



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**EFFECTO DE MÉTODOS COMBINADOS SOBRE LA INACTIVACIÓN
DE *ESCHERICHIA COLI* EN JUGO DE ZANAHORIA**

Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniera Agrónoma y al Grado de
Magíster en Ciencias Agropecuarias, Mención Producción Agroindustrial

LORENA ISABEL CISTERNAS ESTRADA

Director de Tesis

CIELO CHAR AUBRY

Profesores consejeros

MARCO SCHWARTZ MELGAR

HUGO NUÑEZ KALASIC

SANTIAGO – CHILE

2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS ESCUELA DE POSTGRADO

**EFFECTO DE MÉTODOS COMBINADOS SOBRE LA INACTIVACIÓN
DE *ESCHERICHIA COLI* EN JUGO DE ZANAHORIA**

**Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Título Profesional de
Ingeniera Agrónoma y al Grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias, Mención
Producción Agroindustrial**

LORENA ISABEL CISTERNAS ESTRADA

	Calificaciones (Memoria de Título)	Calificaciones (Tesis de Grado)
DIRECTOR DE TESIS/AFE		
Cielo Char Aubry Bioquímica, Dra.	6,5	Aprobado
PROFESORES CONSEJEROS		
Marco Schwartz Melgar Químico, M.S., Dr.	7,0	Aprobado
Hugo Nuñez Kalasic Ingeniero Agrónomo, Mg. Sc.	6,5	Aprobado

Santiago, Chile
2017

*Dedicada a mis padres
por su cariño y apoyo incondicional*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer mis padres Juan y Patricia, por brindarme la oportunidad de estudiar y por su apoyo incondicional durante todo este periodo. A mi hermana Gabriela, quien me ha dado siempre su cariño, ayuda y ánimos cuando lo he necesitado. A mis dos grandes amigas Magaly por siempre confiar en mí y a Andrea por ser mi compañera en mis años de estudio. También quiero agradecer a Vittorio por apoyarme en el final del proceso para seguir adelante y estar ahí alentándome a continuar creciendo como persona. A Brenda por ser aquel ser quien ha estado a mi lado cuando más lo que requerido dándome motivación, confianza y cariño.

A la Dra. Cielo Char, mi profesor guía, por su apoyo, colaboración, enseñanzas y por brindarme la oportunidad de participar en su proyecto, llegando a mí en el momento que más lo necesitaba. A doña Rosita por su colaboración y cariño en gran parte de la realización de esta tesis. A mis compañeros de laboratorio Francisco, por su compañía y ayuda, y Enrique por su ánimo y amistad.

Agradecimiento al financiamiento de CONICYT - FONDECYT de Iniciación N° 11121548.

ÍNDICE

Índice de contenido

Capítulo I: Monografía	1
Uso de métodos combinados para la preservación de alimentos	1
Métodos combinados	2
Tratamientos térmicos suaves	3
Acidificación	3
Antimicrobianos naturales	4
Carvacrol	6
Literatura citada	8
Capítulo II: Efecto de métodos combinados sobre la inactivación de <i>Escherichia coli</i> en jugo de zanahoria	12
Resumen	13
Abstract	14
Introducción	15
Hipótesis	17
Objetivos	17
Materiales y métodos	18
Ubicación del estudio	18
Material biológico	18
Tratamientos y diseño experimental	18
Etapa 1. Evaluación del efecto individual de cada tipo de tratamiento	18
Etapa 2. Evaluación del efecto combinado de los tratamientos	19
Etapa 3. Selección de los mejores tratamientos, evaluación sensorial, estabilidad física, química y microbiológica	20
Manejo del experimento	20
Preparación del inóculo	20
Preparación del jugo de zanahoria	20
Preparación de la emulsión de carvacrol	20
Aplicación de tratamientos	21
Tratamientos de acidificación	21
Tratamiento térmico suave	21
Tratamiento con carvacrol	22
Tratamientos combinados de acidificación, tratamiento térmico suave y carvacrol	22
Evaluación sensorial	22
Estudio de estabilidad física, química y microbiológica	23
Evaluaciones	23
Recuento de supervivientes	23
Recuento de Aerobios mesófilos totales	23
Recuento de Enterobacterias	23

Recuento de <i>E. coli</i>	23
Recuento de <i>Lactobacillus spp</i>	23
Recuento de Hongos y levaduras	24
Acidez titulable	24
Sólidos Solubles	24
Color	24
Análisis Estadístico	25
Resultados y discusión	26
Etapa 1: Evaluación del efecto individual de cada tipo de tratamiento	26
Tratamiento de acidificación	26
Tratamientos térmicos suaves	27
Tratamiento de adición de carvacrol emulsionado	28
Etapa 2. Evaluación del efecto combinado de los tratamientos en jugo de zanahoria inoculado con <i>Escherichia coli</i>	30
Aplicación del modelo de Weibull	33
Etapa 3. Selección de los mejores tratamientos, evaluación sensorial, estabilidad física, química y microbiológica.	39
Selección de los mejores tratamientos	39
Evaluación sensorial	40
Estudio de estabilidad microbiológica	41
Estudio de estabilidad química y física	44
Acidez titulable	44
Solidos Solubles	45
Color	46
Conclusiones	49
Literatura citada	50
Anexos	54

Índice de cuadros

Capítulo II: Efecto de métodos combinados sobre la inactivación de <i>Escherichia coli</i> en jugo de zanahoria	12
Materiales y métodos	18
Cuadro 1. Tratamientos aplicados en la Etapa 1	18
Cuadro 2. Tratamientos combinados que se aplicaron en la Etapa 2	19
Cuadro 3. Tratamientos seleccionados para evaluar la evolución en el almacenamiento refrigerado.	20
Resultados y discusión	26
Cuadro 4. Parámetros del modelo de Weibull que describen la inactivación de <i>E. coli</i> , inoculado en jugo de zanahoria sometido a tratamientos combinados agrupados según la intensidad del tratamiento térmico	34
Cuadro 5. Parámetros asociados a la aplicación del Modelo de Weibull	38
Cuadro 6. Tratamientos combinados seleccionados para evaluación sensorial, estabilidad física, química y microbiológica	40
Cuadro 7. Resultados de acidez titulable de jugos de zanahoria en almacenamiento a 4°C.	44

Cuadro 8. Resultados de sólidos solubles (°Brix) de jugos de zanahoria en almacenamiento a 4°C.	45
Anexos	
Cuadro 9. Norma para zumos, néctares, bebidas a base de frutas y verduras no pasteurizados.	56
Cuadro 10. Datos experimentales de curvas de supervivencia de <i>Escherichia coli</i> inoculada en jugos de zanahoria sometidos a un tratamiento de acidificación	57
Cuadro 11. Datos experimentales de curvas de supervivencia de <i>Escherichia coli</i> inoculada en jugos de zanahoria sometidos a tratamientos térmicos suaves	57
Cuadro 12. Datos experimentales de curvas de supervivencia de <i>Escherichia coli</i> inoculada en jugos de zanahoria sometidos a tratamientos con carvacrol emulsionado	57
Cuadro 13. Datos experimentales de curvas de supervivencia de <i>Escherichia coli</i> inoculada en jugos de zanahoria sometidos a tratamientos combinados a una temperatura de 56°C	58
Cuadro 14. Datos experimentales de curvas de supervivencia de <i>Escherichia coli</i> inoculada en jugos de zanahoria sometidos a tratamientos combinados a una temperatura de 58°C	58
Cuadro 15. Datos experimentales de curvas de supervivencia de <i>Escherichia coli</i> inoculada en jugos de zanahoria sometidos a tratamientos combinados a una temperatura de 60°C	59
Cuadro 16. Evaluación sensorial de los atributos del jugo de zanahoria sometidos a los tratamientos combinados seleccionados	60
Cuadro 17. Resultados de recuentos microbiológicos de aerobios mesófilos (RAM) en jugos almacenados a 4°C	61
Cuadro 18. Resultados de recuentos microbiológicos de enterobacterias en jugos almacenados a 4°C	61
Cuadro 19. Resultados de recuentos microbiológicos de <i>Lactobacillus sp</i> , en jugos almacenados a 4°C	61
Cuadro 20. Resultados de recuentos microbiológicos de hongos y bacterias en jugos almacenados a 4°C	62
Cuadro 21. Resultados de la evaluación de los parámetros de color en espacio CIE L*a*b* y CIE L*C*h* para el jugo de zanahoria control, sometida a T7 y a T14	63

