

6 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Caracterización y formulación del sistema modelo

Para tratar un alimento con irradiación ultravioleta es necesario que éste sea líquido y traslucido; es decir que la luz UV sea capaz de atravesarlo. Es por eso que se formuló un sistema modelo pensando en un jugo clarificado. En el caso del ultrasonido su rango de aplicación pudiera ser más amplio, ya que no se necesita que este fluya ni que sea traslucido, se ha aplicado ultrasonido a purés, leche, yogurt, carne, chocolate, etc. Es por eso que se buscó elaborar un sistema modelo que cumpliera con requisitos necesarios para poder ser tratado en ambos tratamientos y que se asemejara a un alimento comercial.

El sistema modelo consistió en la elaboración de un sistema que simulara un jugo clarificado. Se partió de una solución madre o buffer de fosfato de potasio dibásico para mantener constantes las condiciones del sistema modelo como el pH a lo largo del tratamiento. Se trabajó con 2 sistemas modelo; en el primero con un buffer a un pH 3.5. Debido a que éste no tenía concentración de sólidos fue necesario la reformulación a un sistema que realmente simulara a un jugo clarificado, por lo tanto para el segundo sistema se partió del mismo buffer pero se agregó azúcar hasta alcanzar la concentración deseada de 15 °Brix y con ácido clorhídrico se acidificó hasta llegar a un pH 3.0 (Apéndice C). Se seleccionó este pH debido a que se buscaba tener otro factor de conservación que facilitara la inactivación del microorganismo en combinación con el tratamiento y en la bibliografía se reporta un rango de pH en jugos clarificados de naranja, manzana, uva de 3.0 a 3.5.

Se analizaron tres jugos de uva comerciales para poder determinar la concentración adecuada de los °Brix y pH (Tabla III).

Tabla III. °Brix y pH de tres jugos comerciales de uva

Jugo Comercial de uva	°Brix	pH
Comercial Mexicana®	14.4 ± 0.06	2.9 ± 0.06
Jumex®	14.1 ± 0.06	2.7 ± 0.00
Del Valle®	15.0 ± 0.12	2.7 ± 0.00

6.2 Ultrasonido

6.2.1 Caracterización del equipo de ultrasonido

La caracterización del equipo de ultrasonido se realizó mediante la selección de amplitud, temperatura y tiempo de tratamiento basados en estudios experimentales previos a la investigación (Guerrero et al., 2001). Es importante recalcar que el aparato utilizado facilita la elección ya que al ser un dispositivo automatizado no se requieren de cálculos específicos para su obtención, sólo resultados experimentales y estudio de su funcionamiento para su correcta elección de acuerdo al efecto a evaluar.

Conociendo que el efecto del tratamiento con ultrasonido se ve fuertemente influenciado por el volumen a utilizar, ya que el fenómeno de cavitación se restringe a la zona más cercana al transductor, el efecto depende del volumen y geometría del contenedor (Young, 1989). De tal forma, se seleccionó una punta de 25.4 mm actuando en un volumen de 300 ml con una amplitud de 96 y 108 micrones para provocar una mayor cavitación.

La temperatura seleccionada fue de 38 ± 2 °C debido a que el tratamiento de ultrasonido tiende a incrementar la temperatura a medida que transcurre el tiempo. En estudios anteriores (Atchley y Crum, 1988) se ha explicado que las fuerzas de tensión en

un líquido disminuyen al incrementar la temperatura, favoreciendo de tal manera el fenómeno de cavitación. Esta elección de temperatura permite mantenerla constante a lo largo del tratamiento con la ayuda de un baño.

También el volumen como la temperatura a la que se efectuó el tratamiento se seleccionaron de forma que fueran compatibles con el tratamiento combinado de ultravioleta de onda corta siendo otro de los principales objetivos de esta tesis.

6.2.2 Evaluación microbiológica del tratamiento con ultrasonido

Para evaluar la eficiencia germicida del tratamiento con ultrasonido se realizaron las pruebas para conocer la reducción microbiana que podría ejercer en *Escherichia coli* inoculada con un mínimo 10^6 UFC/ml en el sistema modelo expuesto al ultrasonido por 30 min.

Primero se trató en el sistema modelo con pH 3.5 a una amplitud al 80% (96 micrones). Manteniendo una temperatura constante de $38 \pm 2^\circ\text{C}$. En la Fig. 6 se muestra como va disminuyendo la población de microorganismos con respecto al tiempo de tratamiento.

