99	0.63	0.74	0.93
	k_{max1}	0.085	0.132	0.11	0.12	0.10	0.24	0.06	0.36	0.23
	k_{max2}	0.014	0.006	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02
	D_v	32	22	39	25	25	11	50	9	12
	R²	0.9813	0.9496	0.8738	0.9924	0.9901	0.9847	0.9932	0.9281	0.9468

En el caso de la inactivación de BMN en alfalfa, casi todos los modelos estimaron valores D_{UV} , D_{PLAI} por debajo de los experimentales a pesar de obtener valores $R^2 > 0.92$, excepto para la inactivación por PLAI a 5 cm con Weibull y Weibull modificado. Esta discrepancia es importante ya que elegir un modelo matemático que describa con precisión los datos modelados es de vital importancia, en especial cuando se trata de seguridad alimentaria; dado que una subestimación en el tiempo de tratamiento permite la supervivencia de microorganismos, incluyendo patógenos; los cuales pueden multiplicarse hasta niveles que pongan en riesgo la calidad del producto y/o la salud del consumidor (Peleg & Corradini, 2011). Además, es necesario establecer condiciones adecuadas que aseguren la efectividad del proceso de inactivación por PLAI o UVC basándose en una adecuada estimación de parámetros cinéticos obtenidos a partir de las curvas de inactivación experimentales (Coroller et al., 2006), esto con la finalidad de caracterizar y ampliar la información disponible hasta el momento sobre la aplicación de PLAI y UVC en diferentes sistemas alimentarios.

Por otro lado, se observa que la curva de inactivación de BMN con PLAI 5 cm en alfalfa, tiene forma cóncava; mientras que la curva de inactivación con PLAI 10 cm muestra una forma sigmoideal y la curva de inactivación por UVC muestra una rápida inactivación inicial y una población remanente (efecto cola), por lo que los modelos elegidos pierden precisión. Tal efecto podría atribuirse a los agregados de células muertas que cubren algunas células contra la irradiación, generando así datos variables de recuentos viables cercanos a los límites de detección (Kramer et al., 2017b); sin embargo, también debe tomarse en cuenta las características físicas del alimento que pueden estar contribuyendo a la generación del “efecto sombra” (Kim et al., 2019; Wang et al., 2016). Este efecto también se describe gráficamente con un efecto de cola, donde no hay una inactivación adicional significativa al final del proceso de inactivación (Peleg & Corradini, 2011) ya sea por UVC o por PLAI.

En las curvas de inactivación de BMN en chíá, se obtuvieron valores D_{PLAI} similares a los experimentales; mientras los valores D_{UV} sobreestimaron el tiempo de tratamiento. En cuanto a la existencia de subpoblaciones más resistentes dentro de la microbiota nativa de estas semillas, el modelo bifásico muestra que aproximadamente la mitad de la población inicial tiene una mayor resistencia a la luz UVC; sin embargo, el modelo doble Weibull da valores

δ_1 y δ_2 iguales (equivalentes a D_v para cada subpoblación), contradiciendo la información brindada por el modelo bifásico. Esto se debe a que experimentalmente no se alcanzó una reducción completa de un ciclo logarítmico, por lo que los valores arrojados por los tres modelos derivados de Weibull son extrapolaciones. En términos de inocuidad es preferible un modelo que sobreestime el tiempo de tratamiento; sin embargo, se debe tener en cuenta los efectos en la composición y características sensoriales que esta sobreestimación pueda tener en el producto. Además, cabe señalar que las características de las curvas obtenidas experimentalmente y el error experimental afectan de igual forma el desempeño de los modelos matemáticos ya que, a valores de desviación estándar mayores, se pierde ajuste de los modelos (Peleg & Corradini, 2011).

Por otro lado, las curvas de inactivación de *S. Typhimurium* (Figura 14) y *L. monocytogenes* (Figura 15) tienen forma cóncava en su mayoría; con excepción de las curvas de inactivación de *S. Typhimurium* en alfalfa y chíá que muestran un comportamiento sigmoideal y la inactivación de *L. monocytogenes* en trigo que parece tener un efecto de cola, es decir que presenta una inactivación inicial más rápida, y una población final constante; los cuales son comportamientos comunes en las curvas de inactivación por tecnologías emergentes tales como la luz UVC y los PLAI (Serment-Moreno, 2020). Esta falta de linealidad es debida principalmente a las relaciones complejas y falta de uniformidad en las poblaciones microbianas presentes en sistemas bioquímicos como los alimentos (Serment-Moreno, 2020).

Los modelos de doble Weibull y bifásico asumen la existencia de una subpoblación más resistente a las tecnologías aplicadas para la inactivación de microorganismos (Coroller et al., 2006); sin embargo, en estos experimentos se procuró una población uniforme mediante la aplicación de una presanitización y la inoculación de los patógenos correspondientes en la misma fase de crecimiento. Por lo tanto, para las curvas de inactivación de estos microorganismos se aplicaron solo los modelos de Weibull propuestos por Peleg y Cole (1998) y Mafart et al. (2002).

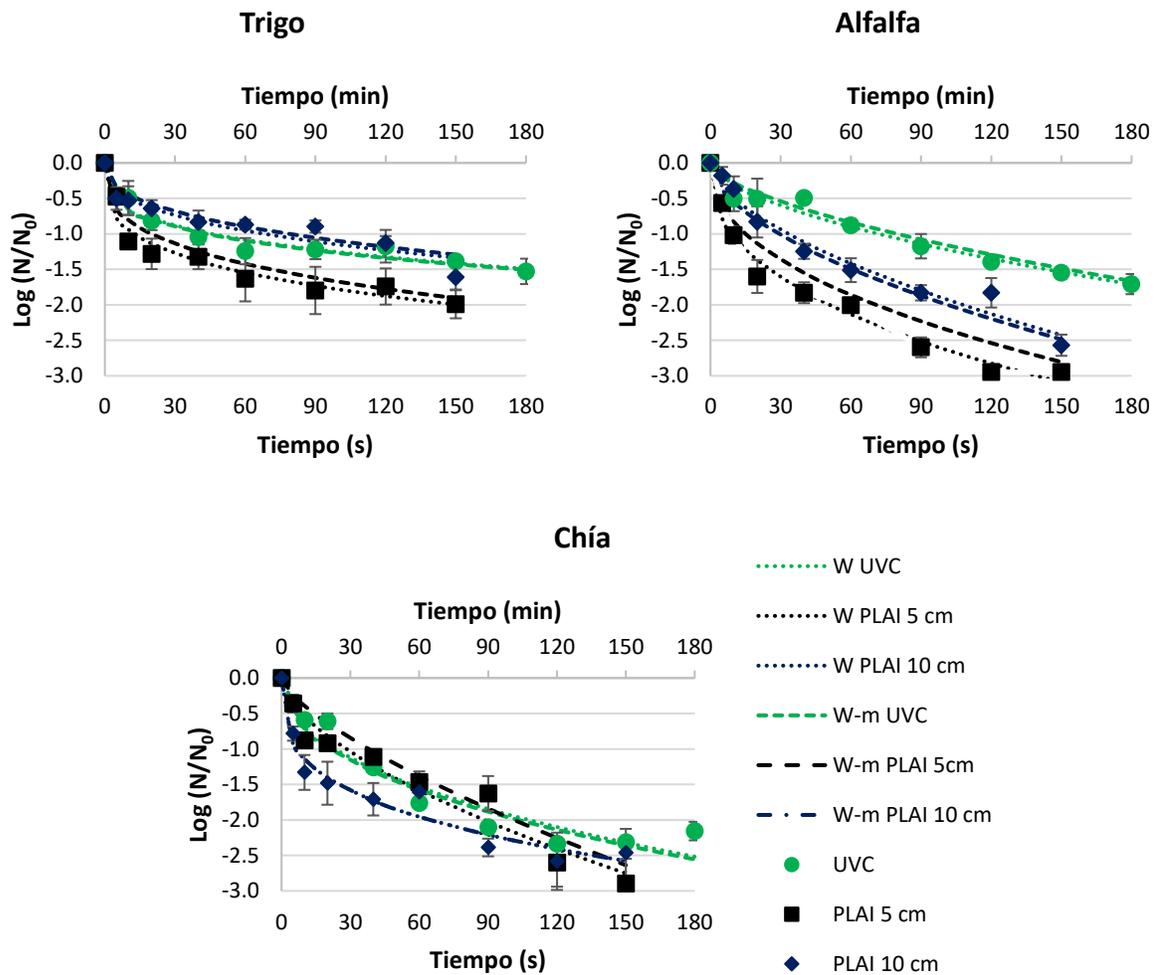


Figura 14. Curvas de inactivación de *S. Typhimurium* ajustadas a modelos no lineales: Weibull (W), Weibull modificado (W-m).

En ambos modelos de Weibull, se obtuvieron valores de correlación $R^2 > 0.93$ (Tabla 9), para su aplicación en la modelación de la inactivación de patógenos, indicando un buen ajuste de los modelos. Sin embargo, se obtuvieron algunas desviaciones en el valor D_{UV} y D_{PLAI} , especialmente en las curvas de inactivación de *L. monocytogenes*. Las curvas de inactivación de este patógeno por la aplicación de UVC y PLAI a 5 cm en chíá subestimaron el tiempo requerido para alcanzar la reducción de un ciclo logarítmico; solo la inactivación por PLAI a 10 cm obtuvo valores $D_{UV,PLAI}$ dentro del rango experimental. Por otro lado, el modelo de Weibull propuesto por Mafart et al. (2002) sobreestimó D_{PLAI} para semillas de trigo y alfalfa tratadas por PLAI a cualquiera de las dos distancias estudiadas.

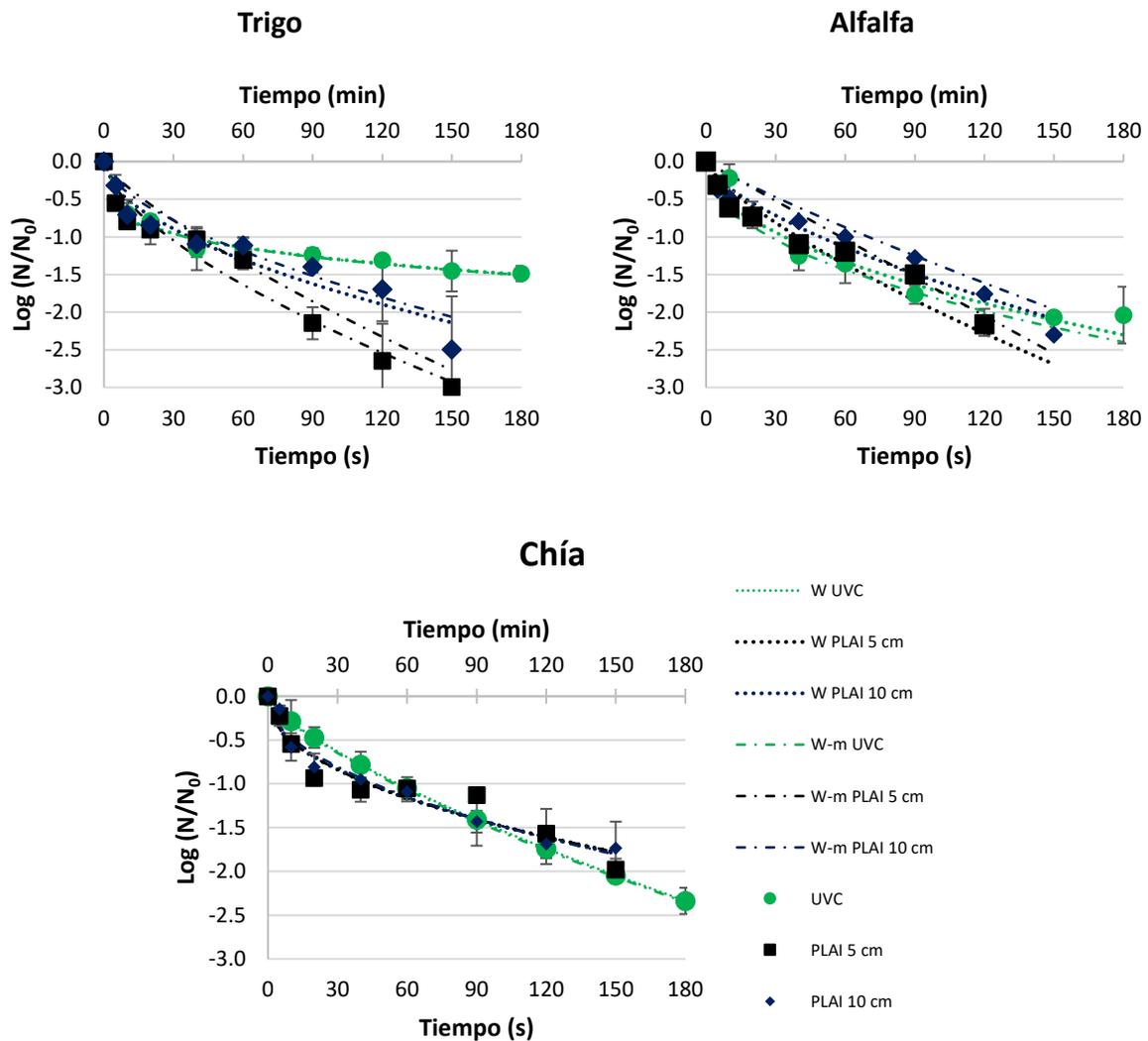


Figura 15. Curvas de inactivación de *L. monocytogenes* ajustadas a modelos no lineales: Weibulll (W), Weibull modificado (W-m).

Por otro lado, además de tomar en cuenta la bondad de ajuste (coeficiente R^2) de los modelos y su precisión para predecir D_V , se debe tomar en cuenta la información que cada modelo proporciona, misma que puede ayudar a detallar la información sobre el fenómeno de inactivación bajo estudio. Por ejemplo, para los modelos de Weibull, se obtienen parámetros que dan información sobre la forma de la curva. Aunque este modelo sea de naturaleza empírica, se establece una relación clara entre los efectos fisiológicas en las células

bacterianas y el tratamiento aplicado. Un valor $n < 1$ indica, no solo una curva cóncava, sino también que las bacterias sobrevivientes al tratamiento tienen habilidad para adaptarse al factor de estrés aplicado (Pérez-Rodríguez & Valero, 2013). Para los sistemas estudiados, en todos los casos se presenta $n < 1$ infiriendo una creciente resistencia de los microorganismos al estrés por luz UVC o por PLAI.

Tabla 9. Parámetros obtenidos de los modelos no lineales ajustados para las curvas de inactivación de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*.

		UVC			PLAI, 5 cm			PLAI, 10 cm		
		Trigo	Alfalfa	Chía	Trigo	Alfalfa	Chía	Trigo	Alfalfa	Chía
<i>S. Typhimurium</i>										
Valor experimental (min ó s)		~40	60-90	20-40	~10	~10	20-40	90-120	20-40	5-10
Weibull	b	0.327	0.082	0.246	0.493	0.406	0.133	0.212	0.127	0.567
	n	0.292	0.584	0.448	0.279	0.405	0.604	0.367	0.588	0.302
	D_v	46	72	23	13	9	28	68	33	6
	R²	0.9780	0.9840	0.9652	0.9747	0.9907	0.9747	0.9513	0.9851	0.9767
Weibull modificado	δ	43.56	79.75	21.41	19.93	15.09	37.92	78.60	29.20	6.51
	p	0.29	0.63	0.44	0.32	0.45	0.71	0.40	0.56	0.30
	D_v	44	80	21	20	15	38	79	29	7
	R²	0.9567	0.9407	0.9317	0.9434	0.9703	0.9525	0.9059	0.9709	0.9540
<i>L. monocytogenes</i>										
Valor experimental (min ó s)		20-40	20-40	60-90	~20	20-40	~60	20-40	~60	40-60
Weibull	b	0.408	0.175	0.053	0.121	0.065	0.174	0.144	0.076	0.163
	n	0.251	0.496	0.728	0.635	0.742	0.464	0.539	0.662	0.479
	D_v	36	34	56	28	39	43	37	49	44
	R²	0.9920	0.9724	0.9887	0.9819	0.9758	0.9640	0.9636	0.9796	0.9870
Weibull modificado	δ	34.86	27.49	54.55	40.91	58.07	43.37	45.99	69.92	40.53
	p	0.25	0.47	0.72	0.78	0.99	0.46	0.61	0.88	0.46
	D_v	345	27	55	41	58	43	46	67	40
	R²	0.9840	0.9465	0.9777	0.9685	0.9586	0.9293	0.9303	0.9665	0.9745

El valor *b* se relaciona con la velocidad de inactivación, y no tiene un parámetro equivalente en la versión modificada (Mafart et al., 2002); sin embargo, ésta última brinda el cálculo directo del valor D_{UV} ó D_{PLAI} por medio del parámetro δ incluido en la ecuación, el cual es

por definición el tiempo al cual se logra la reducción del 90% de bacterias, es decir el valor D_v (Mafart et al., 2002), por lo que no se necesita hacer otros cálculos para obtenerlo.