Índice de figuras

Capítulo I: Monografía	1
Uso de métodos combinados para la preservación de alimentos	1
Figura 1. Mecanismos de acción de aceites esenciales	6
Capítulo II: Efecto de métodos combinados sobre la inactivación de <i>Escherichia coli</i> en jugo de zanahoria	12

Materiales y métodos	18
Figura 2. Preparación de emulsión de carvacrol	21
Resultados y discusión	26
Figura 3. Curvas de supervivencia de <i>E. coli</i> ATCC 35.218 según el efecto de acidificación en jugo de zanahoria inoculado	26
Figura 4. Curvas de supervivencia de <i>E. coli</i> según el efecto de tratamientos térmicos suaves en jugo de zanahoria inoculado	28
Figura 5. Curvas de supervivencia de <i>E. coli</i> según el efecto carvacrol emulsionado (CA-E), en jugo de zanahoria inoculado	29
Figura 6. Curvas de supervivencia de <i>E. coli</i> ATCC 35.218 inoculado en jugo de zanahoria según el efecto de la aplicación de los tratamientos combinados	30
Figura 7. Ajuste del modelo de Weibull a los datos experimentales de <i>E. coli</i> ATCC 35.218 ante la aplicación de los tratamientos combinados	35
Figura 8. Distribuciones de frecuencias de resistencias de <i>E. coli</i> inoculado en jugos de zanahoria sometidos a los tratamientos combinados	37
Figura 9. Evaluación de los atributos sensoriales de los jugos de zanahoria, sometidos a los tratamientos seleccionados T7 y T14	40
Figura 10. Recuento de Aerobio Mesófilos (RAM), durante la evaluación de estabilidad microbiológica de jugos de zanahoria almacenados a 4°C	42
Figura 11. Recuento de Enterobacterias, durante la evaluación de estabilidad microbiológica de jugos de zanahoria almacenados a 4°C	42
Figura 12. Recuento de <i>Lactobacillus sp</i> , durante la evaluación de estabilidad microbiológica de jugos de zanahoria almacenados a 4°C	43
Figura 13. Recuento de Hongos y Levaduras, durante la evaluación de estabilidad microbiológica de jugos de zanahoria almacenados a 4°C	43
Figura 14. Resultados de parámetros de color en jugos de zanahoria sometidos a T7, T14 y jugo sin tratar (control), almacenados a 4°C por 21 días.	46

Índice de anexos

Anexo I: Modelado de las curvas de supervivientes de Weibull	54
Anexo II: Pauta para Análisis Sensorial	55
Anexo III: Norma para zumos, néctares, bebidas a base de frutas y verduras no pasteurizados.	56
Anexo IV: Datos experimentales de curvas de supervivencia de los tratamientos térmicos suaves, adición de carvacrol emulsionado y acidificación en forma individual	57
Anexo V: Datos experimentales de curvas de supervivencia de los tratamientos Combinados	58
Anexo VI: Evaluación sensorial por el método descriptivo-cuantitativo	60
Anexo VII: Datos experimentales del estudio de estabilidad microbiológica de los jugos de zanahoria sometido a los tratamientos seleccionados y a un control de jugo sin tratar	61
Anexo VIII: Datos experimentales de la evaluación de los parámetros de color	63

CAPÍTULO I: MONOGRAFIA

Uso de métodos combinados para la preservación de alimentos

Hoy en día los consumidores tienen mayor conocimiento de la importancia de integrar frutas y hortalizas frescas a la dieta de manera que ésta sea saludable, dado que se conoce el gran aporte nutricional y los beneficios para la salud tales como la prevención de enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, etc. El gran problema de las frutas y hortalizas frescas es que tienen un rápido deterioro causado principalmente por enzimas y microorganismos. Las bacterias se consideran como la mayor causa del deterioro de alimentos frescos, seguido por hongos, virus, residuos de pesticidas y micotoxinas (Fallik, 2014).

La mayoría de los microorganismos inicialmente presentes en los alimentos provienen del suelo, del agua de riego o del aire. La gran parte de estos organismos son benignos, tanto para la planta como para el consumidor. Una pequeña porción de las bacterias y hongos presentes en los alimentos son capaces de causar deterioro de la calidad o enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Estos microorganismos pueden ser introducidos en la cosecha, en el manejo postcosecha, durante el almacenamiento o distribución (Barth *et al.* 2009).

Muchas frutas y hortalizas presentan las condiciones ideales para la sobrevivencia y desarrollo de microorganismos. El tejido interno es rico en nutrientes, como celulosa, hemicelulosa, pectina y almidón, siendo este último el principal polímero atacado por los microorganismos. Los microorganismos explotan al hospedero mediante el uso de enzimas líticas extracelulares que degradan los polímeros para liberar agua y otros componentes intracelulares, los cuales utilizan como nutrientes para su crecimiento (Miedes y Lorences, 2004).

Según la U.S Food and Drug Administration (FDA, 2012), los alimentos se clasifican como: ácidos, acidificados y de baja acidez. Los alimentos ácidos son aquellos que tienen un pH natural de 4,6 o menor; los acidificados son los alimentos con pH natural alto a los cuales se les ha añadido algún ácido para disminuir el pH; y los de baja acidez son los cuales tienen un pH mayor a 4,6. Tal clasificación surge debido a que las esporas de la bacteria *Clostridium botulinum* no son capaces de germinar en un medio de pH menor a 4,8. Los microorganismos son sensibles al pH, por lo tanto los alimentos ácidos en general dificultan el crecimiento microbiano; sin embargo, para los alimentos de baja acidez se debe tener especial atención y cuidado para poder mantener la inocuidad en el tiempo (McGlynn, 2004).

El procesamiento térmico es el método mundialmente más utilizado para la preservación y extensión de vida útil de los alimentos. El grado de destrucción de los microorganismos y enzimas depende de la temperatura y del tiempo de exposición a ésta, como también del nivel de resistencia de los microorganismos o enzimas. Sin embargo, estas temperaturas

elevadas no solo destruyen lo antes mencionado, sino que también aceleran reacciones químicas que producen cambios en la textura, sabor, apariencia, color, digestibilidad y valor nutricional de los alimentos (Tingting *et al.*, 2013; Martínez - Flores *et al.*, 2015). Dentro de estos cambios algunos son deseables y otros no, lo cual se denomina daño térmico” (Berk, 2013). Considerando estos antecedentes se hace necesaria la búsqueda de nuevas tecnologías de procesamiento de alimentos que aseguren tanto la calidad microbiológica, así como también la calidad organoléptica de los productos vegetales.

Métodos combinados

El concepto de métodos combinados o de barrera es una tecnología efectiva utilizada en muchos países para la preservación de alimentos. Este método responde a la exigencia actual de los consumidores que eligen los alimentos mínimamente procesados (Mukhopadhyay y Gorris, 2014). El procesamiento mínimo de alimentos es una técnica moderna de preservación que tiene como objetivo asegurar la inocuidad de los alimentos, reteniendo sus propiedades naturales (Ross *et al.*, 2003).

La tecnología de métodos combinados se centra en la aplicación de la combinación de dos o más obstáculos o barreras, que sean eficaces en la inhibición de los microorganismos, en niveles óptimos, con el objetivo de alcanzar la máxima letalidad generando un ambiente hostil para los microorganismos, deteniendo el crecimiento, acortando su sobrevivencia o incluso provocándoles la muerte. La combinación produce un efecto sinérgico o al menos aditivo lo cual permite reducir la intensidad de los tratamientos, por lo que se logra mantener los parámetros sensoriales y nutricionales de los alimentos (Leistner, 2000). El hecho de usar la combinación correcta garantiza la inocuidad microbiológica, estabilidad y calidad de los alimentos (Mukhopadhyay y Gorris, 2014). Se considera que el efecto combinado de tratamientos produce tres tipos de respuestas en los microorganismos: alteración de la homeostasis interna, agotamiento del metabolismo (gasto de energía) y reacciones de estrés (Leistner, 2000; Shalini y Singh, 2014).