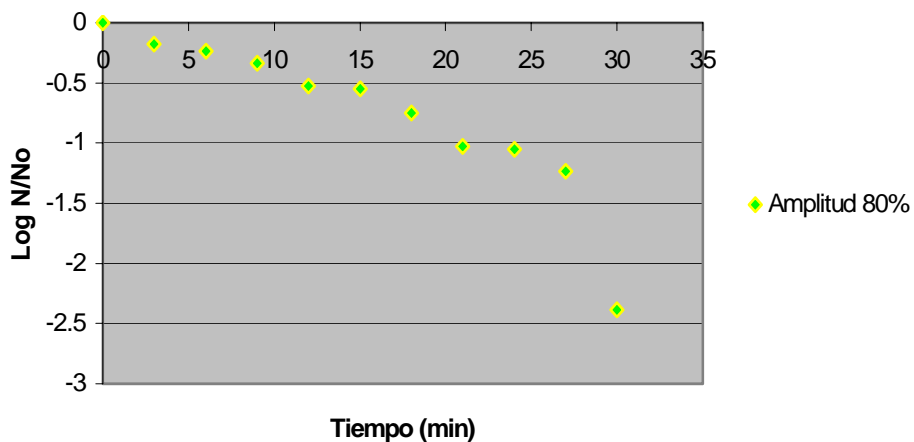


Figura 6. Inhibición microbiana de *Escherichia coli* en sistema modelo (pH 3.5) aplicando ultrasonido

Como se puede observar en la Fig. 6 se obtuvo la reducción de 2.5 ciclos logarítmicos de los microorganismos presentes, lo cual indica cierta resistencia de *E. coli* para tratamientos con ultrasonido bajo esas condiciones, ya que no se logro la reducción de mayor número de ciclos log en 30 min de tratamiento con una carga inicial del orden de 10^6 UFC/ml.

Posteriormente, se trató el sistema modelo con las modificaciones de pH 3.0 y 15 °Brix por 30 min con una carga inicial del orden de 10^7 UFC/ml a una amplitud al 90% (108 micrones), manteniendo la temperatura a $38 \pm 2^\circ\text{C}$ durante el tratamiento, como se muestra en la Fig. 7 .

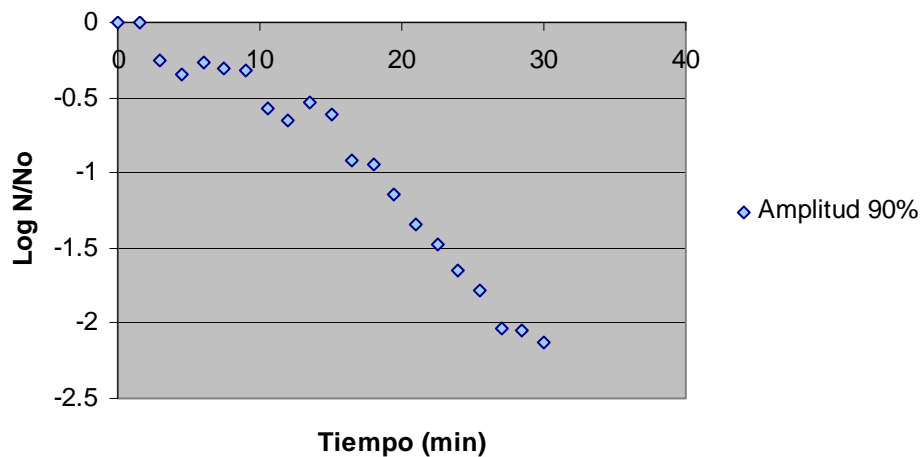


Figura 7. Inhibición microbiana de *Escherichia coli* en sistema modelo (pH 3.0 y 15°Brix) aplicando ultrasonido

Se puede observar que el cambio en pH y la utilización de una amplitud mayor no aumenta la muerte de microorganismos ya que se puede ver en la Fig. 7 que la reducción es similar a la que se presenta en la Fig. 6.

Con los resultados mostrados hasta el momento se puede concluir que las condiciones estudiadas de ultrasonido no son suficiente para destruir a *E. coli*. Se puede predecir que hay un cambio en la morfología del microorganismo por el efecto de la cavitación; de una forma de bacilo a un cambio a forma esférica, pero el efecto provocado no llega a hacer lo suficientemente intenso como para destruir a todos los microorganismos.

6.3 Ultravioleta

6.3.1 Caracterización del equipo de ultravioleta

La caracterización del equipo de irradiación con luz ultravioleta (UVC) se realizó mediante la medición de la altura y diámetro de la lámpara, calculando así el volumen que recibe la irradiación, el área de contacto y la distancia que hay entre la lámpara y el contenedor o espesor del líquido como se muestra en la tabla IV (Apéndice A).