En el caso de los modelos doble Weibull y bifásico, el primero ofrece valor D_v correspondiente a las dos subpoblaciones cuya existencia se asume, en la forma de δ_1 y δ_2 ; mientras que el modelo bifásico nos brinda información sobre el tamaño de la fracción más resistente ($1-f$) y las velocidades específicas de inactivación (k_{max1} y k_{max2}) para cada subpoblación (Coroller et al., 2006).

En conclusión, la selección de un modelo matemático para describir una cinética de inactivación debe depender del grado de ajuste y precisión ofrecidos al predecir parámetros importantes del proceso, tales como el tiempo de tratamiento. Sin embargo, no debe limitarse solo a esto, más bien tomar en cuenta también de la información que requerimos ya que cada modelo tiene parámetros que representan diferentes fenómenos físicos dentro del proceso de inactivación.

6.5. Análisis de los efectos de los tratamientos de PLAI y UVC en los parámetros de germinación de las semillas

6.5.1. Tasa de germinación

Para evaluar los efectos de la luz UVC en los parámetros de germinación, se eligieron dos tiempos de tratamiento diferentes, 120 y 180 min, con base en la reducción significativa de patógenos y BMN; mientras que, para evaluar los efectos de los PLAI, se eligieron los tiempos máximos de tratamiento (150 s) a las dos diferentes distancias de la fuente lumínica (5 y 10 cm) utilizadas para evaluar la inactivación microbiana. La tasa de germinación fue evaluada como el porcentaje de germinación de semillas cada 24 h durante 5 días. Las figuras 17 y 18 presentan promedio y desviación estándar de la tasa de germinación para cada tiempo de conteo.

El análisis de varianza mostró que los tratamientos con luz UVC (Figura 11) no tuvieron efecto significativo ($p > 0.05$) en la tasa de germinación de semillas de alfalfa y trigo al final de los 5 días del experimento. Sin embargo, se observó que tanto para UVC como para PLAI,

los tratamientos prolongan el tiempo de emergencia de la radícula (primera raíz) dado que se observó una reducción significativa ($p < 0.05$) en la tasa de germinación, en comparación con los controles sin tratamiento, durante las primeras 24 ó 48 h de germinación.

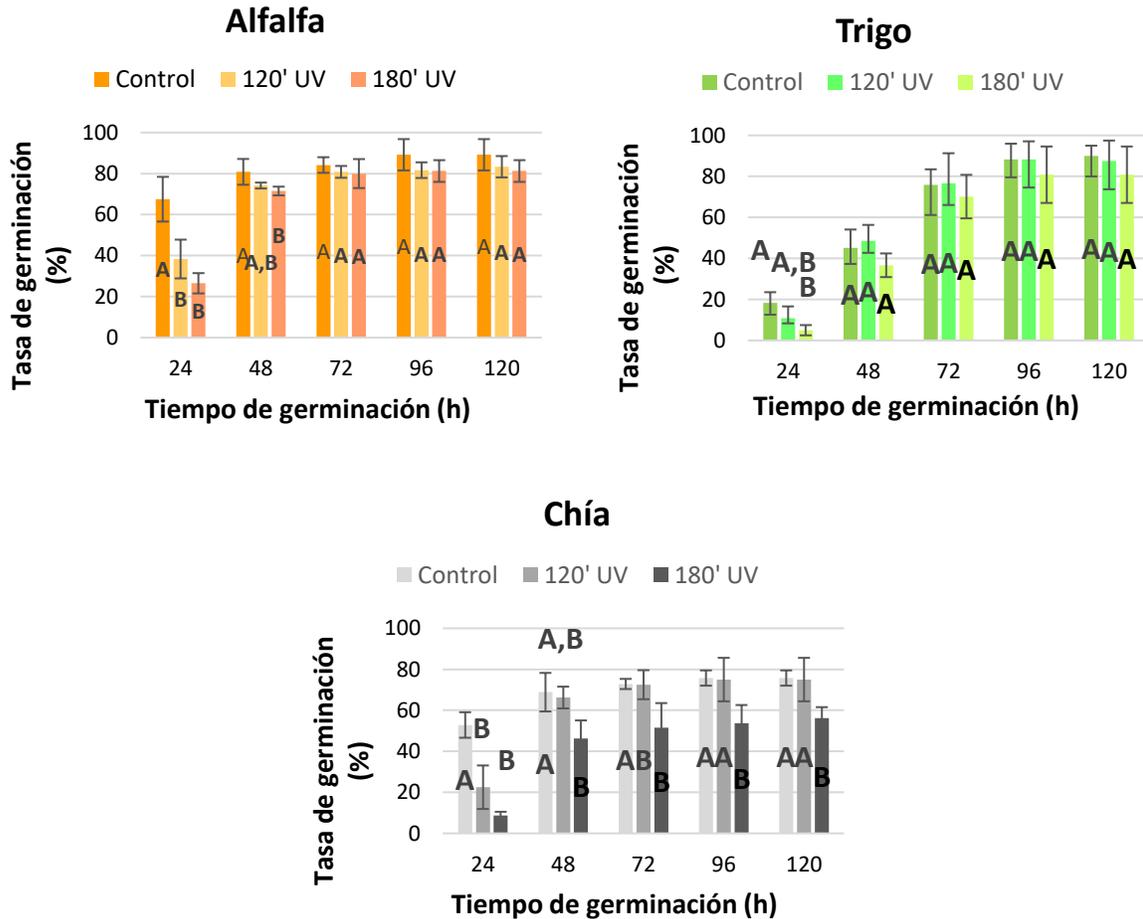


Figura 16. Porcentaje de semillas germinadas de alfalfa, trigo y chíá durante 5 días de semillas sin tratamiento (control) y semillas tratadas con luz UVC. Letras mayúsculas diferentes indica diferencia significativa ($p < 0.05$), dentro del mismo tiempo de germinación.

En las semillas de alfalfa y trigo tratadas con UVC se observa que, a partir de las 72 h de germinación, las diferencias en las tasas de germinación dejan de ser significativas ($p > 0.05$). Sin embargo, para las semillas de chíá tratadas con 120 min de luz UVC, deja de existir una diferencia significativa a partir de las 48 h de germinación; mientras que para las semillas de

chía tratadas con 180 min de luz UVC, esta reducción significativa se mantiene hasta el final del periodo de experimentación (5 días); es decir que la aplicación de 180 min de tratamiento de luz UVC reduce significativamente la tasa de germinación de las semillas de chía.

Por otro lado, para las semillas tratadas con PLAI (Figura 17) se observó que 150 s de tratamiento, a 5 o 10 cm de distancia de la lámpara, no tuvieron efecto significativo ($p>0.05$) en la tasa de germinación de las semillas de trigo; sin embargo, sí existió efecto en la germinación de alfalfa y de chía, específicamente a 5 cm de distancia de la fuente lumínica.

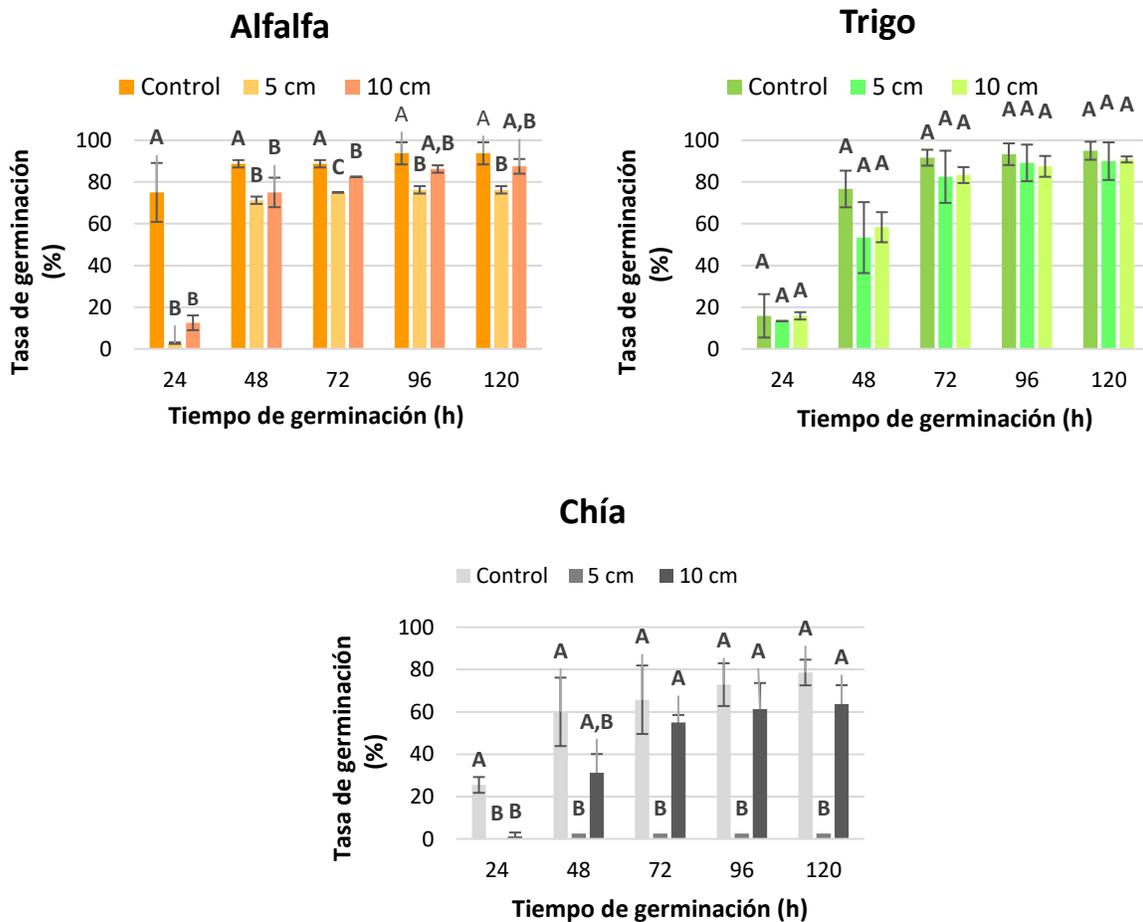


Figura 17. Porcentaje de semillas germinadas de alfalfa, trigo y chía de semillas sin tratamiento (control) y semillas tratadas con PLAI a 5 y 10 cm de distancia durante 150 s. Mayúsculas diferentes indica diferencia significativa ($p<0.05$), dentro del mismo tiempo de germinación

Para las semillas de chíá, los tratamientos a 5 cm afectaron drásticamente la tasa de germinación, ya que solo germinaron menos del 3% de semillas. Los tratamientos a 10 cm no tuvieron efecto significativo ($p > 0.05$) a partir de las 72 h de germinación, pero sí en las primeras 48 h, indicando el mismo retraso observado en las semillas tratadas por UVC. Dado que el “vigor de germinación” se define como el porcentaje de semillas germinadas tras 24 horas y la “viabilidad” como el porcentaje de semillas germinadas tras 72 h (Zenklusen et al., 2018), se concluye entonces que los tratamientos por UVC y por PLAI afectan el vigor de germinación de las semillas de alfalfa y chíá; mas no necesariamente su viabilidad. Mientras que, para trigo, el vigor de germinación se ve afectado solo por los tratamientos con luz UVC, y su viabilidad no se afecta bajo ningún tratamiento.

En cuanto a la alfalfa los tratamientos a 5 cm de distancia tuvieron un efecto significativamente mayor en comparación con los tratamientos a 10 cm de distancia, reduciendo significativamente ($p < 0.05$) la tasa de germinación. No obstante, las semillas de alfalfa tratadas con PLAI a 10 cm de distancia tienen una tasa de germinación cercana al parámetro mínimo aceptable para el porcentaje de germinación en general de 85% (Kim et al., 2019), aunque la Junta de Desarrollo de Horticultura y Agricultura del Reino Unido (AHDB, por sus siglas en inglés) recomienda porcentajes de germinación arriba del 78%. Esto indica que se puede optimizar la aplicación de energía por medio de PLAI, de tal manera que se maximice la tasa de germinación y la reducción microbiana.

La razón por la cual la tasa de germinación se ve afectada en la alfalfa tratada por PLAI a 5 cm de distancia y en chíá tratada con 180 min de luz UVC y por PLAI se relaciona con varios factores. La germinación de las semillas depende de factores internos (latencia, genotipo, madurez) y externos (temperatura, salinidad del medio, luz y condiciones de humedad) (Nadtochii et al., 2019). Sin embargo, algunos de los factores relacionados con parámetros de germinación bajos son: daño mecánico en el grano, daño químico, baja humedad o un secado y calor excesivos, como el secado a muy altas temperaturas (AHDB, s. f.). Estos factores están especialmente relacionados con la caída en el porcentaje de germinación ocasionada por los tratamientos por PLAI; ya que como se describió previamente, en especial en la chíá se alcanzaron temperaturas superiores a los 50°C, la cual es la máxima temperatura

que la mayoría de las semillas soportan sin afectar sus parámetros de germinación (Zenklusen et al., 2018).

Además, Zenklusen et al., (2018) mostraron que al tratar cebada para malteado con PLAI por tiempos superiores a 25 s, se produjeron cambios severos en la estructura de los granos. Las imágenes de microscopía mostraron zonas de destrucción visible en el pericarpio, capas de aleurona, paredes celulares del endospermo y amiloplastos; generando aglomerados irregulares. Estos cambios se correlacionaron con una reducción drástica de entre 50 y 57% del porcentaje de semillas de cebada germinadas.

Por otro lado, Kim et al. (2019) reportaron que al aplicar luz pulsada (PLAI) a las semillas de rábano y pak-choi no hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) en la tasa de germinación luego de la aplicación de una dosis total de 37.8 Jcm^{-2} de PLAI. Por el contrario, al aplicar pulsos de luz de alta intensidad a semillas de trigo la tasa de germinación decayó 13-17% al aplicar dosis específicas de energía entre $25.6\text{-}51.2 \text{ Jg}^{-1}$. Esta disminución de la germinación fue mayor para el trigo rumano que para el trigo español; lo que indica que otros factores propios de la variedad pueden influir también en este efecto (Aron-Maftei et al., 2014). De esta manera se observa que, aunque la información disponible en literatura sobre el efecto de la aplicación de UVC ó PLAI en el porcentaje de germinación de semillas es limitada hasta el momento, se observa que el efecto de estas tecnologías en la germinación depende del tipo de semilla, los parámetros de proceso (tiempo de exposición, dosis de energía) e incluso la forma de entrega de energía (tipo de tecnología aplicada).