Los principales obstáculos que se han incorporado para la preservación de alimentos son temperatura (alta o baja), baja actividad de agua (a_w), alta acidez (pH), potencial redox, preservantes naturales o sintéticos y microorganismos competidores (Leistner, 2000). Dependiendo del tipo de patógeno y su virulencia, se ajusta la intensidad de cada barrera con la finalidad de que no comprometa la calidad del producto (Mukhopadhyay y Gorris, 2014).

Para una aplicación eficiente de estos métodos es necesario el conocimiento del efecto de las barreras/obstáculos que se aplicarán (Ross *et al.*, 2003). Algunos ejemplos del uso de este método incluyen el trabajo de Matin y Maris (2012), quienes encontraron sinergismo al combinar H_2O_2 con ácido cítrico para el control de *Salmonella* sp en albúminas de bovinos, junto con otros ácidos orgánicos; Bekele y Ramaswamy (2014), evaluaron el efecto combinado de la aplicación de altas presiones, reducción de pH y tratamiento térmico a temperaturas moderadas para la inactivación de esporas de *Bacillus licheniformis* en jugo de zanahoria, reflejando un efecto sinérgico de los diferentes obstáculos a los que fue sometida la bacteria. La aplicación combinada de pulsos eléctricos y ultrasonido en jugo de

uva fue eficaz para el control de microorganismos y a la vez no alteró parámetros de calidad como °Brix, pH, color y viscosidad (Aadil *et al.*, 2014). Alonzo (2015) estudió la combinación de diferentes factores sobre la inactivación de *E. coli* O157:H7, en jugo de manzana y naranja, concluyendo una mayor eficacia al combinar ultrasonido con luz ultravioleta, como así también ultrasonido junto con antimicrobianos naturales. Otro ejemplo de uso de tratamientos combinados es la combinación de tratamientos térmicos a bajas temperaturas con la adicción de los aceites esenciales de canela y clavo a cidra de manzana encontrando una reducción de hasta 5 ciclos logarítmicos de *Escherichia coli* O157:H7 (Tajkarimi *et al.*, 2010).

Tratamientos térmicos suaves

Dado que en los últimos años la demanda de los consumidores apunta a los alimentos mínimamente procesados y saludables, con el objetivo de mantener las características nutricionales, sabor y aroma de los productos vegetales, se han explorado tratamientos alternativos a los tratamientos térmicos convencionales, ya que estos dañan la calidad nutricional y organoléptica de los alimentos.

Tratamientos térmicos suaves (50, 55 y 60°C por 10, 20 y 30 min), combinados con luz ultravioleta (5,61; 7,55 y 11,23 mJ·cm⁻²) demostraron ser capaces de inactivar ciertas enzimas, como también disminuir el crecimiento microbiano en jugo de piña (Sew *et al.*, 2014). También se publicó que la combinación de tratamientos térmicos suaves (57 a 61°C) combinados con los antimicrobianos naturales vainillina (500 a 1500 ppm) y citral (25 a 75 ppm) aplicados a jugo de naranja, fueron efectivos en la inactivación del crecimiento de *Listeria innocua* y *L. monocytogenes*, como así también resultó una buena alternativa para minimizar los efectos indeseados de los tratamientos térmicos (Char *et al.*, 2010).

Acidificación

Los ácidos orgánicos son reconocidos como sustancias seguras (GRAS) para ser usadas como desinfectantes y preservantes en alimentos frescos debido a su efecto antimicrobiano (Fallik, 2014). La acidificación del citoplasma microbiano es más efectiva con ácidos orgánicos que con inorgánicos, ya que son capaces de atravesar con mayor facilidad la membrana citoplasmática (Ross *et al.*, 2003). Algunos ácidos orgánicos cuya efectividad contra microorganismos ha sido estudiada son los ácidos ascórbico, cítrico, láctico, málico, propiónico y tartárico (Yucel y Karapinar, 2004).

Los ácidos orgánicos se potencian como agentes antimicrobianos mientras menor sea el pH. Al agregar un ácido difícilmente se puede llegar a matar bacterias u hongos, pero sí prevenir su crecimiento. Después de una larga fase de latencia de días o semanas, el crecimiento es pobre. El mecanismo de acción de los ácidos orgánicos implica la difusión de moléculas no disociadas de ácido a través de la membrana plasmática al citoplasma de las células, en donde se disocian en iones cargados. Estos iones no son capaces de retornar por la membrana, por lo cual se concentran los protones en el citoplasma disminuyendo el pH intracelular. Esta acidificación impide el crecimiento de los microorganismos al inhibir

la glicólisis, prevenir el transporte activo o interferir con la señal de transducción (Lambert y Stratford, 1999). Esta situación afecta los procesos bioquímicos de las bacterias ya sean Gram positivas o negativas (Timmermans *et al.*, 2014). Este efecto se debe al estrés que genera el cambio de pH en el citoplasma, junto con una menor funcionalidad de la membrana. Akbas y Olmez (2007) comprobaron la actividad antimicrobiana del ácido láctico, málico, cítrico, acético y ascórbico, todos al 1%, frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *L. monocytogenes* en lechuga.

La incorporación de ácidos orgánicos tiene diferentes beneficios, dependiendo del tipo de ácido que se utilice, como aportar sabores agradables o actuar como antioxidante, como en el caso del ácido cítrico (Badui, 2006). También una reducción de pH tiene como consecuencia un descenso en la actividad de las enzimas. Por ejemplo, la enzima pectinmetilesterasa, responsable de la clarificación en jugos cítricos, es capaz de reducir su actividad a pH 3,9, quedando totalmente inactivada a pH 3,1 (Navarro *et al.*, 2014).

Si se combinan otros procesos con la acidificación, se puede provocar una gran inactivación de bacterias y esporas, ya que la acidificación por sí sola no es suficiente para asegurar la inocuidad de los alimentos. En este sentido, Tola y Ramaswamy, (2014) reportaron que, al reducir el pH en jugo de zanahoria junto con un tratamiento térmico, se obtuvieron valores de D un 18% menores a pH de 4,5 que a pH 6,2, para una misma temperatura de tratamiento.

Antimicrobianos naturales

En los últimos años la industria alimentaria ha enfocado gran parte de sus estudios a encontrar sustancias naturales que sean capaces de inhibir el crecimiento de hongos y bacterias en alimentos, con el objetivo de mejorar la calidad y la vida útil de los mismos. Por otra parte, hoy en día existe una mayor conciencia de los consumidores en relación a la seguridad de los conservantes artificiales utilizados en los alimentos, atribuida en parte a la gran disponibilidad y accesibilidad a la información a nivel mundial. Como consecuencia de este escenario, es que se ha incrementado la demanda por productos naturales que puedan servir de alternativa a los conservantes químicos tradicionalmente utilizados en alimentos (Gyawali e Ibrahim, 2014; Tajkarimi *et al.*, 2010).

Los antimicrobianos naturales son aquellas sustancias que son capaces de inhibir el crecimiento y desarrollo de microorganismos, obtenidas de diversas fuentes naturales como plantas, animales, bacterias, algas u hongos (Gyawali e Ibrahim, 2014). Estos compuestos son capaces de extender la vida útil de los alimentos. El uso de los antimicrobianos naturales como conservantes ha permitido a la industria de alimentos disminuir el uso excesivo de compuestos artificiales utilizados para asegurar la inocuidad alimentaria (Juneja *et al.*, 2012). El interés en estos compuestos de origen natural se ha incrementado debido a que se encuentran disponibles en la naturaleza, no son tóxicos, tienen pocos efectos secundarios; también son biodegradables y tienen un potencial uso como tratamiento de descontaminación (Gutiérrez *et al.*, 2009; Kamimura *et al.*, 2014).