Tabla IV. Parámetros del equipo de irradiación ultravioleta

Longitud de la lámpara	70 cm
Diámetro de la lámpara	1.496 cm
Volumen de líquido	140 cm ³
Área de contacto	328.988 cm ²
Espesor del líquido	0.346 cm

Se determinaron las distintas velocidades de flujo posibles con la bomba peristáltica utilizada para el equipo de UV mediante la cuantificación del tiempo para un determinado flujo volumétrico de agua circulando a través del equipo. Obteniéndose las diferentes velocidades que se muestran en la Tabla V.

Tabla V. Velocidades de flujo por medio de la bomba peristáltica

# _{en el control} de la bomba	Velocidad de flujo (ml/s)
1.0	*
1.5	*
2.0	3.0
2.5	4.0
3.0	6.4
3.5	8.3
4.0	10.3
4.5	12.0
5.5	15.1
6.0	16.3
6.5	18.2
7.0	19.5
7.5	21.1
8.0	22.7
8.5	24.4
9.0	25.9
9.5	27.8
10.0	29.9

* la velocidad de flujo no es constante.

Teniendo las diferentes velocidades de flujo alcanzables en dicha bomba se seleccionaron las velocidades de 5, 10 y 15 ml/s para llevar a cabo el tratamiento a velocidades que fueran constantes, controlar el burbujeo, fácil visualización del correcto funcionamiento del equipo y una diferencia importante entre cada una de ellas para poder efectuar las comparaciones necesarias.

Por lo que respecta al cálculo de la dosis de irradiación emitida por el equipo, se obtuvo a partir de un servicio ofrecido vía Internet por Bolton (2002) en donde se enviaron los datos solicitados y se recibieron los datos de la intensidad, con la intensidad y el cálculo de los tiempos de residencia a cada uno de los flujos utilizados se elaboró el cálculo de la dosis correspondiente. Los datos se muestran en la Tabla VI.

Tabla VI. Dosis e intensidad de la lámpara de irradiación ultravioleta

FLUJO ml/s	INTENSIDAD* $\mu\text{W}/\text{cm}^2$	TIEMPO DE RESIDENCIA s	DOSIS $\mu\text{J}/\text{cm}^2$
5	15.13	28	423.64
10	15.13	14	211.82
15	15.13	9.33	141.208

*Bolton (2002)

La temperatura seleccionada fue de 38 ± 2 °C debido a que el tratamiento con irradiación ultravioleta debe efectuarse con temperaturas cercanas a los 40°C; ya que es un factor determinante y de no ser así los niveles de UV fluctuarían con niveles de temperatura excesivamente bajos o altos. Esta elección de temperatura permite fácilmente mantenerla constante a lo largo del tratamiento con la ayuda de un baño.

6.3.2 Evaluación microbiológica del tratamiento con ultravioleta

Para evaluar la eficiencia germicida del tratamiento con irradiación ultravioleta se realizaron pruebas para conocer la reducción microbiana que podría ejercer en *Escherichia coli* inoculada con un mínimo 10^6 UFC/ml en el sistema modelo cuando fue expuesto por 15 min.

Primero se trató en el sistema modelo con pH 3.5 a una velocidad de flujo de 5 ml/s. Manteniendo una temperatura constante de $38 \pm 2^\circ\text{C}$. En las Fig. 8 y 9 se muestra como va disminuyendo la población de microorganismos con respecto al tiempo de tratamiento.

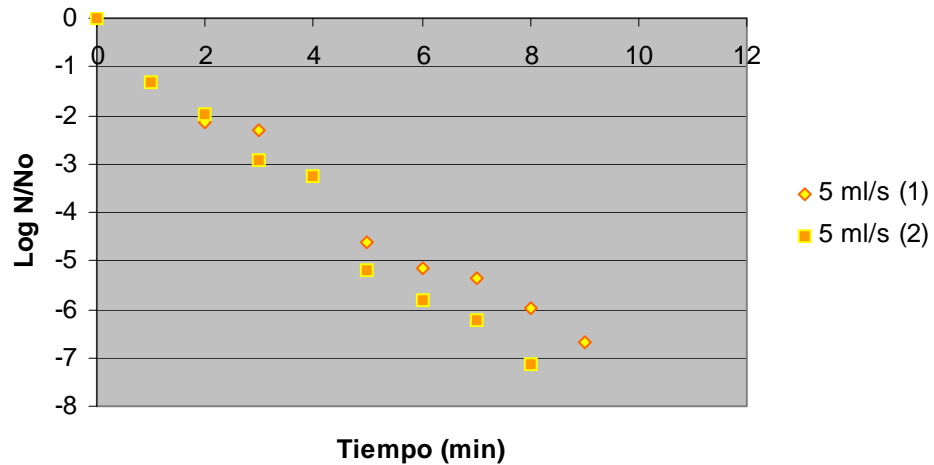


Figura 8. Inhibición microbiana de *Escherichia coli* en sistema modelo (pH 3.5)

Como se puede observar en la Fig. 8 se logró una reducción $> 99.9\%$ (7 ciclos logarítmicos) de los microorganismos presentes en el sistema modelo al tratarlo por 10 minutos con una carga inicial del orden de $10^6 - 10^7$ UFC/ml respectivamente, lo cual indica la eficiencia germicida del tratamiento con luz UVC.