6.5.2. Cinética de crecimiento

La longitud de los brotes de semillas tratadas y no tratadas (control) se midió cada 24 h durante cinco días, contados desde la aparición del primer brote de la radícula ($\sim 2 \text{ mm}$). La cinética de crecimiento de semillas germinadas tratadas con 0 (control), 120 y 180 min de luz UVC se representa en la Figura 18. A primera vista, parece haber un incremento en el crecimiento de la alfalfa y el trigo, y una disminución en las tasas de semillas de chíá cuando son tratadas con luz UVC. Para cuantificar este efecto se estableció una altura meta mínima de 4.0 cm para alfalfa, 3.5 cm para chíá y 3.0 cm para trigo. Las alturas meta para alfalfa y

chía se establecieron con base a la altura promedio mínima para su comercialización; mientras que para trigo se eligió la altura promedio en la cual comienza a crecer la primera hoja verdadera ya que de acuerdo con definiciones técnicas, este es el momento en que se convierte en un “microgreen” (Treadwell et al., 2020).

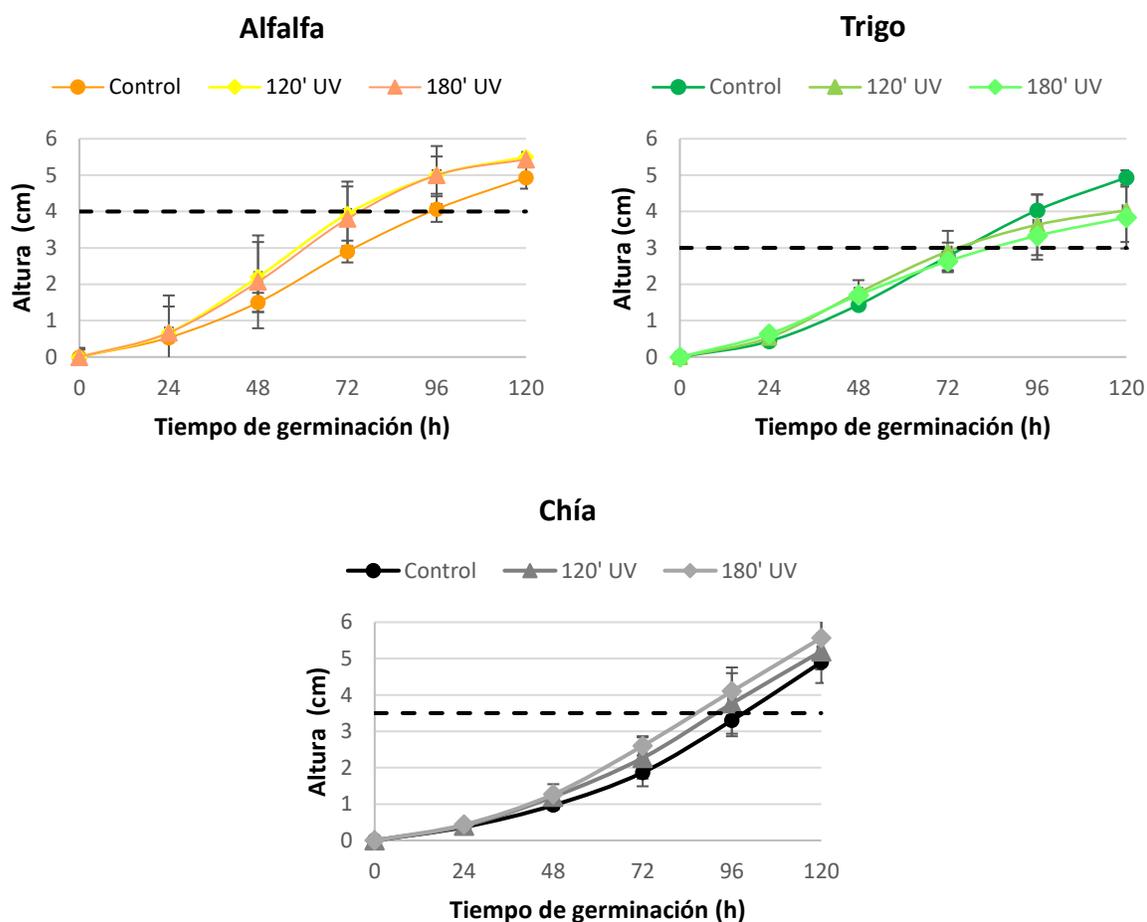


Figura 18. Cinética de crecimiento de semillas germinadas de alfalfa, trigo y chía, sin tratamiento (control) y tratadas con 120 ó 180 min de luz UVC. Las líneas punteadas representan la altura mínima deseada para cada semilla.

En el análisis visual de las cinéticas de crecimiento de las semillas tratadas con luz UVC, se puede observar una reducción en el tiempo de crecimiento para alcanzar las alturas metas establecidas para semillas de alfalfa y trigo; por el contrario, para las semillas de chía se observa un incremento de este tiempo en las semillas con mayor tiempo de exposición a la luz UVC (180 min).

La reducción en el tiempo requerido para alcanzar la altura meta de los brotes de alfalfa se mantiene, aunque con menor diferencia, en las semillas de alfalfa y de trigo tratadas con PLAI a 5 y 10 cm; pero en la chíá se observa no solo una disminución general de la tasa de germinación, sino que no se logra alcanzar esta altura cuando son tratadas con 150 s de PLAI a 5 o 10 cm (Figura 19).

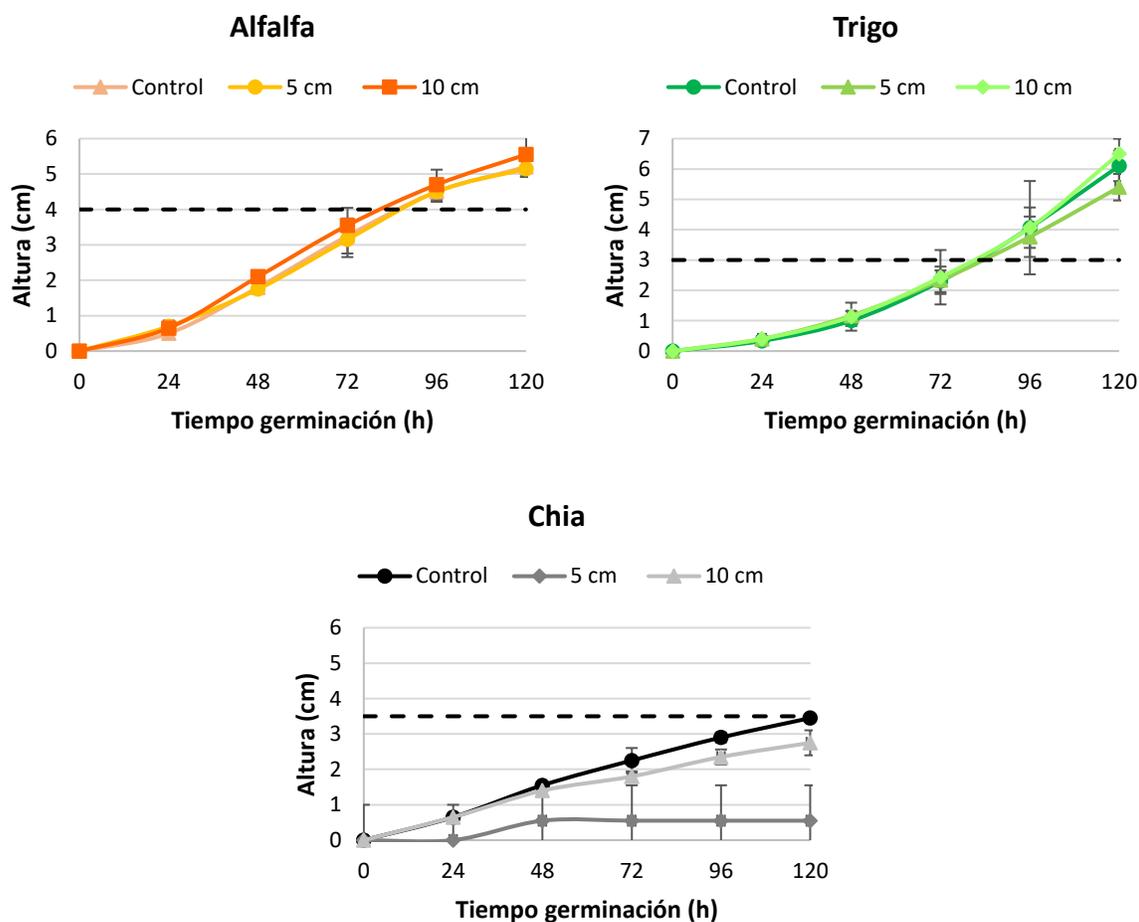


Figura 19. Cinética de crecimiento de semillas germinadas de alfalfa, trigo y chíá, sin tratamiento (control), y tratadas con PLAI a 5 ó 10 cm de distancia de la fuente lumínica durante 150 s. Las líneas punteadas representan la altura mínima deseada para cada semilla.

El tiempo de crecimiento de los brotes o plántulas, es el periodo durante el cual se desarrolla la planta joven, desde que se completa la germinación hasta que esta que puede producir

suficientes alimentos a través de la fotosíntesis para sostener su crecimiento (Meyer, 1999). Durante este proceso se realizan una serie de reacciones metabólicas enfocadas en producir los componentes, compuestos fenólicos entre otros, que la plántula requiere para su desarrollo estructural y crecimiento (Chon et al., 2002). El principal mecanismo de acción de la luz UVC y de los PLAI es el efecto fotoquímico, que afecta principalmente al ADN, pero también puede actuar en dobles enlaces de otros tipos de moléculas que contengan enlaces dobles (Heinrich et al., 2016); por lo tanto, no se puede descartar que la aplicación de las tecnologías estudiadas afecten moléculas claves del desarrollo metabólico y producción de los compuestos esenciales para el crecimiento de la plántula, como las enzimas.

6.6. Optimización de los parámetros de germinación y la inactivación de BMN por superficie de respuesta

Para optimizar los resultados de los tratamientos con luz UVC y PLAI, los datos obtenidos de la tasa de germinación, la cinética de crecimiento y la reducción de BMN se analizaron mediante un modelo de superficie de respuesta. De los modelos obtenidos, se omitieron los términos que no fueran significativos ($p > 0.05$). Los coeficientes obtenidos para la optimización de los parámetros de tratamiento por luz UVC, se encuentran en la Tabla 10; mientras que los correspondientes a los tratamientos por PLAI se encuentran en la Tabla 11. Los modelos generados obtuvieron coeficientes de ajuste (R^2) entre 83-93% para el tratamiento con luz UVC, y entre 65-93% para PLAI, explicando entonces la variabilidad de $>83\%$ de las desviaciones producidas en los tratamientos por luz UVC y $>65\%$ de las producidas en los tratamientos por PLAI.

El análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta de los tratamientos por luz UVC mostró que, para la tasa de germinación todos los factores son significativos ($p < 0.05$) con excepción de la interacción entre tiempo de tratamiento. Para altura del germinado, solo el tiempo de tratamiento y de germinación son significativos; mientras que las interacciones cuadráticas tuvieron un efecto despreciable ($p < 0.05$) en la respuesta analizada.

Tabla 10 Parámetros obtenidos de los modelos de superficie de respuesta para las semillas tratadas por luz UVC.

Semilla	Término		Reducción (log UFC/g)	Altura (cm)	Germinación (%)
Alfalfa	Constante	β_0	3.255	-0.538	31.5
	Tratamiento (min)	β_1	-0.009	0.00369	-0.182
	Tiempo (h)	β_2	-0.029	0.04698	1.444
	Trat*Trat	β_3	-0.00002	*	*
	Tiempo*tiempo	β_4	*	*	-0.00825
	Trat*tiempo	β_5	*	*	0.00853
Trigo	Constante	β_0	4.119	-1.114	-20.15
	Tratamiento (min)	β_1	-0.014	0.00279	-0.1049
	Tiempo (h)	β_2	-0.029	0.04698	1.903
	Trat*Trat	β_3	-0.00002	*	*
	Tiempo*tiempo	β_4	*	*	-0.00825
	Trat*tiempo	β_5	*	*	0.00853
Chia	Constante	β_0	2.693	-0.652	15.73
	Tratamiento (min)	β_1	-0.009	0.00157	-0.1677
	Tiempo (h)	β_2	-0.029	0.04698	1.468
	Trat*Trat	β_3	-0.00002	*	*
	Tiempo*tiempo	β_4	*	*	-0.00825
	Trat*tiempo	β_5	*	*	0.00853
Lack-of-Fit			0.087	0.553	0.866
R-sq			93.02%	88.79%	83.37%

*Coeficientes sin efecto significativo en el modelo ($p>0.05$)

Para los tratamientos por PLAI, el modelo obtenido mostró que no existe un efecto ($p>0.05$) por la doble interacción del factor distancia para ninguna de las respuestas analizadas; mientras que la interacción entre distancia y tiempo de tratamiento solo afecta ($p<0.05$) a la tasa de germinación.

Tabla 11. Parámetros obtenidos de los modelos de superficie de respuesta para las semillas tratadas con PLAI.

Semilla	Término		Población final (log UFC/g)	Altura (cm)	Tasa germinación (%)
Alfalfa	Constante	β_0	-0.593	-1.076	6.2
	Distancia	β_1	0.0497	0.0548	3.62
	Tiempo germi	β_2	-0.02699	0.0534	1.304
	Distancia*distancia	β_3	*	*	*
	Tiempo*tiempo	β_4	0.000112	*	-0.00953
	Distancia*tiempo	β_5	*	*	0.0841
Trigo	Constante	β_0	-0.286	-1.495	5.4
	Distancia	β_1	0.0497	0.0548	-3.62
	Tiempo germi	β_2	-0.02699	0.05340	1.408
	Distancia*distancia	β_3	*	*	*
	Tiempo*tiempo	β_4	.000112	*	-0.00953
	Distancia*tiempo	β_5	*	*	0.0841
Chia	Constante	β_0	-0.889	-1.076	18.4
	Distancia	β_1	0.0497	0.0548	-3,62
	Tiempo germi	β_2	-0.02699	0.05340	0.747
	Distancia*distancia	β_3	*	*	*
	Tiempo*tiempo	β_4	.000112	*	-0.00953
	Distancia*tiempo	β_5	*	*	0.0841
Lack-of-Fit			0.001	0.399	$1.9*10^{-5}$
R-sq			71.30%	92.75%	65.75%

*Coeficientes sin efecto significativo en el modelo ($p>0.05$)

Ambos modelos se utilizaron para predecir los valores óptimos (Tabla 12) para maximizar el porcentaje de germinación (%) y las reducciones microbianas ($\log N/N_0$) al tiempo que se establece la altura objetivo para garantizar la altura mínima con fines comerciales (alfalfa=4 cm, chía=3.5, trigo=3.0) (Treadwell et al., 2020). De acuerdo con estos resultados, para reducir los efectos observados en la tasa de germinación de alfalfa, se pueden aplicar 150 s de PLAI a 10 cm de distancia de la fuente lumínica para aumentar el porcentaje de

germinación hasta 96%, reduciendo así el efecto perjudicial obtenido por los PLAI y garantizando una reducción de BMN de 2 ciclos logarítmicos; sin embargo, se necesita validar estos resultados de manera experimental.

Tabla 12. Condiciones de procesamiento optimizadas a partir de los modelos de superficie de respuesta.

Luz UVC						
Factores del proceso			Respuestas del modelo			
	Tiempo de tratamiento (min)	Tiempo germinación (h)	Altura (cm)	Germinación (%)	Reducción total BMN (log UFC/g)	Deseabilidad
Alfalfa	165	105	4.0	85	1.37	0.8805
Trigo	180	102	3.0	88	2.19	0.7414
Chia	176	116	3.5	63	1.21	0.7090
PLAI						
Factores del proceso			Respuestas del modelo			
	Distancia (cm)	Tiempo de germinación (h)	Altura (cm)	Germinación (%)	Reducción total BMN (log UFC/g)	Deseabilidad
Alfalfa	10	85	4.0	91	2.02	0.8504
Trigo	10	74	3.0	84	1.56	0.8028
Chia	10	85	3.5	48	1.75	0.6263

Sin embargo, a pesar de haber obtenido valores que maximizan la reducción de BMN, y aseguran la altura meta, no se obtuvieron valores adecuados de porcentaje de germinación para chíá, con ninguna de las dos tecnologías aplicadas. El máximo porcentaje de germinación obtenido para chíá fue de 63% con UVC, muy por debajo de los valores establecidos como parámetro de calidad de los lotes de semillas (AHDB, s. f.); lo que reafirma que la exposición a la luz UVC y a los PLAI afecta significativamente la tasa de germinación y el crecimiento de semillas de chíá.