Los antimicrobianos de origen vegetal son aceites esenciales o sus componentes activos. Estos se definen como productos formados por varios compuestos aromáticos y volátiles,

obtenidos de diferentes estructuras vegetales, ya sea de las flores, brotes, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutas y raíces de diversas plantas (Zuzarte y Salgueiro, 2015). Representan una fracción muy pequeña de la composición de la planta, alrededor de menos de un 5% de la materia seca (El Asbahani *et al.*, 2015). Corresponden a una mezcla de varios componentes, alrededor de 20 a 60 en diferentes concentraciones (Bakkali *et al.*, 2008; Tajkarimi *et al.*, 2010; Zuzarte y Salgueiro, 2015). Algunos estudios concluyen que la actividad antimicrobiana es mayor, cuanto mayor sea el número de componentes mezclados. En general, en la naturaleza cumplen un rol de la defensa de las plantas y en el proceso de señalización, por ejemplo, están involucrados en la defensa contra microorganismos, insectos y herbívoros, como también atrayendo insectos polinizadores y cumplen un rol en la dispersión del fruto por animales, como también en la regulación del agua y en las interacciones alelopáticas (Burt, 2004). Tienen una naturaleza hidrofóbica, son inmiscibles en agua y su densidad a menudo es menor que el agua. Generalmente son lipofílicos y solubles en solventes orgánicos, inestables y frágiles ya que son compuestos volátiles, por lo cual se pueden degradar con facilidad ya sea por oxidación, volatilización, calor o luz si es que no se protegen adecuadamente de los factores externos (El Asbahani *et al.*, 2015).

Se han encontrado compuestos antimicrobianos en orégano, trébol, canela, ajo, cilantro, romero, perejil, salvia, entre otros. Los aceites esenciales de las hierbas y especias en general se utilizan en un rango de 0,05 a 0,1% (500 – 1000 ppm) en alimentos, dependiendo la concentración y de que tan fuerte sea la actividad antimicrobiana del principio activo. El orégano y tomillo han tenido el mayor efecto en contra de *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*. Los compuestos fenólicos eugenol, timol o carvacrol son los principales responsables del efecto bactericida (Burt, 2004; Tajkarimi *et al.*, 2010). Según la U.S. Food and Drug Administration (2012), se reconoce a los aceites esenciales como sustancias seguras e inocuas para ser añadidas a los alimentos (Bakkali *et al.*, 2008). Se pueden obtener por varios métodos como fermentación, maceración, o extracción, pero el método de destilación al vapor es el más utilizado para la producción comercial (Burt, 2004). Algunos otros métodos incluyen la extracción con solventes, fluidos supercríticos, hidrodestilación, destilación en seco o mediante un procedimiento mecánico (Zuzarte y Salgueiro, 2015).

Considerando que hay una gran cantidad de grupos de compuestos químicos en los aceites esenciales, no se puede atribuir su propiedad antimicrobiana a un solo mecanismo de acción. Principalmente los compuestos responsables de la acción antimicrobiana de los aceites esenciales son los compuestos fenólicos (Burt, 2004). Se ha demostrado que los aceites esenciales son capaces de actuar causando daño estructural y funcional a la membrana de las bacterias (Tajkarimi *et al.*, 2010). Uno de los mecanismos es la toxicidad causada en el citoplasma microbiano, dado que pasan a través de la membrana citoplasmática, dañando la estructura y las diferentes capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos. Este daño en la membrana hace que se produzca la lisis de la célula (Bakkali *et al.*, 2008). Estas sustancias afectan a las células de los microorganismos también comprometiendo el material genético y formando hidroperóxidos causados por la oxigenación de los ácidos grasos insaturados (Tajkarimi *et al.*, 2010).

Generalmente la susceptibilidad de las bacterias a los aceites esenciales, se incrementa con

el descenso del pH en los alimentos, junto con la temperatura de almacenamiento y la cantidad de oxígeno en el envase. En escenarios de bajo pH la hidrofobicidad de los aceites esenciales aumenta, por lo cual es más fácil disolver los lípidos en la membrana de las bacterias (Burt, 2004). Se ha visto que las bacterias Gram- negativas son más resistentes a los antimicrobianos derivados de plantas en comparación con las bacterias Gram-positivas (Tajkarimi *et al.*, 2010). Esto se explicaría debido a que la membrana externa de lipopolisacáridos que poseen estas bacterias, restringe la difusión de compuestos hidrofóbicos (Burt, 2004).

Carvacrol. El carvacrol es un monoterpeno fenólico que se encuentra en aceite esenciales de especies pertenecientes a la familia *Lamiaceae*, incluyendo a los géneros *Origanum* y *Thymus* (Gibara *et al.*, 2015). Es un compuesto fenólico que se ha usado por varios años como conservante de alimentos, ya que se ha demostrado que tiene un efecto inhibitorio contra bacterias, hongos y levaduras, mejorando la vida útil de los alimentos perecibles (Guarda *et al.*, 2011; Kamimura *et al.*, 2014). Es un aditivo “GRAS” (generalmente reconocido como seguro), usado como saborizante en productos horneados, bebidas y goma de mascar, entre otros alimentos (Kiskó y Roller, 2005). Exhibe una gran actividad antimicrobiana y antioxidante. Belda-Galbis *et al.*, (2014), señalan que una concentración de 0,15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ es capaz de retardar el crecimiento microbiano y disminuir la velocidad máxima de crecimiento de una población microbiana en el tiempo, en un alimento. Además, aparte de la actividad antimicrobiana, se han investigado sus propiedades como insecticida, antioxidante, antimutagénico y antiparasitario (Ramos *et al.*, 2016). El carvacrol ha sido evaluado en el desarrollo de envases con acción antimicrobiana, el cuál fue incorporado en materiales de polímeros sintéticos y fue liberado lentamente en la superficie de los alimentos comprobándose su efecto antimicrobiano (Guarda *et al.*, 2011).

Los mecanismos de acción de los aceites esenciales son varios (Figura 1). La actividad antimicrobiana del carvacrol está dada en gran parte por tener un grupo $-\text{OH}$, ya que es capaz de promover la deslocalización de electrones que a su vez actúan como intercambiadores de protones, reduciendo el gradiente a través de la membrana citoplasmática de las bacterias, lo que causa el colapso de la fuerza protón motriz y el agotamiento del ATP y en última instancia la muerte del microorganismo (Gyawali y Ibrahim, 2014). Este compuesto es capaz de desintegrar la membrana de bacterias Gram – negativas, liberando liposacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana

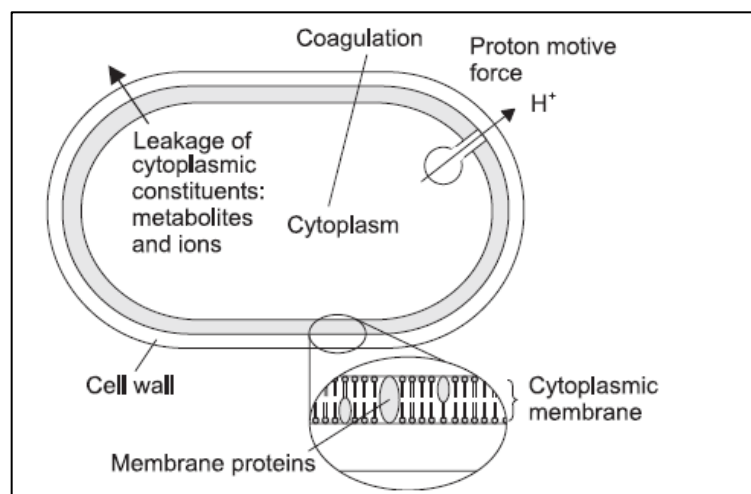


Figura 1. Mecanismos de acción de los aceites esenciales: degradación de la pared celular, daño en la membrana citoplasmática, daño en las proteínas de membrana, liberación del contenido celular y agotamiento de la fuerza motriz de protones (Burt, 2004).

citoplasmática. También inhibe la producción de toxinas de algunos microorganismos como *B. cereus*, ya que al dañar la membrana citoplasmática disminuye el ATP haciéndolo insuficiente para exportar las toxinas fuera de las células. Por otro lado, también se cree que como la célula intenta sobrevivir a la acción del carvacrol no destina energía para la producción de toxinas (Burt, 2004).

La utilización de algunos aceites esenciales, incluido el carvacrol como aditivo en dosis inadecuadas en alimentos produce cambios no deseados como afectar las propiedades organolépticas del alimento, principalmente por su fuerte aroma y sabor. También es insoluble en agua, debido a su naturaleza lipofílica, por lo que puede tener bajo contacto con los patógenos en alimentos con alto contenido de agua; además, se oxida, descompone o evapora fácilmente cuando se expone al aire, luz o calor. Por lo tanto, es necesario emplear tecnologías de encapsulación como medida de protección, mejorando su estabilidad y en ciertos sistemas, también su actividad antimicrobiana (El Asbahani *et al.*, 2015).