Posteriormente se trató el sistema modelo con pH 3.0 y 15 °Brix por 15 min con una carga inicial del orden de 10^7 UFC/ml a diferentes velocidades de flujo (5, 10 y 15 ml/s), manteniendo el mismo intervalo de temperatura de $38 \pm 2^\circ\text{C}$ durante el tratamiento.(Fig. 9).

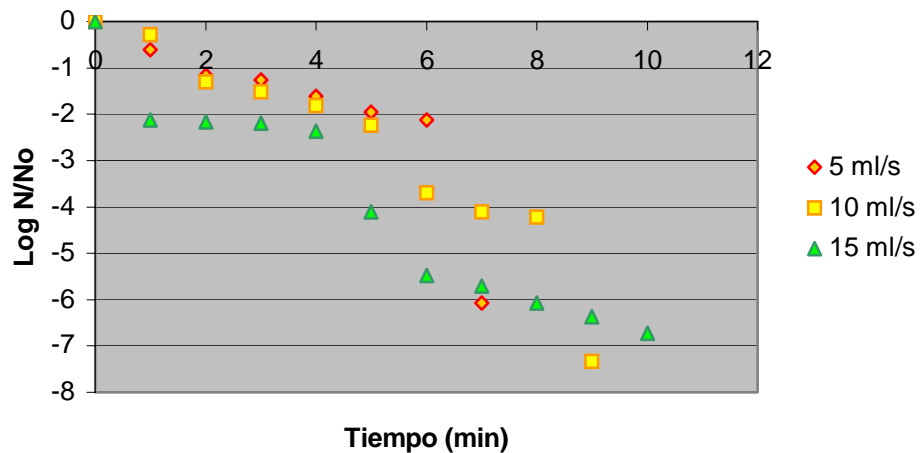


Figura 9. Inhibición microbiana de *Escherichia coli* en sistema modelo (pH 3.0 y 15 °Brix) sometido a tratamiento UVC a distintas velocidades de flujo

En la Fig. 9 se observa que con flujos de 5, 10 y 15 ml/s, se comprueba nuevamente la eficiencia germicida del UVC teniendo una reducción de 7 ciclos logarítmicos de los microorganismos iniciales en el sistema modelo al tratarlo 7 min con un flujo de 5 ml/s, 9 min con un flujo de 10 ml/s y 10 min con un flujo de 15 ml/s.

Como se observa (Fig. 9) a medida que el flujo incrementa, el tiempo de tratamiento para reducir todos los microorganismos inoculados inicialmente es mayor; esto se debe a que el flujo está relacionado con el tiempo de residencia en la lámpara. La dosis es el resultado de la intensidad de lámpara por el tiempo de residencia. A medida que el flujo disminuye, el tiempo de residencia es mayor así como la dosis y por lo tanto el efecto germicida es mejor.

La dosis necesaria para inactivar 5 ciclos logarítmicos de *E. coli* a los flujos utilizados de 5, 10 y 15 ml/s en sistema modelo (pH 3 y 15° Brix), se muestra a continuación en la tabla VII (Apéndice B).

Tabla VII. Dosis de irradiación UV (254 nm) para la reducción de 5-log de *Escherichia coli* en sistema modelo (pH 3 y 15°Brix)

Flujo ml/s	Dosis $\mu\text{J}/\text{cm}^2$
5	2118.2
10	1906.4
15	1694.5

Al comparar estos valores de dosis de inactivación (Tabla VII) con los datos reportados en la bibliografía se llegó a la conclusión de que la cepa utilizada de *E. coli* (ATCC 35218) presenta mayor sensibilidad a las cepas de *E. coli* que son reportadas en la bibliografía (López- Malo y Palou, 2002; Hoyer, 1998) debido a que se reportan datos de dosis de 50 a 100 J/m².