6.7. Análisis de los efectos de los tratamientos de PLAI y UVC en la actividad antioxidante de semillas y germinados

6.7.1. Evaluación de actividad antioxidante (DPPH) en semillas y germinados de semillas tratadas por UVC o por PLAI

Se evaluó el efecto en la actividad antioxidante de semillas y germinados tratados por luz UVC (Figura 20) y por PLAI (Figura 21), por medio de la actividad neutralizante del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH). Los resultados están expresados como equivalentes de Trolox en 100 gramos de muestra en base seca (mgTrolox/100g b.s.).

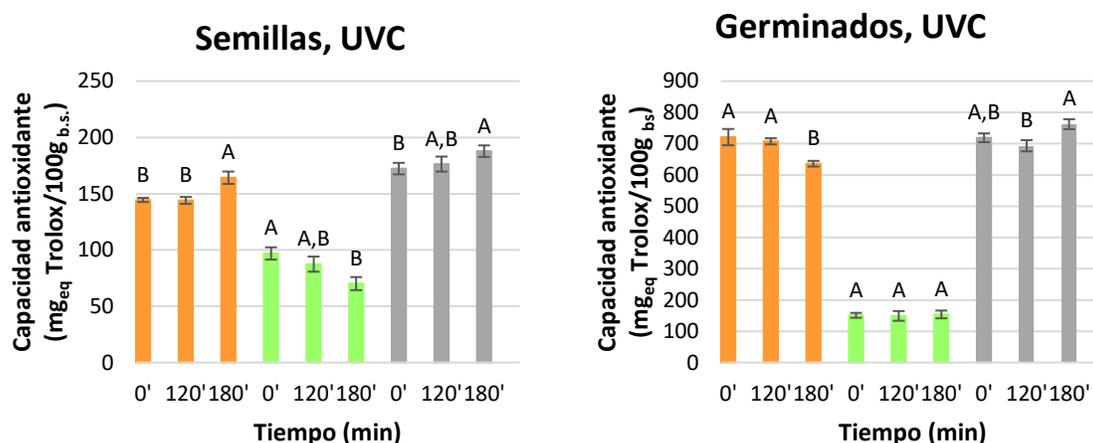


Figura 20. Capacidad antioxidante de semillas y germinados sin tratamiento (0') y tratados con 120 y 180 min de luz UVC. Alfalfa: naranja, trigo: verde y chía: gris. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) del tratamiento para cada semilla.

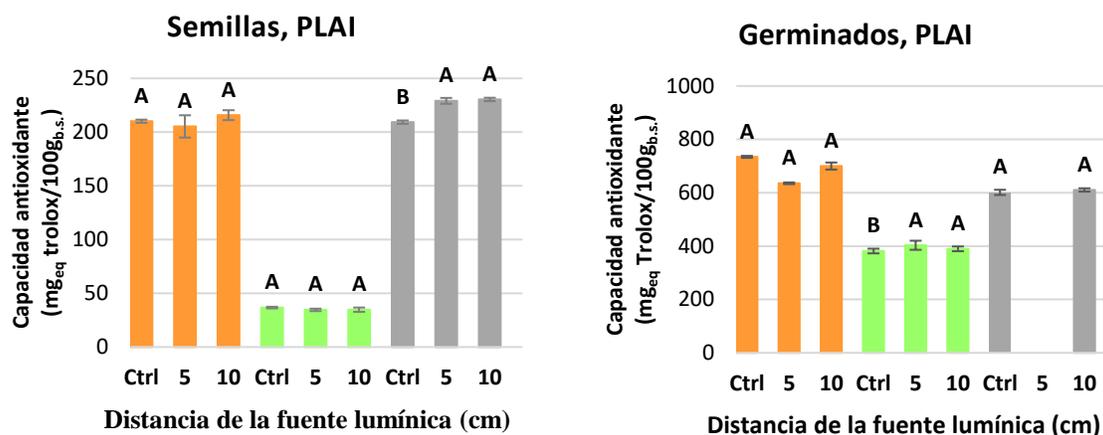


Figura 21. Capacidad antioxidante de semillas y germinados sin tratamiento (Ctrl) y tratados con 150 s de PLAI a 5 y 10 cm de la fuente lumínica. Alfalfa: naranja, trigo: verde y chíá: gris. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) del tratamiento para cada semilla.

Los resultados obtenidos se encuentran, en general, dentro de los rangos reportados por otros autores. Por ejemplo, Zagórska-Dziok et al. (2020) reportaron valores de % de inhibición de radical DPPH entre 19-40% para semillas de alfalfa, mientras que Jing, Dong y Tong (2015) reportaron valores entre 68 y 77% para hojas de brotes de alfalfa. Aunque los resultados de la Figura 21 se expresan en mg de Trolox por 100 g de muestra, los cálculos de los resultados obtenidos reportan un % de inhibición de entre 64 y 78% para los germinados y entre 28-35% para semillas, coincidiendo con los datos reportados en dichos estudios. Por otro lado, Han (2021) reportó entre 20-70 mg_{eq}Trolox/L de extracto de trigo germinado, mientras que los valores obtenidos para los germinados des semillas de trigo tratadas por luz UVC se encuentran entre 60-175 mg_{eq}Trolox/L de extracto. Beltrán-Orozco et al. (2020) reportaron una actividad antioxidante equivalente a 41.1 y 82.9 μ mol eq. Trolox/g de muestra para semillas y germinados de chíá, respectivamente.

Las semillas de alfalfa y chíá tratadas con luz UVC, y las de chíá tratadas con PLAI, incrementaron significativamente ($p < 0.05$) los mg equivalentes de Trolox, en comparación con las semillas no tratadas. Mientras que se observó el efecto contrario para semillas de trigo

tratadas con luz UVC; sin embargo, el tratamiento con PLAI no afectó significativamente ($p > 0.05$) la capacidad antioxidante de neutralización del radical DPPH en estas semillas.

El desarrollo de una planta a partir de la semilla pasa por varias etapas a través de las cuales diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS) se encuentran involucradas de forma particular para cada una. En algunas de estas etapas, el papel que juegan las ROS es benéfico; por ejemplo, durante la imbibición de la semilla, los ROS juegan un papel de señal química que interrumpe la latencia de la semilla (Buchanan & Balmer, 2005; El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 2008). En otras etapas, su incremento puede generar un estrés oxidativo suficientemente significativo como para dañar la plántula, por esto, los sistemas antioxidantes presentes en las semillas y los germinados tienen estrecha relación con la regulación de ROS durante la germinación y crecimiento de los germinados (Apel & Hirt, 2004; Pehlivan, 2017).

Lo anterior explica el incremento de la actividad antioxidante en las semillas de alfalfa tratadas con luz UVC, y en las de chíá tratadas con UVC y con PLAI; ya que los fotones de energía componentes de la luz UVC y de los PLAI, son capaces de afectar diversas moléculas de relevancia biológica; como lípidos, esteroides y algunas proteínas, produciendo fotooxidación y generando ROS (Hinds et al., 2019). Como respuesta a esto, las semillas pueden activar sus sistemas antioxidantes ya sea por mecanismos enzimáticos o no-enzimáticos (ácido ascórbico, tocoferoles, polifenoles, carotenoides y flavonoides) (Pehlivan, 2017). Sin embargo, si los sistemas antioxidantes de las semillas dependen mayoritariamente de los mecanismos enzimáticos, su actividad antioxidante puede disminuir (Pehlivan, 2017), como en las semillas de trigo; debido a la desnaturalización de estas moléculas por parte de los fotones de alta energía de la luz UVC, la cual tiende a producir una mayor oxidación que los PLAI gracias a sus tiempos de tratamientos más prolongados (Keklik et al., 2012). ; tal como es el caso de las semillas de trigo tratadas con UVC.

Por otro lado, la actividad de captación de radicales DPPH se vio significativamente afectada ($p < 0,05$) en los germinados de alfalfa provenientes de semillas expuestas a 180 min de luz UVC; contrario al efecto que se produjo en los germinados de chíá tratada con luz UVC y de trigo tratado con PLAI, en los cuales la actividad antioxidante se vio significativamente

($p < 0.05$) incrementada. En los germinados de alfalfa provenientes de semillas tratadas con PLAI y en los de semillas de trigo tratadas con UVC, no se observó ningún efecto en la actividad antioxidante como producto de los tratamientos.

Se observa que la tendencia de los cambios en la actividad antioxidante de los germinados se encuentra en orden inverso a la de sus correspondientes semillas. Este fenómeno se encuentra relacionado con el estrés oxidativo asociado a las diferentes reacciones metabólicas durante el proceso de germinación; el cual, como se comprobó, ya se estaba generando desde la semilla. Esto puede contribuir al rápido agotamiento de las diferentes moléculas componentes del sistema antioxidante de las plantas (El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 2008; Pehlivan, 2017)

Además, en todos los casos se observa un incremento significativo de la actividad antioxidante de los germinados en comparación con la semilla de la cuál provienen, ya que durante la germinación se mejora el perfil nutricional (Aloo et al., 2021) y la cantidad de compuestos antioxidantes, en comparación con los disponibles en la semilla, debido a la cascada de reacciones metabólicas involucradas en el desarrollo de la plántula (Pehlivan, 2017).

Aunado a esto, para el caso específico del incremento de actividad antioxidante en las semillas de chía tratadas, en relación a su subsecuente decremento en el germinado y la caída significativa de su tasa de germinación; se debe tener en cuenta que en las semillas de chía, al tener un contenido de ácidos grasos que va del 25 al 40% (Shen et al., 2018), se generan reacciones oxidativas en cadena tanto por efecto de la luz UVC o de los PLAI, como por la presencia de ROS cuya concentración aumenta, particularmente en forma de radical hidroxilo (OH^*), el cual es altamente tóxico para las células del embrión de la planta (Apel & Hirt, 2004; Halliwell, 2006; Pehlivan, 2017). Además, el radical hidroxilo puede dañar el ADN celular atacando las bases de purina y pirimidinas de éste, inactivar enzimas por la degradación de sus aminoácidos y dañar proteínas de transporte (Halliwell, 2006), afectando así la germinación.

6.7.2. Evaluación del contenido de fenoles totales (TPC) en semillas y germinados de semillas tratadas con luz UVC o PLAI

El efecto en el contenido de fenoles totales (TPC) de semillas y germinados tratados por luz UVC (Figura 22) y por PLAI (Figura 23), fue medido por medio del método espectrofotométrico utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Los resultados están reportados como mg equivalentes de ácido gálico (G.A) en 100 gramos de muestra en base seca ($\text{mg}_{\text{eq}} \text{AG}/100\text{g}_{\text{b.s.}}$).

En general, la actividad de TPC es más baja que la de DPPH porque la actividad antioxidante de los materiales vegetales se debe no solo a los compuestos fenólicos sino también a otros compuestos, como los flavonoides o los carotenoides, que juegan un papel importante en la capacidad antioxidante de diferentes vegetales (Han, 2021; Pehlivan, 2017).

Además, los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por (Han, 2021) durante los primeros días del proceso de germinación de diferentes cultivares de trigo. Según otros autores, el ácido ferúlico, la catequina, el galato de epigallocatequina y la luteolina son los principales compuestos fenólicos que se encuentran en el trigo germinado (Donkor et al., 2012). Estos compuestos bioactivos tienen varias ventajas para la salud humana, incluidos los efectos antiinflamatorios y anticancerígenos (Abdel-Aty et al., 2021), y la mejora del metabolismo de la glucosa (Donkor et al., 2012).

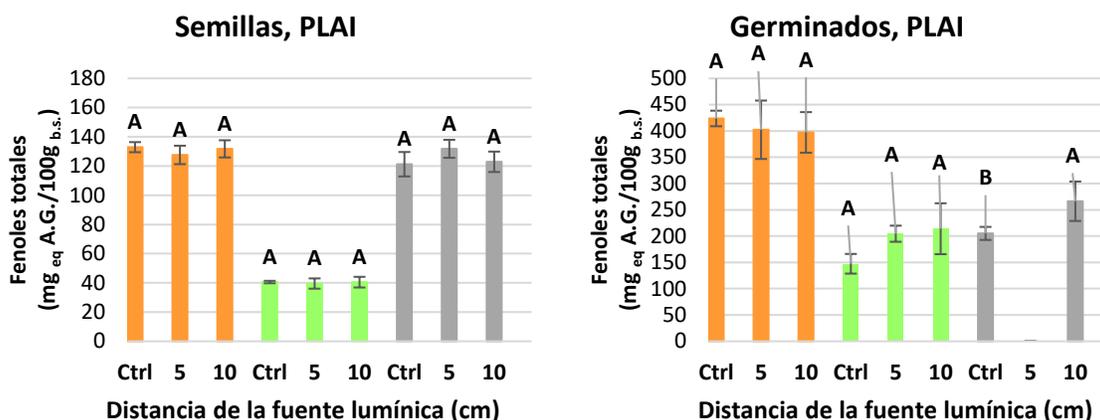


Figura 22. Contenido de fenoles totales de semillas y germinados sin tratamiento (Ctrl) y tratados con 150 s de PLAI a 5 y 10 cm de la fuente lumínica. Alfalfa: naranja, trigo: verde y chía: gris. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p>0.05$) del tratamiento para cada semilla.

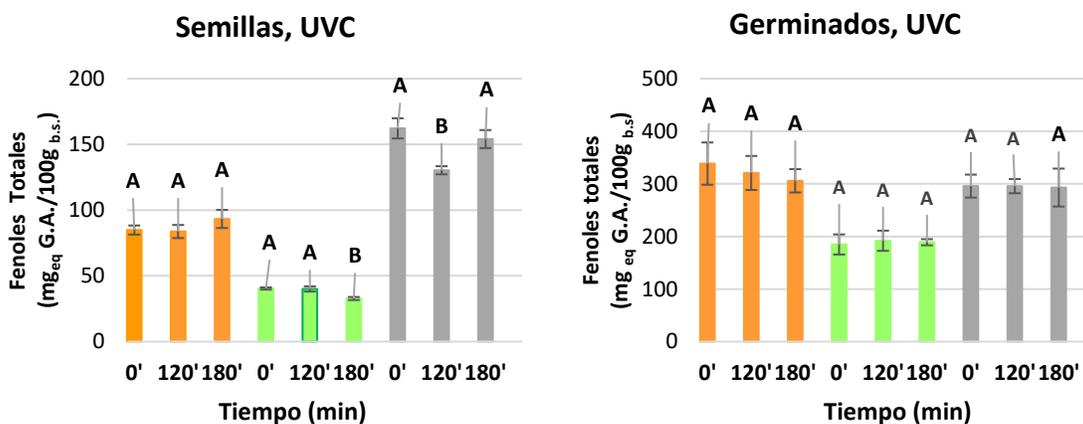


Figura 23. Contenido de fenoles totales de semillas y germinados sin tratamiento (0') y tratados con luz UVC durante 120 ó 180 min. Alfalfa: naranja, trigo: verde y chía: gris. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p>0.05$) del tratamiento para cada semilla.

Por otro lado, mientras que los valores de TPC de las semillas de chía tratadas con 120 min de luz UVC tuvieron un efecto perjudicial significativo ($p<0.05$), los tratamientos no

afectaron significativamente los TPC de los germinados de estas semillas. En cuanto al contenido de TPC de semillas y germinados de alfalfa, no se tuvieron diferencias significativas ($p > 0.05$) por efecto de luz UVC o de PLAI, a diferencia de la actividad antioxidante (DPPH) donde sí se presentaron diferencias; por lo tanto, en los brotes de alfalfa la actividad antioxidante no está directamente relacionada con el contenido fenólico (Beltrán-Orozco et al., 2020). Diferentes estudios han demostrado que, dependiendo de la planta, cuando el TPC se ve afectado por diferentes factores, el DPPH también puede verse afectado (Kim, Jeong, Gorinstein & Chon, 2012).