Las técnicas de encapsulación han sido ampliamente utilizadas en las últimas décadas en la industria de alimentos dado que los agentes encapsulantes son capaces de proteger a los compuestos de la humedad, calor o condiciones extremas junto con mejorar su estabilidad y solubilidad (Kamimura *et al.*, 2014). Se ha observado que la encapsulación puede llegar a aumentar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales (El Asbahani *et al.*, 2015). La eficacia de la encapsulación está dada por la mejora de la biodisponibilidad, al incrementar la solubilidad o disolución a través de la incorporación de compuestos solubles en agua dentro de las cavidades hidrofóbicas del agente encapsulante, haciendo al compuesto más efectivo a menores dosis (Kamimura *et al.*, 2014). La aplicación de los aceites esenciales en forma de emulsiones, en finas gotas, en alimentos con base acuosa, mejora la liberación de los compuestos antimicrobianos debido a que de esa forma son capaces de penetrar con mayor facilidad en la matriz y tener un efecto superior contra los microorganismos (Landry *et al.*, 2014). El uso de carvacrol encapsulado con β -cyclodextrina, un almidón modificado, ha demostrado una buena estabilidad y mejora en la actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. Este agente encapsulante atrapa los compuestos insolubles en agua dentro de su cavidad hidrofóbica incrementando la permeabilidad de estos compuestos (Santos *et al.*, 2015). También se ha utilizado como agente encapsulante un almidón modificado denominado capsul, el cual ha permitido utilizar componentes hidrófobos como el carvacrol en alimentos con alto contenido acuoso (Char *et al.*, 2015).

Literatura citada

Aadil, R.; X. Zeng; D. Sun; M. Wang; Z. Liu and Z. Zhang. 2014, nov. Combined effects of sonication and pulsed electric field on selected quality parameters of grapefruit juice. LWT - Food Science and Technology. 1: 1-4

Akbas, M. and H. Olmez. 2007, jun. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. Letters in Applied Microbiology. 44(6):619 – 624

Alonzo, G. 2015, abr. Combinations of selected physical and chemical hurdles to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in apple and orange juices. Food Control. 50 (1): 722 – 728

Badui, S. 2006. Química de los Alimentos. Cuarta edición. Pearson Educación de México. Naucalpan de Juárez, México. 736 p.

Bakkali, F.; S. Averbeck; D. Averbeck and M. Idaomar. 2008, feb. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology. 46 (2): 446–475

Barth, M.; T. Hankinson; H. Zhuang and F. Breidt. 2009, sep. Microbiological spoilage of fruits and vegetables. (cap 5, pp 135 -183). En: W. Sperber and M. Doyle (Ed). Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. Nueva York, Estados Unidos: Springer. 367 p. (Food Microbiology and Food Safety series).

Bekele, Y. and H. Ramaswamy. 2014, ago. Combined effects of high pressure, moderate heat and pH on the inactivation kinetics of *Bacillus licheniformis* spores in carrot juice. Food Research International. 62 (1): 50–58

Belda-Galbis, C.M; A. Leufvén; A. Martínez and D. Rodrigo. 2014, nov. Predictive microbiology quantification of the antimicrobial effect of carvacrol. Journal of Food Engineering. 141: 37 – 43

Berk, Z. 2013. Food Process Engineering and Technology. Segunda Edición. Reino Unido: Elsevier Inc. 690.

Burt, S. 2004, ago. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology. 94 (3): 223–253

Char, C.; S. Guerrero and S. Alzamora. 2010, oct. Mild thermal process combined with vanillin plus citral to help shorten the inactivation time for *Listeria innocua* in orange juice. Food and Bioprocess Technology. 3 (5): 752 – 761

Char, C.; L. Cisternas; F. Pérez and S. Guerrero. 2015, ago. Effect of emulsification on the antimicrobial activity of carvacrol. Journal of Food. 14 (2): 186 – 192

El Asbahani, A.; K. Miladi; W. Badri; M. Sala; E. Aït Addi; H. Casabianca; A. El Mousadik; D. Hartmann; A. Jilale; F.N. Renaud and A. Elaissari. 2015, abr. Essential oils: from extraction to encapsulation. International Journal of Pharmaceutics. 483(1-2): 220 – 243

Fallik, E. 2014. Microbial quality and safety of fresh produce. (cap 11, pp. 313 – 339). En: Florkowski, W.; R. Shewfelt; B. Brueckner and S. Prussia. Postharvest Handling. 3 Ed. San Diego, Estados Unidos: Elsevier. 592p.

Gibara, A.; M. Almeida; R. dos Santos; P. dos Passos; M. Russo; A. Antunes; D. Pereira and L. Quintans. 2015, feb. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano with β -cyclodextrin improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. Chemico-Biological Interactions. 227: 69–76

Guarda, A; J. Rubilar; J. Miltz and M. J. Galotto. 2011, mar. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. International Journal of Food Microbiology. 146(2):144 – 150

Gutiérrez, J.; C. Barry-Ryan and P. Bourke. 2009, abr. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. Food Microbiology. 26(2): 142 – 150

Gyawali, R. and S. Ibrahim. 2014, dic. Natural products as antimicrobial agents. Food Control. 46: 412 – 429

Juneja, V; H. Dwivedi and X. Yan. 2012. Novel natural food antimicrobials. Annual Review of Food Science and Technology. 3:381 – 403

Kamimura, J. E. Santos; L. Hill and C. Gomes. 2014, jul. Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol microencapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. LWT – Food Science and Technology. 57 (2): 701–709

Kiskó, G and S. Roller. 2005, jun. Carvacrol and p-cymene inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. BMC Microbiology. 5 (36): 1 – 9

Lambert, R.J and M. Stratford. 1999, ene. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. Journal of Applied Microbiology. 86 (1):157 – 164

Landry, K.; Y. Chang; D. McClements and L. McLandsborough. 2014, sep. Effectiveness of a novel spontaneous carvacrol nanoemulsion against *Salmonella enterica* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 on contaminated mung bean and alfalfa seeds. International Journal of Food Microbiology. 187:15-21

Leistner, L. 2000, abr. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. International Journal of Food Microbiology. 55 (2 - 3): 181–186

Martin, H and P. Maris. 2012, sep. Synergism between hydrogen peroxide and seventeen

acids against six bacterial strains. Journal of Applied Microbiology. 113(3): 578 – 590

Martínez-Flores, H.; M.G. Garnica; D. Bermúdez; P. Raj and G. Barbosa. 2015, abr. Physico- chemical parameters, bioactive compounds and microbial quality of thermo-sonicated carrot juice during storage. Food Chemistry. 172: 650 – 656

McGlynn, W. 2004. The Importance of Food pH in Commercial Canning Operations. Recuperado en: <<http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Document-962/FAPC-118web.pdf>> Consultado el: 5 enero de 2015

Miedes, E and E. Lorences. 2004, dic. Apple (*Malus domestica*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits cell-wall hemicelluloses and xyloglucan degradation during *Penicillium expansum* infection. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52 (26): 7957 – 7963

Mukhopadhyay, S and L.G.M. Gorris, 2014. Hurdle Technology. (cap 2, pp. 221 – 227). En: Robinson, R. Encyclopedia of Food Microbiology. 2 Ed. London, Reino Unido: Elsevier. 863p.

Navarro, J.; L. Izquierdo; J. Carbonell and E. Sentandreu. 2014, jul. Effect of pH, temperature and maturity on pectinmethylesterase inactivation of citrus juices treated by high-pressure homogenization. LWT - Food Science and Technology. 57 (2): 785 – 788

Ramos, M; A. Jiménez and M.C. Garrigós. 2016. Carvacrol-based films: Usage and potential in antimicrobial packaging. (cap 26, pp 329 – 338). En: Barros – Velázquez, J. Antimicrobial Food Packaging. Londres, Reino Unido: Elsevier. 646 p.