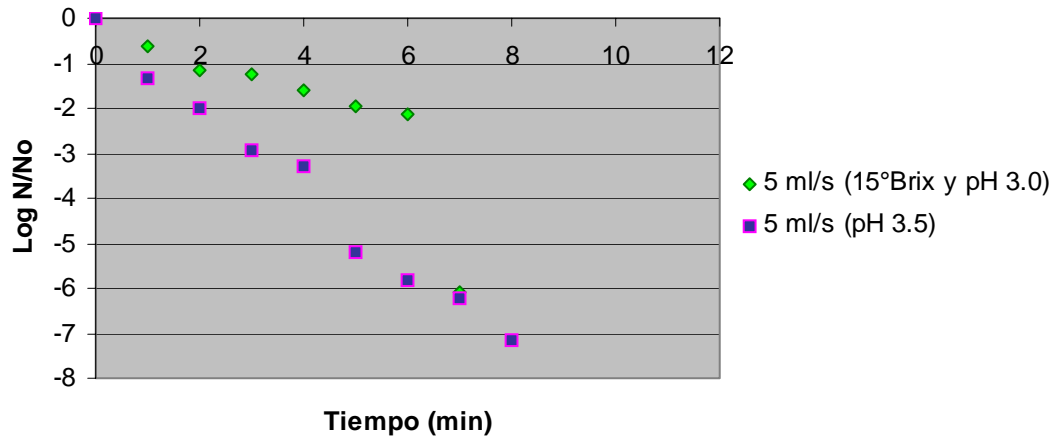


Figura 10. Inhibición microbiana de *Escherichia coli* en distintos sistemas modelo sometido a tratamiento UVC a velocidad de flujo de 5 ml/s

En la Fig. 10 se observa que a pesar de que el sistema modelo con 15°Brix y pH 3.0 en los primeros minutos de tratamiento presenta una mayor resistencia por el contenido de sólidos, se alcanzó la reducción de 6 ciclos logarítmicos en 7 min. El

sistema modelo con pH 3.5 en los primeros minutos hay una reducción de ciclos logarítmicos más rápida que en el otro sistema pero la reducción total se logró a los 8 min, lo cual es aceptable ya que se inició con 10^6 UFC/ml y 10^7 UFC/ml respectivamente. La diferencia en pH entre sistemas es lo que influye para disminuir el tiempo de reducción de microorganismos.

6.4 Evaluación microbiológica del tratamiento combinado de ultrasonido con luz UVC

Primero se evaluó el tratamiento en el sistema modelo pH 3.5 UVC a una velocidad de flujo de 5ml/s seguido de ultrasonido a una amplitud al 80% (96 micrones). Como se puede observar en la Fig. 11 se logró una reducción de 3.5 ciclos logarítmicos en 10 minutos de tratamiento, siendo la cuenta inicial del orden de 10^7 UFC/ml.

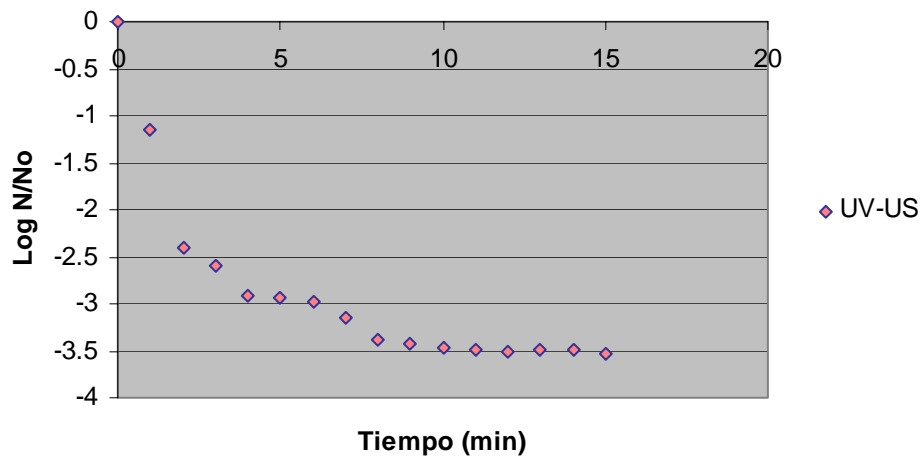


Figura 11. Inhibición microbiana de *Escherichia coli* en sistemas modelo pH 3.5 sometido a tratamiento UVC (flujo 5 ml/s) seguido por ultrasonido (amplitud 96 micrones)

En la Fig. 12 se pueden observar los distintos efectos de UVC, ultrasonido y el tratamiento combinado, obteniendo que el tratamiento combinado de UVC y ultrasonido es un punto intermedio de eficiencia germicida, es decir, en el tratamiento UVC se logró

la reducción de 7 ciclos logarítmicos de los microorganismo iniciales, en el ultrasonido la reducción de 2.5 ciclos logarítmicos y en el tratamiento combinado la reducción de 3.5 ciclos logarítmicos a sus respectivos tiempos de tratamiento: 15min para UVC, 30 min para US y 15 min para el combinado UV-US.