Otros autores han informado que los principales ácidos fenólicos en semillas y brotes de chía son los ácidos rosmarínico, cafeico, protocatecúico y clorogénico, mientras que la catequina, la quercitina y la apigenina son los principales componentes flavonoides que se suman al TPC de los extractos (Abdel-Aty et al., 2021; Martínez-Cruz & Paredes-López, 2014). Durante la germinación se producen dos compuestos fenólicos de novo: ácido *p*-cumárico y kaempferol (Abdel-Aty et al., 2021). La mayoría de estos compuestos fenólicos presentan actividades bioactivas como hipoglucemiante, protectora de la memoria, antiinflamatoria, antioxidante y hepatoprotectora (Barakat et al., 2020; Chang et al., 2015). Además de las propiedades beneficiosas para la salud de estos compuestos, su funcionalidad en el crecimiento de la planta durante las primeras etapas de la germinación es crucial para el desarrollo de las plántulas porque las células vegetales sintetizan compuestos fenólicos solubles para conjugarse nuevamente con la pared celular. Posteriormente, los compuestos fenólicos se utilizan para sintetizar polímeros de la pared celular y lignina (Abdel-Aty et al., 2021). Por lo tanto, el TPC más bajo en los brotes de semillas sometidas a tratamientos con UVC o con PLAI podría explicar la disminución significativa en los parámetros de germinación de chía.

Los resultados sugieren que los tratamientos UVC sobre semillas de chía afectan el mecanismo por el cual se producen los compuestos fenólicos, afectando la germinación. Se ha demostrado que la luz ultravioleta produce fotooxidación afectando a otras moléculas biológicas, además de la estructura del ADN, como proteínas (incluyendo enzimas), lípidos y esteroides (Gayán et al., 2014). Los resultados de una investigación realizada por Abdel-Aty

et al (2021) sugieren que, en la germinación de semillas de chía, las actividades de polifenoloxidasa (PPO), catalasa (CAT) y peroxidasa (POD) están fuertemente correlacionadas con el contenido de fenoles y flavonoides. Otros estudios han demostrado que la actividad antioxidante de algunos germinados está relacionada con la activación de estas enzimas antioxidantes que regulan sinérgicamente la generación y consumo de H₂O₂ al oxidar compuestos fenólicos (Jin et al., 2017). La acumulación de H₂O₂ se asocia con una disminución de los mecanismos antioxidantes y es una fuente de estrés que suprime la germinación (Ali & Elozeiri, 2017). Además, se ha demostrado que la POD desempeña un papel en la polimerización de mono y difenoles para producir polifenoles (Abdel-Aty et al., 2021). Por lo tanto, es factible que los tratamientos con luz UVC y PLAI puedan afectar enzimas antioxidantes como la POD, afectando la producción de componentes fenólicos que participarían en el metabolismo de la planta y finalmente afectarían su germinación.

6.8. Análisis sensorial de los germinados de las semillas de PLAI y UVC

Para el análisis sensorial de las semillas se realizó una prueba triangular a las semillas tratadas con 180 min de luz UVC y con 150 s de PLAI a 5 cm de distancia; ya que estos tratamientos obtuvieron los valores más altos de ΔE (Tabla 13). Los germinados evaluados sensorialmente también provenían de semillas con estos tratamientos.

Tabla 13. Valores de cambio neto de color (ΔE^*) de semillas tratadas con UVC ó PLAI.

	ΔE^*		
	Alfalfa	Trigo	Chía
UV 120 min	1.15	1.32	1.36
UV 180 min	1.23	1.26	2.21
PLAI 5 cm	1.49	2.40	0.62
PLAI 10 cm	0.69	0.44	0.49

En cuanto a la encuesta realizada a los jueces, previo a la prueba triangular se determinó que, de los participantes (edad entre 20-69 años), 80% de los participantes indicaron estar familiarizados con los productos de semillas germinadas. En cuanto a frecuencia de consumo, 55% indicaron que consumen germinados al menos una o más veces al mes, mientras que

45% mencionó consumirlos ocasionalmente; por lo que se deduce que todos los participantes han probado alguna vez este tipo de productos.

Adicionalmente se les preguntó a los participantes de qué semillas ha consumido sus germinados; siendo alfalfa, soya y lenteja los más frecuentemente respondidos. Además, se les dio a los participantes una lista de germinados, incluyendo germinados de consumo menos frecuente en México, y se les pidió indicaran cuál o cuáles estarían dispuestos a probar por primera vez (Figura 24). Más de la mitad de los participantes indicó que estarían dispuestos a probar germinados de amaranto, rábano, linaza y girasol. Esto refleja el mercado creciente de semillas cuya forma de consumo no era frecuente en forma de germinados, al menos en nuestro país.

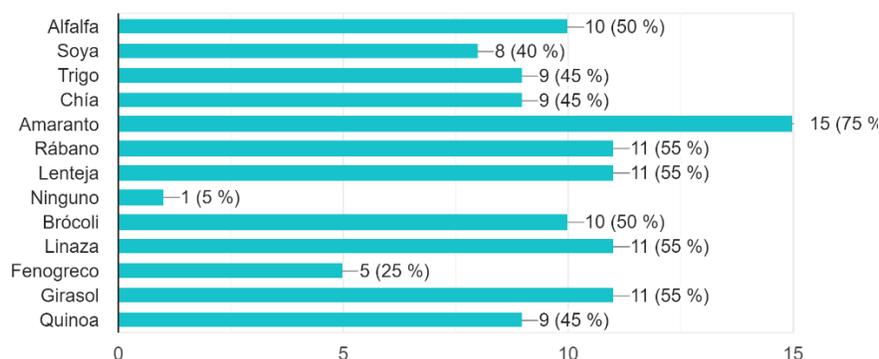


Figura 24. Encuesta de hábitos de consumo de germinados en 30 encuestados, edad entre 21 y 65 años.

En cuanto a los resultados de la prueba triangular de evaluación sensorial, para un nivel de certidumbre de $\alpha=0.05$ se debe tener al menos 24 jueces (Sinkinson, 2017), criterio que es cumplido con 30. De acuerdo con tablas estadísticas (Roessler et al., 1965), el número mínimo de respuestas acertadas para determinar diferencias significativas en una evaluación con $n=30$ debe ser igual a 15 aciertos. Como se observa en la Tabla 14, en ninguna de las muestras se alcanza o supera este número de respuestas acertadas por lo que se puede concluir que ni los tratamientos con luz UVC a 180 min, ni los tratamientos con PLAI a 5 cm de

distancia, tienen un efecto significativo ($p < 0.05$) en el color de las semillas tratadas o en los atributos generales de los germinados de estas semillas.

Tabla 14 Número de respuestas acertadas dadas por panelistas no entrenados en la evaluación triangular de semillas y germinados tratados con UVC o PLAI.

No. Jueces 30	Mínimo de respuestas correctas con $\alpha=0.05$ **			
	Semillas		Germinados	
	UVC (180 min)	PLAI (150s, 5 cm)	UVC (180 min)	PLAI (150, 5 cm)
Alfalfa	10	9	10	12
Trigo	9	9	9	9
Chía	8	12	11	n.d.*

*No se evaluaron germinados de chía de semillas tratadas con PLAI a 5 cm

** Roessler et al., 1948

7. Conclusiones

Tanto la luz UVC como los PLAI pueden ser utilizados como tecnologías alternativas para mejorar la calidad microbiológica general (reducción de flora nativa, BMN) de semillas de alfalfa, trigo y chíá. Tanto con luz UVC como con PLAI se lograron reducciones significativas de BMN; sin embargo, los PLAI a 5 cm de distancia fueron más efectivos para la inactivación de patógenos (*S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*) de $10^3 \log_{10}$ UFC/g inoculados, dependiendo de la semilla. Los resultados demostraron tener una correlación con el incremento de temperatura producido en las semillas; además de estar fuertemente relacionados con las características físicas de las semillas, lo que demuestra que la morfología y la topografía de las semillas deben considerarse para mejorar la eficacia de esta tecnología para la desinfección de semillas y probarse en semillas contaminadas de forma natural.

La exposición a estas tecnologías no tuvo un efecto significativo en detrimento de los parámetros de germinación de alfalfa y trigo; sin embargo, su aplicación en chíá se recomienda que sea cuando el uso propuesto sea para consumo directo (como “topping” de postres, ensaladas, etc), ya que se ve afectada su tasa de germinación. Además, en el caso de esta semilla (chía), se resalta que la aplicación de estas tecnologías aumenta significativamente su actividad antioxidante lo cual puede ser un valor agregado para su consumidor. Este incremento en actividad antioxidante y fenoles totales también tuvo lugar en germinados de trigo; por lo que estas tecnologías podrían ser alternativas aplicables a semillas de alfalfa y trigo para germinar, y en semillas de chíá para consumo directo ya que mejoran la calidad microbiológica sin afectar los parámetros de germinación (en las primeras dos semillas) e incluso pueden tener una mejora en la funcionalidad del producto sin ocasionar cambios sensoriales perceptibles por el consumidor.

8. Recomendaciones

Como se mostró, ambas tecnologías tienen potencial para ser aplicadas en la higienización de semillas para germinación sin que estas afecten la viabilidad de estas semillas ni el crecimiento del producto. Por lo que se recomienda la optimización de la aplicación de éstas. Una manera puede ser mediante su asistencia por flujos laminares en agua, que permitan la exposición de la semilla a los fotones por diversas caras de esta. Sin embargo, para la semilla de chía, se podría ahondar en el uso de sistemas neumáticos para lograr este efecto.

Otro enfoque es implementar, tanto los PLAI como la luz UVC en conjunto o como parte de un sistema de tecnología de barreras, a la par de otras tecnologías como altas presiones hidrostáticas, radiación infrarroja, ozono, entre otras.

Además, dado que se observó que la aplicación de estas tecnologías mejoró la actividad antioxidante en semillas de chía y germinados de trigo, se puede explorar su aplicación como herramienta de mejora nutricional de alimentos mínimamente procesados, específicamente de germinados y sus semillas. La aplicación de ciencias como la metabolómica y la proteómica para comprender cómo se afectan los parámetros de germinación y la actividad antioxidante por la aplicación de estas tecnologías, pueden ser herramientas útiles para describir los cambios a nivel metabólico producidos por estas tecnologías y los mecanismos por los cuales pueden mejorar los parámetros mencionados; obteniendo así información que permita optimizar los tratamientos aplicados.

9. Bibliografía

- Abdel-Aty, A. M., Elsayed, A. M., Salah, H. A., Bassuiny, R. I., & Mohamed, S. A. (2021). Egyptian chia seeds (*Salvia hispanica* L.) during germination: Upgrading of phenolic profile, antioxidant, antibacterial properties and relevant enzymes activities. *Food Science and Biotechnology*, *30*(5), 723-734. <https://doi.org/10.1007/s10068-021-00902-2>
- Abdel-Aty, A. M., Salama, W. H., El-Badry, M. O., Salah, H. A., Barakat, A. Z., Fahmy, A. S., & Mohamed, S. A. (2021). Purification and characterization of peroxidases from garden cress sprouts and their roles in lignification and removal of phenol and *p* - chlorophenol. *Journal of Food Biochemistry*, *45*(1). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13526>
- Abida, J., Rayees, B., & Masoodi, F. A. (2014). Pulsed light technology: A novel method for food preservation. *International Food Research Journal*, *21*(3), 839-848.
- Aborus, N. E., Šaponjac, V. T., Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., Hidalgo, A., Vulić, J., & Šeregelj, V. (2018). Sprouted and Freeze-Dried Wheat and Oat Seeds— Phytochemical Profile and *in Vitro* Biological Activities. *Chemistry & Biodiversity*, *15*(8), e1800119. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800119>
- Abuagela, M. O., Iqdiam, B. M., Baker, G. L., & MacIntosh, A. J. (2018). Temperature-Controlled Pulsed Light Treatment: Impact on Aflatoxin Level and Quality Parameters of Peanut Oil. *Food and Bioprocess Technology*, *11*(7), 1350-1358. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2105-6>
- Adhikari, A., Syamaladevi, R. M., Killinger, K., & Sablani, S. S. (2015). Ultraviolet-C light inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on organic fruit surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, *210*, 136-142. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.018>
- AHDB. (s. f.). *Seed-health tests: Germination, viability and vigour in cereals and oilseeds*. <https://ahdb.org.uk/knowledge-library/seed-health-tests-germination-viability-and-vigour-in-cereals-and-oilseeds>
- Alekseeva, T. V., Kalgina, Yu. O., Evlakova, V. S., & Malakova, L. A. (2017). Prospects for the use of alfalfa seeds in the production of special food products. *Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*, *79*(3), 93-96. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2017-3-93-96>
- Ali, A. S., & Elozeiri, A. A. (2017). Metabolic Processes During Seed Germination. En J. C. Jimenez-Lopez (Ed.), *Advances in Seed Biology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70653>
- Aloo, S. O., Ofosu, F. K., Kilonzi, S. M., Shabbir, U., & Oh, D. H. (2021). Edible Plant Sprouts: Health Benefits, Trends, and Opportunities for Novel Exploration. *Nutrients*, *13*(8), 2882. <https://doi.org/10.3390/nu13082882>

- Álvarez-Chávez, L. M., Valdivia-López, M. de los A., Aburto-Juárez, M. de L., & Tecante, A. (2008). Chemical Characterization of the Lipid Fraction of Mexican Chia Seed (*Salvia hispanica L.*). *International Journal of Food Properties*, *11*(3), 687-697. <https://doi.org/10.1080/10942910701622656>
- Amraie, E., Farsani, M. K., Sadeghi, L., Khan, T. N., Babadi, V. Y., & Adavi, Z. (2015). The effects of aqueous extract of alfalfa on blood glucose and lipids in alloxan-induced diabetic rats. *Interventional Medicine and Applied Science*, *7*(3), 124-128. <https://doi.org/10.1556/1646.7.2015.3.7>
- AOAC 966.23.C. (s. f.). *Método oficial para el recuento de microorganismos por el método de vertido en placa.*
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, *55*(1), 373-399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Aron Maftei, N., Ramos-Villaruel, A. Y., Nicolau, A. I., Martín-Belloso, O., & Soliva-Fortuny, R. (2014). Pulsed light inactivation of naturally occurring moulds on wheat grain: Pulsed light inactivation of naturally occurring moulds on wheat grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(4), 721-726. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6324>
- Barakat, A. Z., Hamed, A. R., Bassuiny, R. I., Abdel-Aty, A. M., & Mohamed, S. A. (2020). Date palm and saw palmetto seeds functional properties: Antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *14*(2), 1064-1072. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00356-5>
- Bari, M. L., Inatsu, Y., Isobe, S., & Kawamoto, S. (2008). Hot Water Treatments To Inactivate Escherichia coli O157:H7 and Salmonella in Mung Bean Seeds. *Journal of Food Protection*, *71*(4), 830-834. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.4.830>
- Bari, M. L., Nei, D., Enomoto, K., Todoriki, S., & Kawamoto, S. (2009a). Combination Treatments for Killing Escherichia coli O157:H7 on Alfalfa, Radish, Broccoli, and Mung Bean Seeds. *Journal of Food Protection*, *72*(3), 631-636. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.3.631>
- Bari, M. L., Nei, D., Enomoto, K., Todoriki, S., & Kawamoto, S. (2009b). Combination Treatments for Killing Escherichia coli O157:H7 on Alfalfa, Radish, Broccoli, and Mung Bean Seeds. *Journal of Food Protection*, *72*(3), 631-636. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.3.631>
- Bari, Md. L., Sugiyama, J., & Kawamoto, S. (2009). Repeated Quick Hot-and-Chilling Treatments for the Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in Mung Bean and Radish Seeds. *Foodborne Pathogens and Disease*, *6*(1), 137-143. <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0143>