Ross, A.; M. Griffiths; G. Mittal and H. Deeth. 2003, dec. Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. International Journal of Food Microbiology. 89 (2–3): 125–138

Santos, E.; J. Kamimura; L. Hill and C. Gomes. 2015, ene. Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. LWT - Food Science and Technology. 60 (1): 583–592

Sew, C. C; H. M. Ghazali; O. Martín-Belloso and M. A. Noranizan. 2014, dic. Effects of combining ultraviolet and mild heat treatments on enzymatic activities and total phenolic contents in pineapple juice. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 26: 511 – 516

Shalini, R. and S. Singh. 2014, sep. Effect of hurdle technology in food preservation: A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 56 (4): 641 – 649

Tajkarimi, M.; S.A. Ibrahim and D.O. Cliver. 2010, sep. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control. 21 (9): 1199–1218

Timmermans, R.; M.N. Nierop; A.L. Nederhoff; M.A.J.S. van Boekel; A.M. Matser and H.C. Mastwijk. 2014, mar. Pulsed electric field processing of different fruit juices: Impact

of pH and temperature on inactivation of spoilage and pathogenic microorganisms. International Journal of Food Microbiology. 173: 105–111

Tingting, M.; C. Tan; J. Luo; R. Zhou; X. Sun and J. Ma. 2013, dec. Influence of technical processing units on polyphenols and antioxidant capacity of carrot (*Daucus carota* L.) juice. Food Chemistry. 141 (3): 1637–1644

Tola, Y. and H. Ramaswamy. 2014, abr. Thermal destruction kinetics of *Bacillus licheniformis* spores in carrot juice extract as influenced by pH, type of acidifying agent and heating method. LWT - Food Science and Technology. 56 (1): 131-137

U.S Food and Drug Administration. 2012. Code of Federal Regulations Title 21. Recuperado en: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?CFRPart=114&showFR=1>>Consultado el: 5 enero de 2015.

Yucel, I and M. Karapinar. 2004, nov. Effectiveness of lemon juice, vinegar and their mixture in the elimination of *Salmonella typhimurium* on carrots (*Daucus carota* L.). International Journal of Food Microbiology. 96 (3): 301 – 305

Zuzarte, M. and L. Salgueiro, 2015. Essential Oils Chemistry. (cap 2, pp 19 – 61). En; De Sousa, D. Bioactive Essential Oils and Cancer. Salvador de Bahía, Brasil: Springer. 252 p.

**CAPÍTULO II: EFECTO DE MÉTODOS COMBINADOS SOBRE LA
INACTIVACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* EN JUGO DE ZANAHORIA**

Resumen

El jugo de zanahoria es apreciado por sus propiedades nutritivas y funcionales, sin embargo, presenta una baja acidez por lo que su vida útil se ve afectada por el rápido crecimiento microbiano. Para su preservación generalmente se aplican tratamientos térmicos a altas temperaturas; sin embargo, este proceso genera en el jugo cambios no deseados como pérdida de nutrientes, compuestos funcionales y alteración de sus características organolépticas. Una alternativa para su conservación es el uso del concepto de métodos combinados que consiste en combinar diferentes factores de estrés antimicrobiano a una menor intensidad, asegurando la inocuidad del producto sin alterar apreciablemente las características nutricionales y organolépticas. Por tal razón, el objetivo del presente trabajo fue determinar la mejor combinación de tratamientos de preservación de jugo de zanahoria, incluyendo acidificación, aplicación de un antimicrobiano natural emulsionado (carvacrol) y tratamientos térmicos suaves, para la inactivación de *Escherichia coli*; así como también seleccionar los mejores tratamientos y evaluar las características sensoriales y estabilidad física, química y microbiológica durante el almacenamiento en refrigeración. La inhibición de *E. coli* por la combinación de tratamientos fue más efectiva, respecto de los tratamientos individuales, logrando una diferencia de al menos 1 ciclo logarítmico en todos los casos estudiados. El modelo de Weibull permitió cuantificar la respuesta no lineal y seleccionar dos tratamientos efectivos desde el punto de vista microbiológico: T7 (58 °C, CA-E 0,20 µL/mL y pH 4,5) y T14 (60 °C, CA-E 0,10 µL/mL y pH 5,0). La evaluación sensorial evidenció que estos dos tratamientos no afectaron la calidad organoléptica del jugo. La acidez titulable, sólidos solubles y el color tampoco fueron significativamente afectados. La aplicación de estos tratamientos fue efectiva para inactivar la microflora natural del jugo, logrando mantener un producto apto para el consumo por 21 días a 4°C. La combinación de los diferentes métodos empleados en el presente estudio permitió que actuaran como múltiples barreras y se produjera un efecto sinérgico frente los microorganismos, ya que se lograron reducciones mayores al combinarlos, que en el caso de su aplicación de forma individual. Las combinaciones de tecnologías de preservación propuestas constituyeron una buena alternativa para mantener la inocuidad de los jugos de zanahoria por 21 días en refrigeración, minimizando el deterioro de la calidad física, química y sensorial.

Palabras claves: jugo zanahoria, carvacrol, métodos combinados

Abstract

Carrot juice is appreciated for its nutritional and functional properties, however, it has a low acid juice so its shelf life is affected by the rapid microbial growth. For its preservation, thermal treatments at high temperatures are generally applied; however, this process generates undesirable changes in the juice, such as loss of nutrients, functional compounds and alteration of the organoleptic characteristics. One alternative for the preservation is the use of the combined methods concept, which consists of combining different antimicrobial stress factors at a lower intensity, ensuring the safety of the product without significantly altering the nutritional and organoleptic characteristics. For this reason, the objective of the present work was to determine the best combination of preservation treatments for carrot juice, including acidification, application of an emulsified natural antimicrobial (carvacrol) and mild thermal treatments, for the inactivation of *Escherichia coli*; as well as to select the best treatments and to evaluate the sensorial characteristics and physical, chemical and microbiological stability during the refrigerated storage. The inhibition of *E. coli* was more effective with the combination of treatments than with the individual treatments, achieving a difference greater than 1 logarithmic cycle in all the evaluated cases. The Weibull model allowed to quantify the non linear response and to select 2 effective treatments from the microbiological point of view: T7 (58 °C, CA-E 0.20 µL/mL y pH 4.5) and T14 (60 °C, CA-E 0.10 µL/mL y pH 5.0). The sensory evaluation evidenced that both treatments did not affect the organoleptic quality of the juice. Titratable acidity, soluble solids and color were not significantly affected by the application of these technologies. These 2 treatments were effective in inactivating the natural microflora, managing to maintain a juice suitable for consumption for at least 21 days at 4 ° C. The combination of the different methods used in the present study allowed them to act as multiple barriers and a synergistic effect against the microorganisms, since greater reductions were achieved when combined, than in the case of their application individually. The proposed preservation technology combinations were a good alternative to maintain the safety of carrot juice for 21 days in refrigeration, minimizing the deterioration of physical, chemical and sensorial quality.

Keywords: carrot juice, carvacrol, combined methods

Introducción

Mundialmente se ha fomentado el consumo de frutas y vegetales por ser componentes esenciales de una dieta saludable. Estos alimentos son conocidos por ser fuente de vitaminas, minerales y compuestos fitoquímicos, especialmente antioxidantes. También se destacan por ser alimentos con un alto aporte de fibra dietética (Slavin y Lloyd, 2012). La incorporación a la dieta tiene conocidos efectos beneficiosos para la salud como la prevención de enfermedades crónicas tales como la hipertensión, enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares, diabetes, cáncer, entre otras (Boeing *et al.*, 2012).

La zanahoria es un vegetal mundialmente consumido, fuente de fitonutrientes tales como minerales, vitaminas y otros compuestos funcionales. Dentro de estos últimos, se destacan α - y β -carotenos, los cuales tienen actividad de pro-vitamina A, y se los encuentra en mayor cantidad en las variedades de color anaranjado. Por otro lado, los principales compuestos fenólicos presentes en esta especie son ácidos clorogénicos, los cuales además de su poder antioxidante, contribuyen a las características organolépticas de la zanahoria, principalmente el aroma (Arscott y Tanumihardjo, 2010).

Los productos procesados a partir de zanahoria comprenden enlatados, deshidratados, bebidas y jugos. El jugo de zanahoria es una de las bebidas no alcohólicas más populares en los países desarrollados. En los últimos años, se ha producido un aumento en la demanda de este jugo a consecuencia del reconocimiento como una rica fuente de antioxidantes (Tingting *et al.*, 2013; Aguiló-Aguayo *et al.*, 2014). Debido a los bajos rendimientos en la producción de jugo, se han incorporado diferentes tecnologías en el proceso como lo es la adición de enzimas, calentar el puré de zanahorias y la tecnología de decantación (Datt *et al.*, 2012).