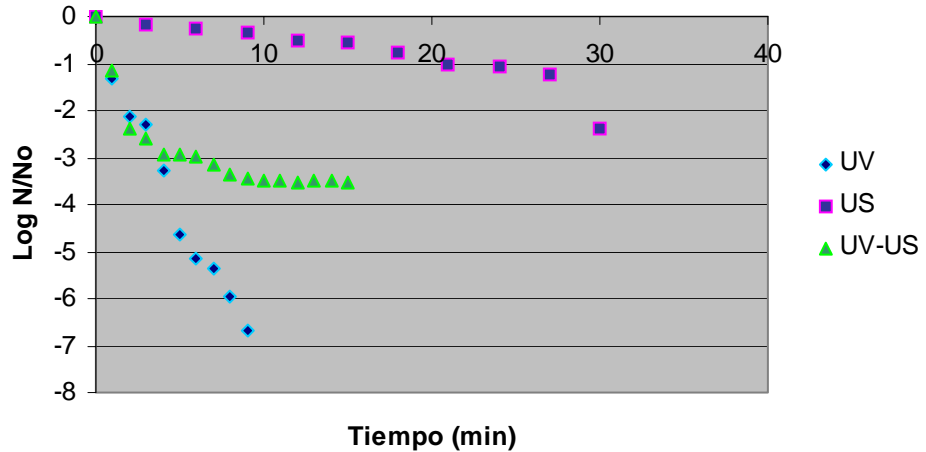


Figura 12. Inhibición microbiana de *Escherichia coli* en distintos tratamientos en sistema modelo pH 3.5

Se evaluó el tratamiento combinado en el sistema modelo pH 3.5 bajo las mismas condiciones de las Fig. 6 y 8 pero al mismo tiempo ambos tratamientos UVC e ultrasonido, (Fig. 13), obteniéndose una reducción de 6.5 ciclos logarítmicos en 10 min, siendo la cuenta inicial del orden de 10^6 UFC/ml.

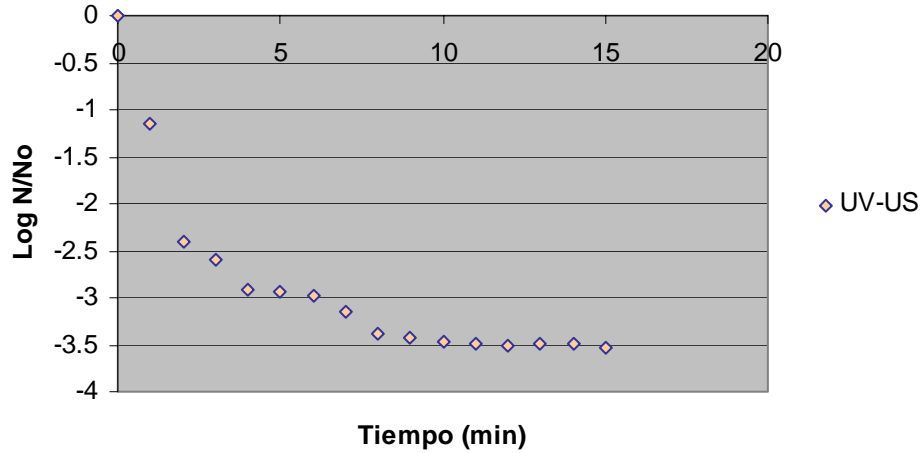


Figura 13. Inhibición microbiana de *Escherichia coli* en sistema modelo pH 3.5 en tratamiento combinado de UVC (flujo 5 ml/s) y ultrasonido (amplitud 96 micrones)

En las Figs. 14, 15 y 16 se evaluó el tratamiento combinado de ultrasonido a una amplitud de 90% (108 micrones) con UVC a velocidades de flujo de 5, 10 y 15 ml/s actuando al mismo tiempo en el sistema modelo pH 3.0 con 15°Brix. En la Fig. 14 se muestra el tratamiento por 15 min obteniendo una reducción de 2.7 ciclos logarítmicos, siendo la cuenta inicial del orden de 10^8 UFC/ml. En la Fig. 15 se muestra el tratamiento por 30 min y se puede observar la reducción de 3.5 ciclos logarítmicos, partiendo de una cuenta inicial del orden de 10^8 UFC/ml. En la Fig. 16 se muestra el tratamiento por 30 min obteniendo la reducción de 3.8 ciclos logarítmicos, siendo la cuenta inicial del orden de 10^6 UFC/ml.