- Bellostas, N., Kachlicki, P., Sørensen, J. C., & Sørensen, H. (2007). Glucosinolate profiling of seeds and sprouts of *B. oleracea* varieties used for food. *Scientia Horticulturae*, *114*(4), 234-242. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.06.015>
- Beltrán-Orozco, M. del C., Martínez-Olguín, A., & Robles-Ramírez, M. del C. (2020). Changes in the nutritional composition and antioxidant capacity of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) during germination process. *Food Science and Biotechnology*, *29*(6), 751-757. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00726-1>
- Berghofer, L. K., Hocking, A. D., Miskelly, D., & Jansson, E. (2003). Microbiology of wheat and flour milling in Australia. *International Journal of Food Microbiology*, *85*(1-2), 137-149. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00507-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00507-X)
- Bhavya, M. L., & Umesh Hebbar, H. (2017). Pulsed light processing of foods for microbial safety. *Food Quality and Safety*, *1*(3), 187-202. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx017>
- Bolton, D. J., O'Neill, C. J., & Fanning, S. (2012). A Preliminary Study of Salmonella, Verocytotoxigenic Escherichia coli/Escherichia coli O157 and Campylobacter on Four Mixed Farms: Salmonella, VTEC and Campylobacter on Farms. *Zoonoses and Public Health*, *59*(3), 217-228. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2011.01438.x>
- Buchanan, B. B., & Balmer, Y. (2005). REDOX REGULATION: A Broadening Horizon. *Annual Review of Plant Biology*, *56*(1), 187-220. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144246>
- Carter, B. P., Galloway, M. T., Morris, C. F., Weaver, G. L., & Carter, A. H. (2015). The Case for Water Activity as a Specification for Wheat Tempering and Flour Production. *Cereal Foods World*, *60*(4), 166-170. <https://doi.org/10.1094/CFW-60-4-0166>
- Chang, W.-C., Kuo, P.-L., Chen, C.-W., Wu, J. S.-B., & Shen, S.-C. (2015). Caffeic acid improves memory impairment and brain glucose metabolism via ameliorating cerebral insulin and leptin signaling pathways in high-fat diet-induced hyperinsulinemic rats. *Food Research International*, *77*, 24-33. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.010>
- Cheigh, C.-I., Park, M.-H., Chung, M.-S., Shin, J.-K., & Park, Y.-S. (2012). Comparison of intense pulsed light- and ultraviolet (UVC)-induced cell damage in *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *Food Control*, *25*(2), 654-659. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.032>
- Chon, S.-U., Choi, S.-K., Jung, S., Jang, H.-G., Pyo, B.-S., & Kim, S.-M. (2002). Effects of alfalfa leaf extracts and phenolic allelochemicals on early seedling growth and root morphology of alfalfa and barnyard grass. *Crop Protection*, *21*(10), 1077-1082. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00092-3](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00092-3)
- Collazo, C., Charles, F., Aguiló-Aguayo, I., Marín-Sáez, J., Lafarga, T., Abadias, M., & Viñas, I. (2019). Decontamination of *Listeria innocua* from fresh-cut broccoli using UV-C

- applied in water or peroxyacetic acid, and dry-pulsed light. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 52, 438-449. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.02.004>
- Coroller, L., Leguerinel, I., Mettler, E., Savy, N., & Mafart, P. (2006). General Model, Based on Two Mixed Weibull Distributions of Bacterial Resistance, for Describing Various Shapes of Inactivation Curves. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), 6493-6502. <https://doi.org/10.1128/AEM.00876-06>
- Cui, Y., Liu, B., Sun, X., Li, Z., Chen, Y., Guo, Z., Liu, H., Li, D., Wang, C., Zhu, X., & Shi, Y. (2020). Protective effects of alfalfa saponins on oxidative stress-induced apoptotic cells. *Food & Function*, 11(9), 8133-8140. <https://doi.org/10.1039/D0FO01797C>
- Dal Bosco, A., Castellini, C., Martino, M., Mattioli, S., Marconi, O., Sileoni, V., Ruggeri, S., Tei, F., & Benincasa, P. (2015). The effect of dietary alfalfa and flax sprouts on rabbit meat antioxidant content, lipid oxidation and fatty acid composition. *Meat Science*, 106, 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.03.021>
- Demirci, A., & Keklik, N. M. (2012). Process Design Involving Pulsed UV Light. En J. Ahmed & M. Shafiur Rahman (Eds.), *Handbook of Food Process Design* (1.^a ed., pp. 1166-1187). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781444398274.ch39>
- Di Gioia, F., Renna, M., & Santamaria, P. (2017). Sprouts, Microgreens and “Baby Leaf” Vegetables. En F. Yildiz & R. C. Wiley (Eds.), *Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables* (pp. 403-432). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7018-6_11
- Ding, H., Fu, T.-J., & Smith, M. A. (2013). Microbial Contamination in Sprouts: How Effective Is Seed Disinfection Treatment?: Seed disinfection for sprouts.... *Journal of Food Science*, 78(4), R495-R501. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12064>
- Donkor, O. N., Stojanovska, L., Ginn, P., Ashton, J., & Vasiljevic, T. (2012). Germinated grains – Sources of bioactive compounds. *Food Chemistry*, 135(3), 950-959. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.058>
- Eissa, H. A., Mohamed, S. S., & Hussein, A. M. S. (2020). Nutritional value and impact of wheatgrass juice (Green Blood Therapy) on increasing fertility in male albino rats. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s42269-020-0272-x>
- El-Maarouf-Bouteau, H., & Bailly, C. (2008). Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signaling & Behavior*, 3(3), 175-182. <https://doi.org/10.4161/psb.3.3.5539>
- Erdođdu, S. B., & Ekiz, H. İ. (2011). Effect of Ultraviolet and Far Infrared Radiation on Microbial Decontamination and Quality of Cumin Seeds. *Journal of Food Science*, 76(5), M284-M292. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02192.x>

- Erdođdu, S. B., & Ekiz, H. İ. (2013). Far infrared and ultraviolet radiation as a combined method for surface pasteurization of black pepper seeds. *Journal of Food Engineering*, *116*(2), 310-314. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.026>
- Fan, X., Thayer, D. W., & Sokorai, K. J. B. (2004). Changes in Growth and Antioxidant Status of Alfalfa Sprouts during Sprouting as Affected by Gamma Irradiation of Seeds†. *Journal of Food Protection*, *67*(3), 561-566. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.3.561>
- FAOSTAT. (2022). *Base de Datos sobre Alimentación y Agricultura*. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QI>
- Feng, G., Churey, J. J., & Worobo, R. W. (2007). Thermal Inactivation of Salmonella and Escherichia coli O157:H7 on Alfalfa Seeds. *Journal of Food Protection*, *70*(7), 1698-1703. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.7.1698>
- Fernández Molina, J. J., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. (2001). Tecnologías emergentes para la conservación de alimentos sin calor. *Arbor*, *168*(661), 155-170. <https://doi.org/10.3989/arbor.2001.i661.827>
- Fiala, J., & Pospíšil, D. (Eds.). (2012). *Alfalfa and clovers: Properties, medicinal uses and health benefits*. Nova Science Publishers.
- Fine, F., & Gervais, P. (2004). Efficiency of Pulsed UV Light for Microbial Decontamination of Food Powders. *Journal of Food Protection*, *67*(4), 787-792. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.4.787>
- Gandhi, M., & Matthews, K. R. (2003). Efficacy of chlorine and calcinated calcium treatment of alfalfa seeds and sprouts to eliminate Salmonella. *International Journal of Food Microbiology*, *87*(3), 301-306. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00108-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00108-9)
- Gayán, E., Condón, S., & Álvarez, I. (2014). Biological Aspects in Food Preservation by Ultraviolet Light: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, *7*(1), 1-20. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1168-7>
- Gill, C. J., Keene, W. E., Mohle-Boetani, J. C., Farrar, J. A., Waller, P. L., Hahn, C. G., & Cieslak, P. R. (2003). Alfalfa Seed Decontamination in *Salmonella* Outbreak. *Emerging Infectious Diseases*, *9*(4), 474-479. <https://doi.org/10.3201/eid0904.020519>
- Gómez-López, V. M., Ragaert, P., Debevere, J., & Devlieghere, F. (2007). Pulsed light for food decontamination: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *18*(9), 464-473. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.03.010>
- Halliwell, B. (2006). Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology*, *141*(2), 312-322. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>

- Han, A.-R., Hong, M. J., Nam, B., Kim, B.-R., Park, H. H., Baek, I., Kil, Y.-S., Nam, J.-W., Jin, C. H., & Kim, J.-B. (2020). Comparison of Flavonoid Profiles in Sprouts of Radiation Breeding Wheat Lines (*Triticum aestivum* L.). *Agronomy*, *10*(10), 1489. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101489>
- Han, I. (2021). Antioxidant, α -Glucosidase Inhibitory, and Anti-Inflammatory Activities and Cell Toxicity of Waxy and Normal Wheat Sprouts at Various Germination Time. *Applied Sciences*, *11*(16), 7755. <https://doi.org/10.3390/app11167755>
- Heinrich, V., Zunabovic, M., Varzakas, T., Bergmair, J., & Kneifel, W. (2016). Pulsed Light Treatment of Different Food Types with a Special Focus on Meat: A Critical Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*(4), 591-613. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.826174>
- Himathongkham, S., Nuanualsuwan, S., Riemann, H., & Cliver, D. O. (2001). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in Artificially Contaminated Alfalfa Seeds and Mung Beans by Fumigation with Ammonia. *Journal of Food Protection*, *64*(11), 1817-1819. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.11.1817>
- Hinds, L. M., Charoux, C. M. G., Akhter, M., O'Donnell, C. P., & Tiwari, B. K. (2020). Effectiveness of a novel UV light emitting diode based technology for the microbial inactivation of *Bacillus subtilis* in model food systems. *Food Control*, *114*, 106910. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106910>
- Hinds, L. M., O'Donnell, C. P., Akhter, M., & Tiwari, B. K. (2019). Principles and mechanisms of ultraviolet light emitting diode technology for food industry applications. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *56*, 102153. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.04.006>
- Hinojosa-DáValos, J., Arias-Rios, E. V., Varela-Hernández, J. J., Cardona-López, M. A., Orozco-Muñiz, R., & Cabrera-Diaz, E. (2020). Thermal and Chemical Treatments to Reduce *Salmonella* on Alfalfa (*Medicago sativa*) and Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) Seeds Before and During the Sprouting Process: A Hurdle Approach. *Journal of Food Protection*, *83*(1), 82-88. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-272>
- Hong, Y.-H., Wang, S., Hsu, C., Lin, B.-F., Kuo, Y.-H., & Huang, C. (2011). Phytoestrogenic Compounds in Alfalfa Sprout (*Medicago sativa*) beyond Coumestrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(1), 131-137. <https://doi.org/10.1021/jf102997p>
- Hu, H., Churey, J. J., & Worobo, R. W. (2004). Heat Treatments To Enhance the Safety of Mung Bean Seeds. *Journal of Food Protection*, *67*(6), 1257-1260. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.6.1257>
- Hwang, H.-J., Cheigh, C.-I., & Chung, M.-S. (2017). Construction of a pilot-scale continuous-flow intense pulsed light system and its efficacy in sterilizing sesame seeds.

Innovative Food Science & Emerging Technologies, 39, 1-6.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.10.017>

Hwang, H.-J., Seo, J.-H., Jeong, C., Cheigh, C.-I., & Chung, M.-S. (2019). Analysis of bacterial inactivation by intense pulsed light using a double-Weibull survival model. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 56, 102185.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102185>

Jeon, M.-J., & Ha, J.-W. (2018). Efficacy of UV-A, UV-B, and UV-C irradiation on inactivation of foodborne pathogens in different neutralizing buffer solutions. *LWT*, 98, 591-597. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.030>

Jin, X., Yang, R., Guo, L., Wang, X., Yan, X., & Gu, Z. (2017). ITRAQ analysis of low-phytate mung bean sprouts treated with sodium citrate, sodium acetate and sodium tartrate. *Food Chemistry*, 218, 285-293. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.029>

Jing, C. L., Dong, X. F., & Tong, J. M. (2015). Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Flavonoid Compounds and Antioxidants from Alfalfa Using Response Surface Method. *Molecules*, 20(9), 15550-15571.
<https://doi.org/10.3390/molecules200915550>

Keklik, N. M., Krishnamurthy, K., & Demirci, A. (2012). Microbial decontamination of food by ultraviolet (UV) and pulsed UV light. En *Microbial Decontamination in the Food Industry* (pp. 344-369). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857095756.2.344>

Ki, H.-H., Hwang, S.-W., Lee, J.-H., Kim, Y.-H., Kim, D.-K., & Lee, Y.-M. (2017). A dichloromethane fraction of *Triticum aestivum* sprouts reduces allergic immune response through inhibiting Th2 differentiation in ovalbumin-immunized mice. *Molecular Medicine Reports*, 16(3), 3535-3541. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7020>

Kim, D.-K., Jeong, S. C., Gorinstein, S., & Chon, S.-U. (2012). Total Polyphenols, Antioxidant and Antiproliferative Activities of Different Extracts in Mungbean Seeds and Sprouts. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(1), 71-75. <https://doi.org/10.1007/s11130-011-0273-x>

Kim, S. M., Hwang, H.-J., Cheigh, C.-I., & Chung, M.-S. (2019). Bactericidal effect of intense pulsed light on seeds without loss of viability. *Food Science and Biotechnology*, 28(1), 281-287. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0456-4>

Kim, W.-I., Choi, S. Y., Han, I., Cho, S. K., Lee, Y., Kim, S., Kang, B., Choi, O., & Kim, J. (2020). Inhibition of *Salmonella enterica* growth by competitive exclusion during early alfalfa sprout development using a seed-dwelling *Erwinia persicina* strain EUS78. *International Journal of Food Microbiology*, 312, 108374.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108374>

- Koh, P. C., Noranizan, M. A., Nur Hanani, Z. A., Rosli, S. Z., & Hambali, N. H. (2019). Enzymatic activity of alginate coated and pulsed light treated fresh-cut cantaloupes (*Cucumis melo* L. var. *Reticulatus* cv. Glamour) during chilled storage. *International Food Research Journal*, 26(2), 547-556.
- Kotan, R., Dadasoğlu, F., Karagoz, K., Cakir, A., Ozer, H., Kordali, S., Cakmakci, R., & Dikbas, N. (2013). Antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Satureja hortensis* against plant pathogenic bacteria and their potential use as seed disinfectants. *Scientia Horticulturae*, 153, 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.01.027>
- Koutchma, T. (2008). UV Light for Processing Foods. *Ozone: Science & Engineering*, 30(1), 93-98. <https://doi.org/10.1080/01919510701816346>
- Kramer, B., Wunderlich, J., & Muranyi, P. (2017a). Recent findings in pulsed light disinfection. *Journal of Applied Microbiology*, 122(4), 830-856. <https://doi.org/10.1111/jam.13389>
- Kramer, B., Wunderlich, J., & Muranyi, P. (2017b). Impact of treatment parameters on pulsed light inactivation of microorganisms on a food simulant surface. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 42, 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.05.011>
- Krishnamurthy, K., Demirci, A., & Irudayaraj, J. M. (2007). Inactivation of *Staphylococcus aureus* in Milk Using Flow-Through Pulsed UV-Light Treatment System. *Journal of Food Science*, 72(7), M233-M239. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00438.x>
- Kumar, M., Hora, R., Kostrzynska, M., Waites, W. M., & Warriner, K. (2006). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on Mung Beans, Alfalfa, and Other Seed Types Destined for Sprout Production by Using an Oxychloro-Based Sanitizer. *Journal of Food Protection*, 69(7), 1571-1578. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.7.1571>
- Lang, M. M., Ingham, B. H., & Ingham, S. C. (2000). Efficacy of novel organic acid and hypochlorite treatments for eliminating *Escherichia coli* O157:H7 from alfalfa seeds prior to sprouting. *International Journal of Food Microbiology*, 58(1-2), 73-82. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00297-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00297-X)
- Luksiene, Z., Gudelis, V., Buchovec, I., & Raudeliuniene, J. (2007). Advanced high-power pulsed light device to decontaminate food from pathogens: Effects on *Salmonella typhimurium* viability in vitro: In vitro decontamination of food using high-power pulsed light device. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1545-1552. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03403.x>
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., & Leguerinel, I. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods: Application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72(1-2), 107-113. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00624-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00624-9)