En relación a la microflora presente en el jugo de zanahoria, Patterson *et al.*, (2012), señalan que se compone por un amplio rango de bacterias de diferentes fuentes ambientales, resultado de la diversidad de la microflora del suelo y los microorganismos asociados con la raíz. Estos autores reportaron que la microflora predominante consiste en bacterias Gram negativas, principalmente *Pseudomonas spp.* (75%) y *Erwinia/Pantoea spp.* (11%); aunque también se encontraron bacterias lácticas (30%). Dentro de esta microbiota también es posible encontrar microorganismos patógenos tales como *Salmonella spp.*, *Clostridium spp.*, *Listeria spp.*, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli* (Segun y Karapinar, 2004; Anandí *et al.*, 2008; Turgis *et al.*, 2012; Huseyin *et al.*, 2012). La presencia de estos patógenos en productos alimenticios es en general consecuencia de la contaminación durante la producción agrícola, ya sea en la cosecha o en las operaciones posteriores (O'Beirne *et al.*, 2014).

El jugo de zanahoria se clasifica como un alimento de baja acidez dado a que su pH oscila entre 6,2 a 6,4, lo cual genera un riesgo microbiológico y limita su tiempo de almacenamiento (Aguiló-Aguayo *et al.*, 2014; Martínez - Flores *et al.*, 2015). En general, el jugo sin pasteurizar tiene una vida útil de 1 a 2 días. La industria de alimentos, con la

finalidad de aumentar el tiempo de almacenamiento, prepara el jugo de zanahoria mezclado con otras frutas, como el jugo de naranja, para estabilizar el producto disminuyendo el pH y aplicando un procesamiento térmico. Sin embargo, ambas operaciones afectan el producto, ya sea la modificación del sabor, color y textura o una disminución de su valor nutricional (Picouet *et al.*, 2015).

Los consumidores requieren alimentos que tengan sabor y color semejantes al producto natural, como también una alta calidad nutricional y un largo tiempo de almacenamiento que sea suficiente para su distribución y consumo. El jugo de zanahoria no es la excepción, dado que la alta demanda está influenciada principalmente por su valor nutricional, por lo cual se hace necesario incorporar nuevas tecnologías capaces de mantener la estabilidad microbiológica conservando sus características nutricionales y sensoriales (Zhang *et al.*, 2016).

Dentro de las tecnologías de preservación de alimentos que cumplen con el objetivo de asegurar la inocuidad, manteniendo las características sensoriales y nutricionales, se encuentra el uso de tratamientos térmicos suaves. La combinación de este tipo de tratamientos con otros factores de estrés, en general produce un efecto sinérgico o aditivo en cuanto a la inactivación microbiana. Por ejemplo, se ha observado que al aplicar altas presiones hidrostáticas en combinación con temperaturas entre 40 y 60°C en jugo de zanahoria, se conservaron parámetros de calidad como textura y color, junto con la concentración de vitamina C, a diferencia de la aplicación de un tratamiento térmico convencional (Gong *et al.*, 2015).

La acidificación de alimentos ayuda a la protección frente a bacterias patógenas, pero esto debe complementarse con otro tratamiento ya que hay microorganismos resistentes a la acidificación. Se ha reportado, que al hacer una reducción de pH desde 6,2 a 4,5 junto con un tratamiento térmico, se obtuvieron valores de D un 18% menores para el jugo acidificado, a una misma temperatura de tratamiento térmico (Tola *et al.*, 2014).

El uso de antimicrobianos naturales de origen vegetal, es otra forma de asegurar la inocuidad de los alimentos. En jugo de zanahoria se ha utilizado carvacrol emulsionado con capsul, un almidón modificado que actúa como encapsulante para favorecer la miscibilidad del aceite en el jugo. Una concentración de 0,5 µL/mL de carvacrol emulsionado tuvo escaso efecto inhibitorio sobre *E. coli* inoculado en jugo de zanahoria; sin embargo, la aplicación de esta concentración del antimicrobiano combinada con acidificación a pH 4,5 aumentó la inactivación del microorganismo desde 0,2 a 2,1 reducciones logarítmicas (Char *et al.*, 2015).

Por tales antecedentes expuestos, en esta tesis se evaluará el uso de diferentes métodos de preservación de alimentos, tales como los tratamientos térmico suaves, acidificación y carvacrol emulsionado, evaluados tanto en forma individual como combinados sobre *Escherichia coli* inoculado en jugo de zanahoria.

Hipótesis

La aplicación de métodos combinados de preservación de alimentos como la combinación de tratamientos térmico suaves, acidificación y carvacrol emulsionado, es capaz de inactivar *Escherichia coli* inoculada en jugo de zanahoria, aumentando su vida útil con mínimo impacto sobre las características sensoriales del alimento.

Objetivos

Objetivo General

Determinar la mejor combinación de tratamientos de preservación tales como acidificación, tratamientos térmicos suaves y la aplicación de un antimicrobiano natural, sobre jugo de zanahoria, en cuanto a la inactivación de *Escherichia coli*, la vida útil y las características sensoriales del producto.

Objetivos específicos

- Evaluar en forma individual el efecto de tratamientos térmicos suaves, reducción de pH y adición de carvacrol emulsionado en jugo de zanahoria inoculado con *Escherichia coli*
- Estudiar el efecto de la combinación de tratamientos térmicos suaves, reducción de pH y adición de carvacrol emulsionado en jugo de zanahoria inoculado con *Escherichia coli*
- Comparar, en términos de calidad sensorial y vida útil, una selección de los mejores tratamientos de jugo de zanahoria

Materiales y métodos

Ubicación del estudio

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Material biológico

El material biológico utilizado correspondió a zanahorias frescas (*Daucus carota*), obtenidas del comercio local, cultivadas en la zona central de Chile, las cuales fueron almacenadas a 4°C. A partir de ellas, se extrajo el jugo que se utilizó en todo el proyecto.

Tratamientos y diseño experimental

Los tratamientos incluyeron los métodos de preservación de alimentos: acidificación, aplicación de carvacrol emulsionado y tratamientos térmicos suaves, a los cuales fueron sometidas muestras de jugo de zanahoria inoculado con *Escherichia coli* ATCC® 35218™, con la finalidad de evaluar el efecto de los tratamientos sobre la inactivación del microorganismo. El experimento se dividió en tres etapas, siendo la primera la aplicación en forma individual de los métodos de preservación de alimentos mencionados anteriormente. En la segunda etapa se aplicaron los tratamientos de forma combinada, y en la tercera etapa se procedió a seleccionar los mejores tratamientos combinados que luego se evaluaron sensorialmente, así como también se determinó su estabilidad física, química y microbiológica en el tiempo, en comparación con un control (jugo de zanahoria sin tratar).

Etapas 1. Evaluación del efecto individual de cada tipo de tratamiento. En la primera etapa se evaluó la supervivencia de *E. coli* ante diferentes métodos de preservación aplicados sobre jugo de zanahoria inoculado. Se trabajó en base a un diseño completamente aleatorizado (DCA), con 3 tratamientos (Cuadro 1) y 3 repeticiones, para cada tecnología aplicada. La unidad experimental correspondió a 100 mL de jugo de zanahoria inoculado con 1 mL de inóculo de *E. coli* (concentración $\approx 1 \times 10^9$ UFC/mL), resultando una concentración final en el jugo de $\approx 1 \times 10^7$ UFC/mL. Para cada tratamiento se hicieron recuentos microbiológicos con el fin de obtener las curvas de supervivencia, graficando el logaritmo de los supervivientes (N) en relación a la población inicial (N_0) en función del tiempo. No se incluyó un control sin tratar en las etapas 1 y 2 porque en pruebas previas realizadas en el grupo de trabajo se observó que la población microbiana permanece sin cambios por 24 h luego de la inoculación en el jugo de zanahoria.

Cuadro 1. Tratamientos aplicados en la Etapa 1.