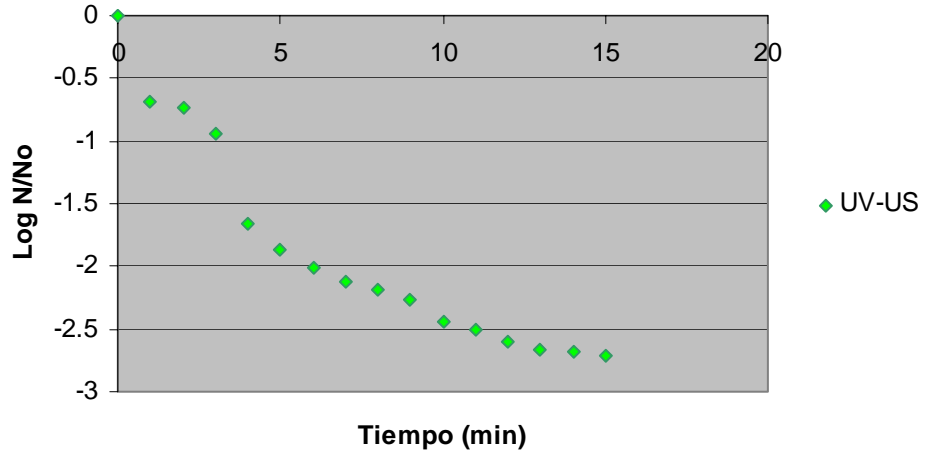


Figura 14. Inhibición microbiana de *Escherichia coli* en sistema modelo pH 3.0 y 15°Brix en tratamiento combinado de UVC (flujo 5 ml/s) y ultrasonido (amplitud 108 micrones)

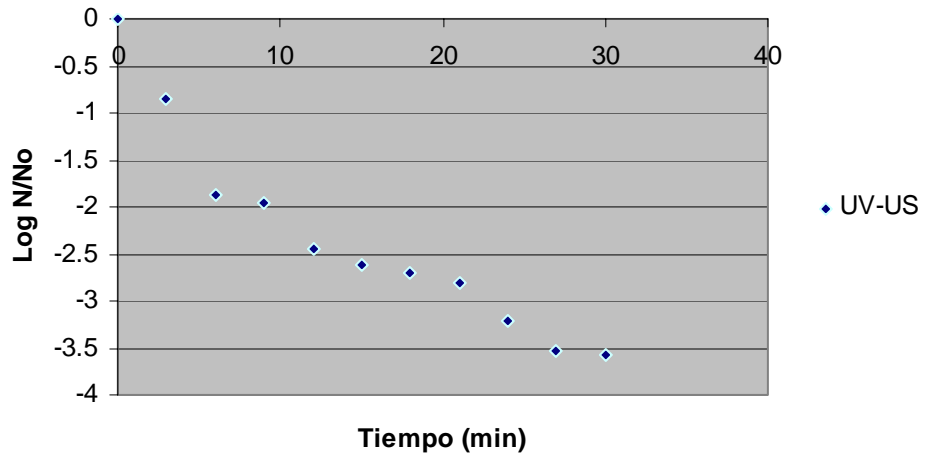


Figura 15. Inhibición microbiana de *Escherichia coli* en sistema modelo pH 3.0 y 15°Brix en tratamiento combinado de UVC (flujo 10 ml/s) y ultrasonido (amplitud 108 micrones)

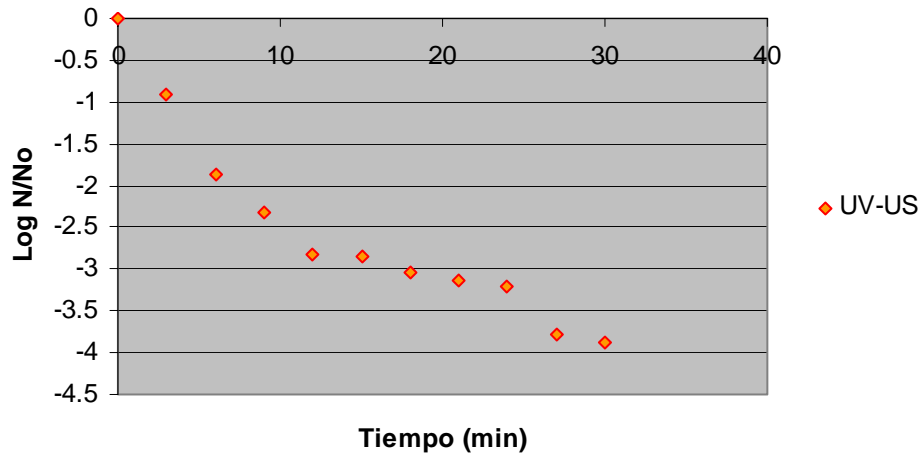


Figura 16. Inhibición microbiana de *Escherichia coli* en sistema modelo pH 3.0 y 15°Brix en tratamiento combinado de UVC (flujo 15 ml/s) y ultrasonido (amplitud 108 micrones)

Como se puede observar en la Fig. 17 los tratamientos representados individualmente en las Figs. 14, 15 y 16 muestran un comportamiento muy semejante, independientemente de la velocidad de flujo del sistema modelo utilizada en el tratamiento UVC.