- Martínez-Cruz, O., & Paredes-López, O. (2014). Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) by ultra high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1346*, 43-48. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.007>
- Martínez-Villaluenga, C., Frías, J., Gulewicz, P., Gulewicz, K., & Vidal-Valverde, C. (2008). Food safety evaluation of broccoli and radish sprouts. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(5), 1635-1644. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.01.004>
- Mathias-Rettig, K., & Ah-Hen, K. (2014). El color en los alimentos un criterio de calidad medible. *Agro Sur*, *42*(2), 57-66. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2014.v42n2-07>
- Melaku, T. A. (2021). A Review to Nutritional and Health Aspect of Sprouted Food. *International Journal of Food Science*, *10*(7), 64-568.
- Milosevic, N., Tintor, B., Prótic, R., Cvijanovic, G., & Dimitrijevic, T. (2012). Effect of inoculation with *Azotobacter chroococcum* on wheat yield and seed quality. *Romanian Biotechnological Letters*, *17*(3), 7352-7357.
- Minocha, N., Sharma, N., & Pandey, P. (2022). Wheatgrass: An Epitome of Nutritional Value. *Current Nutrition & Food Science*, *18*(1), 22-30. <https://doi.org/10.2174/1573401317666210906140834>
- Montville, R., & Schaffner, D. W. (2004). Analysis of Published Sprout Seed Sanitization Studies Shows Treatments Are Highly Variable. *Journal of Food Protection*, *67*(4), 758-765. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.4.758>
- Nadtochii, L. A., Kuznetcova, D. V., Proskura, A. V., Apalko, A. D., Nazarova, V. V., & Srinivasan, M. (2019). *Investigation of various factors on the germination of chia seeds sprouts (Salvia hispanica L.)* [PDF]. 748.7Kb. <https://doi.org/10.15159/AR.19.128>
- O, H. B., Song, K. Y., Joung, K. Y., Shin, S. Y., & Kim, Y. S. (2018). Effects of Chia (*Salvia hispanica* L.) seed roasting conditions on quality of cookies. *Italian Journal of Food Science*, *31*(1). <https://doi.org/10.14674/IJFS-1198>
- Pao, S., Kalantari, A., & Khalid, M. F. (2008). ELIMINATING SALMONELLA ENTERICA IN ALFALFA AND MUNG BEAN SPROUTS BY ORGANIC ACID AND HOT WATER IMMERSIONS. *Journal of Food Processing and Preservation*, *32*(2), 335-342. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2008.00182.x>
- Pedros-Garrido, S., Condón-Abanto, S., Clemente, I., Beltrán, J. A., Lyng, J. G., Bolton, D., Brunton, N., & Whyte, P. (2018). Efficacy of ultraviolet light (UV-C) and pulsed light (PL) for the microbiological decontamination of raw salmon (*Salmo salar*) and food contact surface materials. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *50*, 124-131. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.10.001>

- Pehlivan, F. E. (2017). Free Radicals and Antioxidant System in Seed Biology. En J. C. Jimenez-Lopez (Ed.), *Advances in Seed Biology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70837>
- Peleg, M., & Cole, M. B. (1998). Reinterpretation of Microbial Survival Curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(5), 353-380. <https://doi.org/10.1080/10408699891274246>
- Peleg, M., & Corradini, M. G. (2011). Microbial Growth Curves: What the Models Tell Us and What They Cannot. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(10), 917-945. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.570463>
- Pérez-Rodríguez, F., & Valero, A. (2013). Predictive Models: Foundation, Types, and Development. En F. Perez-Rodriguez & A. Valero, *Predictive Microbiology in Foods* (pp. 25-55). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5520-2_3
- Porrás-Loaiza, P., Jiménez-Munguía, M. T., Sosa-Morales, M. E., Palou, E., & López-Malo, A. (2014). Physical properties, chemical characterization and fatty acid composition of Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(2), 571-577. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12339>
- Poudel, B., Nepali, S., Xin, M., Ki, H.-H., Kim, Y.-H., Kim, D.-K., & Lee, Y.-M. (2015). Flavonoids from *Triticum aestivum* inhibit adipogenesis in 3T3-L1 cells by upregulating the insig pathway. *Molecular Medicine Reports*, 12(2), 3139-3145. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3700>
- Punia, S., Sandhu, K. S., & Siroha, A. K. (2019). Difference in protein content of wheat (*Triticum aestivum* L.): Effect on functional, pasting, color and antioxidant properties. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 18(4), 378-384. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2017.12.005>
- Rajoria, A., Mehta, A., Mehta, P., Ahirwal, L., Shukla, S., & Bajpai, V. K. (2017). Evaluation of antiproliferative and hepatoprotective effects of wheat grass (*Triticum aestivum*). *Acta Biologica Hungarica*, 68(2), 150-161. <https://doi.org/10.1556/018.68.2017.2.3>
- Rashidi, M., Behnam, Z., & Gholami, M. (2009). Effect of Different Seeding Rates on Seed Yield and Some Seed Yield Components of Alfalfa (*Medicago sativa*). *Int. J. Agric. Biol*, 11(6), 779-782.
- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., & Valdivia-López, M. A. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107(2), 656-663. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.062>
- Reyes-Jurado, F., Navarro-Cruz, A. R., Méndez-Aguilar, J., Ochoa-Velasco, C. E., Mani-López, E., Jiménez-Munguía, M. T., Palou, E., López-Malo, A., & Ávila-Sosa, R. (2019).

High-Intensity Light Pulses To Inactivate Salmonella Typhimurium on Mexican Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds. *Journal of Food Protection*, 82(8), 1272-1277. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-577>

Roessler, E. R., Pangborn, R. M., & Amerine, M. A. (1965). *Principles of sensory evaluation of foods*. Academic Press.

Rowan, N. J. (2019). Pulsed light as an emerging technology to cause disruption for food and adjacent industries – Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology*, 88, 316-332. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.027>

Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990. <https://doi.org/10.1039/c3ay41125g>

Schoeman, L., & Manley, M. (2019). Oven and Forced Convection Continuous Tumble (FCCT) Roasting: Effect on Physicochemical, Structural and Functional Properties of Wheat Grain. *Food and Bioprocess Technology*, 12(1), 166-182. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2200-8>

Serment-Moreno, V. (2020). Microbial Modeling Needs for the Nonthermal Processing of Foods. *Food Engineering Reviews*. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09263-8>

Sharma, R. R., & Demirci, A. (2003). Inactivation of Escherichia coli O157:H7 on Inoculated Alfalfa Seeds with Pulsed Ultraviolet Light and Response Surface Modeling. *Journal of Food Science*, 68(4), 1448-1453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb09665.x>

Sharma, R. R., Demirci, A., Beuchat, L. R., & Fett, W. F. (2002). Inactivation of Escherichia coli O157:H7 on Inoculated Alfalfa Seeds with Ozonated Water and Heat Treatment. *Journal of Food Protection*, 65(3), 447-451. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.3.447>

Shen, Y., Zheng, L., Jin, J., Li, X., Fu, J., Wang, M., Guan, Y., & Song, X. (2018). Phytochemical and Biological Characteristics of Mexican Chia Seed Oil. *Molecules*, 23(12), 3219. <https://doi.org/10.3390/molecules23123219>

Shewry, P. R. (2009). Wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60(6), 1537-1553. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp058>

Shewry, P. R., & Hey, S. J. (2015). The contribution of wheat to human diet and health. *Food and Energy Security*, 4(3), 178-202. <https://doi.org/10.1002/fes3.64>

- Shomodder, A., Thammawong, M., & Nakano, K. (2022). Postharvest Technologies for Quality Maintenance of Sprouts. *Reviews in Agricultural Science*, 10(0), 239-256. https://doi.org/10.7831/ras.10.0_239
- SIAP. (2022). *Bases de datos de producción agrícola*. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>
- Singh, H., Bhardwaj, S. K., Khatri, M., Kim, K.-H., & Bhardwaj, N. (2021). UVC radiation for food safety: An emerging technology for the microbial disinfection of food products. *Chemical Engineering Journal*, 417, 128084. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.128084>
- Sinkinson, C. (2017). Triangle Test. En *Discrimination Testing in Sensory Science* (pp. 153-170). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101009-9.00007-1>
- Soylemez, G., Brashears, M. M., Smith, D. A., & Cuppett, S. L. (2001). Microbial Quality of Alfalfa Seeds and Sprouts after a Chlorine Treatment and Packaging Modifications. *Journal of Food Science*, 66(1), 153-157. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15598.x>
- Stewart, D. S., Reineke, K. F., Ulaszek, J. M., & Tortorello, M. L. (2001). Growth of Salmonella during Sprouting of Alfalfa Seeds Associated with Salmonellosis Outbreaks. *Journal of Food Protection*, 64(5), 618-622. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.5.618>
- Tamber, S., Swist, E., & Oudit, D. (2016). Physicochemical and Bacteriological Characteristics of Organic Sprouted Chia and Flax Seed Powders Implicated in a Foodborne Salmonellosis Outbreak. *Journal of Food Protection*, 79(5), 703-709. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-529>
- Thomas, J. L., Palumbo, M. S., Farrar, J. A., Farver, T. B., & Cliver, D. O. (2003). Industry Practices and Compliance with U.S. Food and Drug Administration Guidelines among California Sprout Firms. *Journal of Food Protection*, 66(7), 1253-1259. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.7.1253>
- Treadwell, D. D., Hochmuth, R., Landrum, L., & Laughlin, W. (2020). *Microgreens: A new specialty crop*. University of Florida, IFAS, EDIS publ. HS1164. <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/hs1164>
- Valdivia-López, Ma. Á., & Tecante, A. (2015). Chia (*Salvia hispanica*). En *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 75, pp. 53-75). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2015.06.002>
- Wade, W. N., Scouten, A. J., McWATTERS, K. H., Wick, R. L., Demirci, A., Fett, W. F., & Beuchat, L. R. (2003). Efficacy of Ozone in Killing *Listeria monocytogenes* on Alfalfa Seeds and Sprouts and Effects on Sensory Quality of Sprouts†. *Journal of Food Protection*, 66(1), 44-51. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.1.44>

Wang, B., Khir, R., Pan, Z., Wood, D., Mahoney, N. E., El-Mashad, H., Wu, B., Ma, H., & Liu, X. (2016). Simultaneous decontamination and drying of rough rice using combined pulsed light and holding treatment: Simultaneous decontamination and drying of rough rice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *96*(8), 2874-2881.

<https://doi.org/10.1002/jsfa.7458>

Weiss, A., Hertel, C., Grothe, S., Ha, D., & Hammes, W. P. (2007). Characterization of the cultivable microbiota of sprouts and their potential for application as protective cultures. *Systematic and Applied Microbiology*, *30*(6), 483-493.

<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2007.03.006>

Wekhof, A. (2000). Disinfection with flash lamps. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, *54*(3), 264-276.

Willis, C., Little, C. L., Sagoo, S., de Pinna, E., & Threlfall, J. (2009). Assessment of the microbiological safety of edible dried seeds from retail premises in the United Kingdom with a focus on *Salmonella* spp. *Food Microbiology*, *26*(8), 847-852.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.05.007>

Xiong, R., Xie, G., Edmondson, A. E., & Sheard, M. A. (1999). A mathematical model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology*, *46*(1), 45-55.

[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00172-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00172-X)

Yang, Y., Meier, F., Ann Lo, J., Yuan, W., Lee Pei Sze, V., Chung, H.-J., & Yuk, H.-G. (2013a). Overview of Recent Events in the Microbiological Safety of Sprouts and New Intervention Technologies: Sprout safety and control.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *12*(3), 265-280. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12010>

Yang, Y., Meier, F., Ann Lo, J., Yuan, W., Lee Pei Sze, V., Chung, H.-J., & Yuk, H.-G. (2013b). Overview of Recent Events in the Microbiological Safety of Sprouts and New Intervention Technologies: Sprout safety and control.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *12*(3), 265-280. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12010>

Yoshida, H., Hirakawa, Y., & Abe, S. (2001). Roasting influences on molecular species of triacylglycerols in sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.). *Food Research International*, *34*(7), 613-619. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00079-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00079-5)

Zagórska-Dziok, M., Ziemlewska, A., Nizioł-Łukaszewska, Z., & Bujak, T. (2020). Antioxidant Activity and Cytotoxicity of *Medicago sativa* L. Seeds and Herb Extract on Skin Cells. *BioResearch Open Access*, *9*(1), 229-242.

<https://doi.org/10.1089/biores.2020.0015>

Zecevic, V., Boskovic, J., Knezevic, D., & Micanovic, D. (2014). Effect of seeding rate on grain quality of winter wheat. *Chilean Journal of Agricultural Research*, *74*(1), 23-28.

<https://doi.org/10.4067/S0718-58392014000100004>

Zenklusen, M. H., Coronel, M. B., Castro, M. Á., Alzamora, S. M., & González, H. H. L. (2018). Inactivation of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus flavus* in malting barley by pulsed light and impact on germination capacity and microstructure. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *45*, 161-168. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.09.003>

Zhao, L., Li, M., Ma, X., Luo, D., Zhou, Q., Liu, W., & Liu, Z. (2022). Transcriptome analysis and identification of abscisic acid and gibberellin-related genes during seed development of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *BMC Genomics*, *23*(1), 651. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08875-0>

Zhou, Z., Fan, Z., Meenu, M., & Xu, B. (2021). Impact of Germination Time on Resveratrol, Phenolic Acids, and Antioxidant Capacities of Different Varieties of Peanut (*Arachis hypogaea* Linn.) from China. *Antioxidants*, *10*(11), 1714. <https://doi.org/10.3390/antiox10111714>

8. Anexos

ANEXO 1 FORMATOS DE EVALUACIÓN SENSORIAL PARA SEMILLAS

Tratadas por UVC

EVALUACIÓN SENSORIAL DE SEMILLAS PARA GERMINAR

^a	Atributo: color	Fecha:	
Nombre:		Sexo:	
Instrucciones: Observe con atención los grupos de muestras en orden alfabético (A, B, C). En cada grupo, una muestra es diferente. Seleccione la muestra diferente en COLOR y marque la casilla correspondiente.			
A.- ¿Cuál de las muestras de semillas de ALFALFA es diferente en color?			
265 <input type="checkbox"/>	168 <input type="checkbox"/>	243 <input type="checkbox"/>	
B.- ¿Cuál de las muestras de semillas de TRIGO es diferente en color?			
561 <input type="checkbox"/>	207 <input type="checkbox"/>	489 <input type="checkbox"/>	
C.- ¿Cuál de las muestras de semillas de CHÍA es diferente en color?			
504 <input type="checkbox"/>	818 <input type="checkbox"/>	640 <input type="checkbox"/>	

¡GRACIAS POR PARTICIPAR!

Tratadas por PLAI

EVALUACIÓN SENSORIAL DE SEMILLAS PARA GERMINAR

^b	Atributo: color	Fecha:	
Nombre:		Sexo:	
Instrucciones: Observe con atención los grupos de muestras y evalúe en orden alfabético (A, B, C). En cada grupo, una muestra es diferente. Seleccione la muestra diferente en COLOR y marque la casilla correspondiente.			
A.- ¿Cuál de las muestras de semillas de ALFALFA es diferente en color?			
880 <input type="checkbox"/>	243 <input type="checkbox"/>	168 <input type="checkbox"/>	
B.- ¿Cuál de las muestras de semillas de TRIGO es diferente en color?			
797 <input type="checkbox"/>	561 <input type="checkbox"/>	207 <input type="checkbox"/>	
C.- ¿Cuál de las muestras de semillas de CHÍA es diferente en color?			
635 <input type="checkbox"/>	818 <input type="checkbox"/>	504 <input type="checkbox"/>	

¡GRACIAS POR PARTICIPAR!

ANEXO 2 FORMATOS DE EVALUACIÓN SENSORIAL PARA GERMINADOS DE SEMILLAS

De germinados-UVC

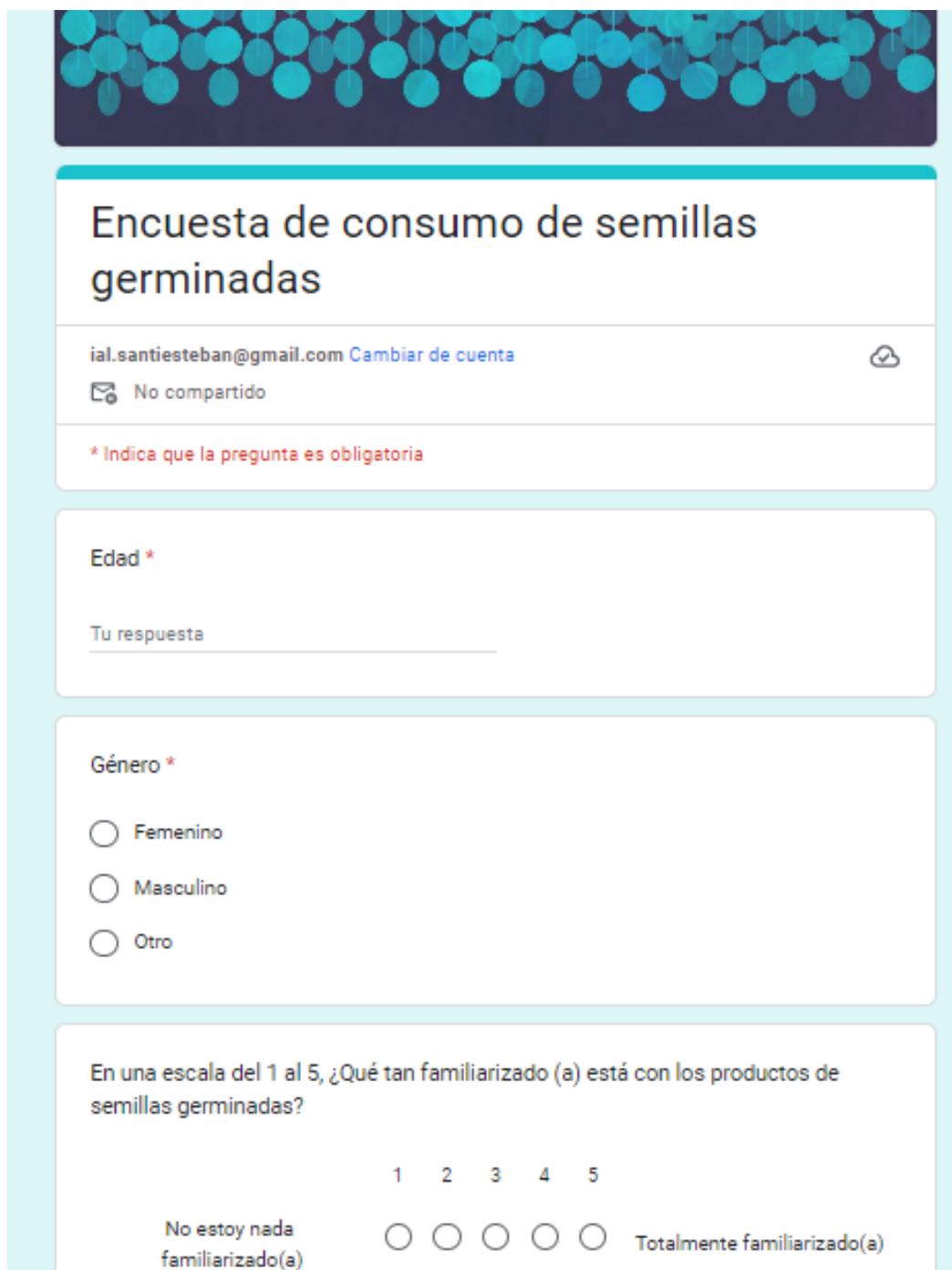
EVALUACIÓN SENSORIAL DE GERMINADOS			
a		Fecha:	
	Nombre:	Sexo:	
Instrucciones: Observe con atención los grupos de muestras en orden alfabético (A, B, C). En cada grupo, una muestra es diferente. Marque la casilla de la muestra diferente y escriba en qué atributo encontró la diferencia.			
A.- ¿Cuál de las siguientes muestras de alfalfa germinada es diferente? 168 <input type="checkbox"/> 904 <input type="checkbox"/> 412 <input type="checkbox"/>			
Atributo:			
B.- ¿Cuál de las siguientes muestras de trigo germinado es diferente? 287 <input type="checkbox"/> 711 <input type="checkbox"/> 835 <input type="checkbox"/>			
Atributo:			
C.- ¿Cuál de las siguientes muestras de chía germinada es diferente? 211 <input type="checkbox"/> 808 <input type="checkbox"/> 323 <input type="checkbox"/>			
Atributo:			
¡GRACIAS POR PARTICIPAR!			

De germinados-PLAI

EVALUACIÓN SENSORIAL DE GERMINADOS			
b		Fecha:	
	Nombre:	Sexo:	
Instrucciones: Observe con atención los grupos de muestras en orden alfabético (A, B, C). En cada grupo, una muestra es diferente. Marque la casilla de la muestra diferente y escriba en qué atributo encontró la diferencia.			
A.- ¿Cuál de las siguientes muestras de alfalfa germinada es diferente? 904 <input type="checkbox"/> 412 <input type="checkbox"/> 204 <input type="checkbox"/>			
Atributo:			
B.- ¿Cuál de las siguientes muestras de trigo germinado es diferente? 287 <input type="checkbox"/> 835 <input type="checkbox"/> 994 <input type="checkbox"/>			
Atributo:			
¡GRACIAS POR PARTICIPAR!			

ANEXO 3 FORMATO DE ENCUESTA PRE-EVALUACIÓN SENSORIAL

<https://forms.gle/L6BL8BNzND6YM8ch9>



The image shows a Google Form titled "Encuesta de consumo de semillas germinadas". The form is set to be shared via email with the address "ial.santiesteban@gmail.com" and is currently not shared. A red asterisk indicates that the following question is mandatory.

Encuesta de consumo de semillas germinadas

ial.santiesteban@gmail.com [Cambiar de cuenta](#)

 No compartido

* Indica que la pregunta es obligatoria

Edad *

Tu respuesta _____

Género *

Femenino

Masculino

Otro

En una escala del 1 al 5, ¿Qué tan familiarizado (a) está con los productos de semillas germinadas?

1 2 3 4 5

No estoy nada familiarizado(a) Totalmente familiarizado(a)

9. Evidencias de participación en congresos y publicaciones

Publicación en memorias del coloquio UDLAP 2021

Chapter

Weibull Modeling of Microorganisms' Survival Kinetics by High Intensity Light Pulses on Different Food Systems

Abril E. García-Santiesteban, Enrique Palou and María Teresa Jiménez-Munguía

Abstract

The practical application of any non-thermal technology (NTT) including high intensity light pulses (HILP) requires detailed basic studies on various microbial reduction effects and target microbial reduction parameters such as the inactivation rate (k), decimal reduction time (D) and temperature resistance coefficient (z). Particularly, for HILP technology such parameters have not yet been widely reported for different types of food, mostly because in NTT inactivation curves display non-linear concave shapes and do not follow first order kinetics. A simple alternative to the use of linear models is the Weibull distribution model. This work presents the Weibull modeling of the inactivation by HILP of *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua*, *Aspergillus niger*, and *Aspergillus flavus* in different food systems, previously reported by other authors. A D-value like parameter (D_0) is also calculated in aims to contribute to the industrial development of HILP technology. It was found that, in most cases, the Weibull distribution model represents a better alternative to linear inactivation models; and that it can give information related to the biological factors affecting the inactivation efficiency of HILP.

Keywords: HILP, microorganism inactivation, Weibull model, food safety

1. Introduction

One of the most important aspects to consider as part of quality in food processing is food safety. The ability to produce food free from pathogens is critical in the food processing industry [1, 2]. Different food technologies have been studied with the aim to inhibit or inactivate deteriorative microorganisms and pathogens. Thermal processing is highly effective and commonly used to eliminate or reduce pathogens; however it is not always suitable to use since it can induce chemical and physical changes leading to the degradation of nutritional content and organoleptic properties [2–4]. This has led researchers to investigate nonthermal technologies (NTT), or emerging technologies in food processing, such as High Intensity Light Pulses (HILP).

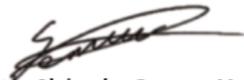
UDLAP[®]

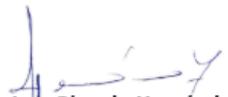
Universidad de las Américas Puebla

a través del Decanato y la Dirección de Investigación y Posgrado,
otorga la presente constancia a

Abril Estefanía García Santiesteban

por su participación en el
4º Coloquio Tecnología, Ciencia y
Cultura: una visión global


Dr. Martín Alejandro Serrano Meneses
Decano de Investigación y Posgrado


Dr. Luis Ricardo Hernández
Director de Investigación y Posgrado

Otorgado en la Ex hacienda Santa Catarina Mártir, San Andrés Cholula, Puebla, a los diecinueve días del mes de noviembre de dos mil veintiuno.

Presentación de Póster en AMIDIQ 2022

AMIDIQ

Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.



XLIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ
"La Ingeniería Química,
la Sostenibilidad y la Economía Circular"

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia
en Ingeniería Química A.C.

otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

Abril Estefanía García-Santiesteban, Enrique Palou, Aurelio López-Malo, Nelly Ramírez Corona, María Teresa Jiménez Munguía

Por la presentación del trabajo en modalidad cartel:

MODELOS MATEMÁTICOS PARA LA INACTIVACIÓN DE FLORA NATIVA DE SEMILLAS POR PULSOS DE LUZ DE ALTA INTENSIDAD

ID: 133

XLIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ
Puerto Vallarta, Jal., México. 23 al 26 de agosto de 2022



Dr. Jorge Ramón Robledo Ortiz
PRESIDENTE DE LA AMIDIQ Y DEL COMITÉ ORGANIZADOR



Dr. Tereza Mercedes García
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO

Presentación oral AMIDIQ 2023



AMIDIQ
Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.

XLIV
ENCUENTRO NACIONAL DE LA
AMIDIQ
Investigación e industria: inclusión, retos y oportunidades
para la Ingeniería Química en México

UDLAP

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia
en Ingeniería Química A.C.

otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

**Abril Estefanía García-Santiesteban, Enrique Palou, Nelly Ramírez Corona,
María Teresa Jiménez-Munguía.**

Por la presentación del trabajo:

APLICACIÓN DE LUZ UVC PARA LA INOCUIDAD DE SEMILLAS PARA GERMINADOS

En el área de **INGENIERÍA DE ALIMENTOS** en modalidad ORAL
ID: 309

XLIV Encuentro Nacional de la AMIDIQ

Dr. Ramón Reyes Hernández
Presidente del Comité Organizador

Dr. Jorge Ramón Rebledo Ortiz
Presidente Nacional de la AMIDIQ

Dr. Tomás Viveros García
Presidente del Comité Técnico

Huatuleo, Oaxaca, México 30 de mayo al 2 de junio de 2023

Artículo 1: “UVC light influence on the sanitization of alfalfa (*Medicago sativa*), wheat (*Triticum aestivum*) and chia (*Salvia hispanica*) seeds, sprout germination and antioxidant properties”

DOI:10.1016/j.postharvbio.2024.112958



UVC light influence on the sanitization of alfalfa (*Medicago sativa*), wheat (*Triticum aestivum*) and chia (*Salvia hispanica*) seeds, sprout germination and antioxidant properties

Abril Estefanía García-Santesteban, Nelly Ramírez-Corona, Aurelio López-Malo, Enrique Palou, María Teresa Jiménez-Munguía*

Universidad de las Américas Puebla, Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiente, Cholula, Puebla, México

ARTICLE INFO

Keywords:
Emerging technologies
Sprouts
Microgreens
Germination

ABSTRACT

This study evaluates UVC light as an alternative to improve the microbiological quality of seeds intended for sprouting. UVC treatments with light exposure times up to 120 and 180 min were tested to reduce native bacterial population (NEP) in alfalfa, wheat, and chia seeds. The effects of the UVC light treatments on germination yield and rate, growth kinetics and antioxidant activity of sprouts were also evaluated. Results demonstrated that reductions of NEP after 180 min of UVC light exposure were dependent on the type of seed and their physical characteristics. The Weibull model demonstrated good fitness to experimental data ($R^2 > 0.96$) for the concave upward inactivation kinetics ($n < 1$). Besides, the tested UVC light treatments did not affect the germination yield of the studied seeds and decreased the germination time to attain the commercial height of alfalfa and chia sprouts. The UVC light treatments applied on the studied seeds influenced positively the antioxidant properties when sprouting. The application of UVC light to alfalfa and wheat seeds destined for sprouting might be an alternative to improve their microbiological quality of seeds, without affecting their germination properties; while the nutritional benefits of its application, principally focused to enhance its antioxidant properties of sprouts can be considered for chia and alfalfa seeds.

1. Introduction

Germination has traditionally been used to process grains and seeds to improve their nutritional quality and reduce anti-nutritional factors (Fian, 2021). Germinated seed products are natural, highly valuable foods for their proven nutritional value, as they are abundant in vitamins, minerals, amino acids, fiber, flavonoids, and phenolic components (Hinojosa-Dávalos et al., 2020). They are also known for their health benefits, such as anticholesterolemic, antihypertensive, and antimutagenic properties, that have been confirmed in different studies (Jin et al., 2019). Therefore, seed germination products have been studied as a new approach of superfoods due to their high concentration of phytochemicals compared to commercial adult plants (Gallemi et al., 2020). This has led to increased demand and consumption of sprouts and microgreens over the past decade (Gallemi et al., 2020).

Sprouts and microgreens are two types of products from germinated seeds. Technically, sprouts are defined as the product obtained from germinating seeds and their development on water, constituted by the

first shoots and rootlets obtained from the germinating seeds, and are harvested when the cotyledons are under-developed (Bil, 2013; Le et al., 2020). Different from sprouts, microgreens are the germinated product with cotyledon leaves fully expanded and the first true leaves starting to grow in the plant (Le et al., 2020), including grasses such as wheatgrass (Han, 2021). Sprouts usually have shorter production periods, among 2-7 days, in comparison to microgreens and baby leaves which takes up to 7 and 21 days for the latter ones to be produced (Gallemi et al., 2020; Le et al., 2020). Commercially, the harvest period will depend on the maturity stage and characteristics such as size (Treadwell et al., 2020). For instance, alfalfa sprouts are usually commercialized when the sprout is 3.5-6 cm. On the other hand, germinated wheat can be commercialized as sprout when the radicle is at least 0.2 cm long, or as a microgreen when the grass has reached 5 cm; however, depending on the variety some leaves start to develop at 3 cm height and in such case, it can be considered a microgreen when reaching this height (Di Gioia et al., 2017).

It is very important to guarantee the safety of the product when

* Correspondence to: Ex Hacienda Santa Catarina Mártir 5/3, San Andrés Cholula, Puebla 72010, México.
E-mail address: marita.jimenez@uadap.mx (M.T. Jiménez-Munguía).

<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2024.112958>

Received 25 September 2023; Received in revised form 5 April 2024; Accepted 9 April 2024
0925-5214/© 2024 Published by Elsevier B.V.