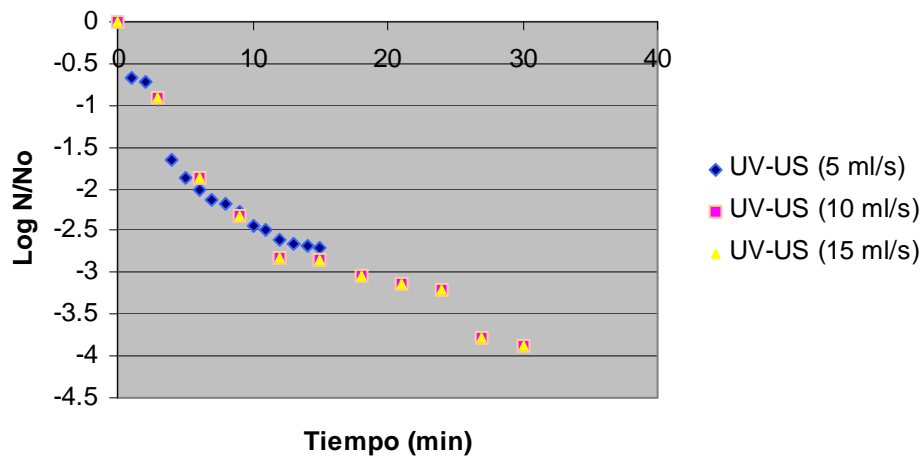


Figura 17. Inhibición microbiana de *Escherichia coli* en sistema modelo pH 3.0 y 15°Brix en tratamiento combinado de UVC (5, 10 y 15 ml/s) y ultrasonido (amplitud 108 micrones)

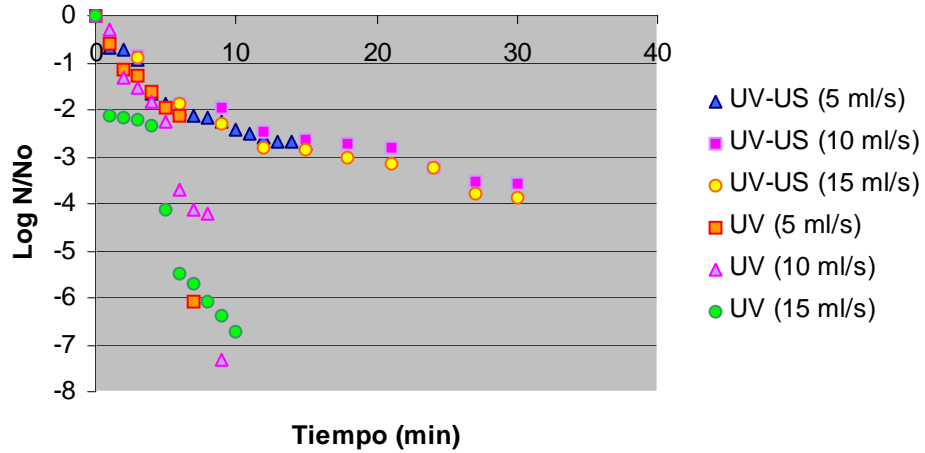


Figura 18. Inhibición microbiana de *Escherichia coli* en sistema modelo pH 3.0 y 15°Brix en tratamiento combinado de UVC (5, 10 y 15 ml/s) y tratamiento individual de ultrasonido (amplitud 108 micrones), y en tratamiento individual de UVC (5, 10 y 15 ml/s)

Se observa en la Fig. 18 que la *E. coli* en el tratamiento combinado genera cierta resistencia, ya que el tratamiento con irradiación UVC por si solo logró reducir hasta 6 ciclos logarítmicos de los microorganismos presentes.

La generación del fenómeno de cavitación en el ultrasonido genera burbujeo, el cual no es favorable para el UVC debido a que las burbujas generadas ocasionan un blindaje en el que un microorganismo puede pasar a través del esterilizador sin realmente tener la penetración UV directa ya que estas partículas lo cubren de la radiación por lo tanto dificultan que el rayo de luz UV dañe al microorganismo (Lupal, 1998).