Tecnología	Tipo de Tratamiento	Intensidad
1	Tratamiento térmico suave	56°C
	Tratamiento térmico suave	58°C
	Tratamiento térmico suave	60°C
2	Acidificación	pH 4,5
	Acidificación	pH 5,0
	Acidificación	pH 5,5
3	Emulsión de carvacrol	0,10 µL/mL
	Emulsión de carvacrol	0,15 µL/mL
	Emulsión de carvacrol	0,20 µL/mL

Etapa 2. Evaluación del efecto combinado de los tratamientos. En la segunda etapa se evaluó el efecto combinado de los tres tipos de métodos de preservación sobre la inactivación de *E. coli*. Se aplicó un diseño experimental de tipo Box-Behnken con 3 factores (tratamientos térmicos suaves, acidificación y adición de una emulsión de carvacrol) en 3 niveles, incluyendo 3 puntos centrales, resultando un total de 15 tratamientos (Cuadro 2). La unidad experimental correspondió a 100 mL de jugo de zanahoria inoculado con 1 mL de inóculo de *E. coli*, resultando una concentración final de 1×10^7 UFC/mL en el jugo. Para cada tratamiento se hicieron recuentos microbiológicos con el fin de obtener las curvas de supervivencia, graficando el logaritmo de los supervivientes (N) en relación a la población inicial (N_0) en función del tiempo.

Cuadro 2. Tratamientos combinados que se aplicaron en la Etapa 2.

Tratamiento	pH	Temperatura (°C)	Emulsión de carvacrol (µL/mL)
T1	5,5	60	0,15
T2	4,5	56	0,15
T3	5,0	58	0,15
T4	5,5	58	0,10
T5	5,5	56	0,15
T6	5,0	56	0,10
T7	4,5	58	0,20
T8	4,5	58	0,10
T9	5,0	60	0,20
T10	5,0	56	0,20
T11	4,5	60	0,15
T12	5,0	58	0,15
T13	5,5	58	0,20
T14	5,0	60	0,10
T15	5,0	58	0,15

Etapa 3. Selección de los mejores tratamientos, evaluación sensorial, estabilidad física, química y microbiológica. Se procedió a seleccionar los mejores tratamientos combinados evaluados en la etapa 2, según su efectividad sobre la inactivación de *E. coli*. A los tratamientos seleccionados se les realizó una evaluación sensorial, con el objetivo de seleccionar los tratamientos efectivos desde el punto de vista microbiológico que tuvieran la menor modificación de las características organolépticas del jugo. Paralelamente se realizó un estudio de la estabilidad física, química y microbiológica que incluyó un tratamiento control que correspondió a 100 mL de jugo de zanahoria sin tratar y a los tratamientos seleccionados (Cuadro 3), realizando las mediciones los días 0, 3, 7, 14, 17 y 21 d, de las muestras almacenadas a 4°C. El diseño aplicado para esta etapa fue completamente aleatorizado, con tres repeticiones. La unidad experimental correspondió a 100 mL de jugo de zanahoria recién extraído sin inocular.

Cuadro 3. Tratamientos seleccionados para evaluar la evolución en el almacenamiento refrigerado.

Nomenclatura	Tratamiento
T1	Control
T2	Seleccionado en la etapa 2
T3	Seleccionado en la etapa 2

Manejo del experimento

1. Preparación del inóculo. El inóculo se preparó transfiriendo material de una estría de cultivo fresco de *E. coli* ATCC® 35218™, a una botella con 50 mL de caldo Trypticase soya (CASO) y se incubó a 37 °C con agitación durante 24 h, de manera tal de obtener un cultivo en fase estacionaria con concentración $\approx 10^9$ UFC/mL.

2. Preparación del jugo de zanahoria. Para la preparación del jugo se utilizaron zanahorias adquiridas del comercio local, a las cuales se le eliminó alrededor de 1 cm de cada extremo, junto con aquellas hendiduras y protuberancias que pudieran ser posibles fuentes de contaminación y se cortaron longitudinalmente. Luego se sanitizaron con una solución de hipoclorito de sodio (100 mg/L), sumergiéndolas por un periodo de 5 min. Posteriormente se enjuagaron y escurrieron y se extrajo el jugo con un extractor (ZJ145 CTA, Panyu, China). Al jugo que se utilizó en los ensayos de inoculación se le aplicó un tratamiento térmico a 75°C por 2 min (Char *et al.*, 2009), con el fin de evitar la interferencia de la microbiota natural del material vegetal en los ensayos microbiológicos. Finalmente se envasaron alcuotas de 100 mL de jugo en botellas estériles, las cuales se congelaron a - 18°C hasta su uso.

3. Preparación de la emulsión de carvacrol. Se elaboró una emulsión en proporción 1:2

de carvacrol (Sigma Aldrich, Reino Unido) y Capsul ® (National Starch & Chemical, Reino Unido), un agente encapsulante constituido por almidón de maíz modificado. Para esta preparación se disolvieron 15 g del agente encapsulante en 77,5 g de agua destilada, los cuales se mezclaron y calentaron sobre un agitador magnético (Decalab SRL, Argentina) hasta alcanzar 70°C, en donde se consiguió la disolución completa del almidón modificado. Posteriormente se dejó enfriar hasta alcanzar 40°C y luego se repuso el agua evaporada. En último lugar, se añadieron 7,5 g de carvacrol y se homogenizó (Ultraturrax, IKA, Alemania) con velocidad ascendente de 0 a 15.000 rpm, en un lapso de 5 min (Donsi *et al.*, 2011). La estabilidad y efectividad antimicrobiana de la emulsión fue evaluada previamente por el grupo de trabajo (Char *et al.*, 2015).



Figura 2. Preparación de emulsión de carvacrol

4. Aplicación de tratamientos

4.1. Tratamientos de acidificación. La acidificación se realizó añadiendo ácido cítrico al 30% p/v (Merck, Darmstadt, Alemania), a 100 mL de jugo de zanahoria. Se redujo el pH a tres diferentes niveles: 4,5; 5,0 y 5,5. Se midió el pH alcanzado con el pHmetro (PH21, Hanna Instruments, Rhode Island, Estados Unidos).

Para evaluar el tratamiento de acidificación se agregó 1 mL del inóculo de *E. coli* a 100 mL de jugo de zanahoria ajustado a cada uno de los niveles de pH establecidos, resultando una concentración final de 1×10^7 UFC/mL. Inmediatamente se tomaron muestras de 1 mL del jugo a intervalos de tiempo regulares, cada dos horas. Las muestras se colocaron en tubos con 9 mL de agua de peptona 0,1% e inmediatamente se realizaron los recuentos microbiológicos correspondientes.

4.2. Tratamiento térmico suave. Para efectuar el tratamiento térmico suave al jugo de zanahoria, se empleó un vaso de doble camisa de 150 mL de capacidad, conectado a un baño termostático con circulación externa (JeioTech, China), cuya temperatura se fijó de manera de obtener en el jugo 56, 58 y 60 °C. El sistema estuvo en constante agitación mediante la utilización de un agitador magnético (Decalab SRL, Argentina), y la temperatura se monitoreó continuamente por medio de una termocupla acoplada a un registrador de temperatura (Cole Palmer, Estados Unidos). Una vez alcanzada la

temperatura deseada en el jugo, se añadió 1 mL del inóculo resultando una concentración final de aproximadamente 1×10^7 UFC/mL, e inmediatamente se tomaron las muestras a intervalos de tiempo regulares, aproximadamente entre 30 s y 3 min dependiendo de la temperatura del tratamiento. Durante todo el tratamiento se mantuvo la agitación constante y se monitoreó la temperatura. Las muestras se colocaron en tubos con 9 mL de agua de peptona 0,1% y se mantuvieron en agua con hielo hasta realizar los recuentos microbiológicos correspondientes, con el fin de frenar el efecto del tratamiento térmico.

4.3. Tratamiento con carvacrol. A 100 mL de jugo de zanahoria se le agregó 133 μ L, 200 μ L y 266 μ L de carvacrol emulsionado (CA-E), con la finalidad de obtener concentraciones de 0,10 μ L/mL, 0,15 μ L/mL y 0,20 μ L/mL, respectivamente. En seguida, se agitó el jugo para lograr la homogenización de la muestra. A cada una de las botellas con distintas concentraciones de carvacrol, se le incorporó 1 mL del inóculo de *E. coli*, resultando una concentración final de 1×10^7 UFC/mL. Se tomaron muestras de 1 mL cada dos horas, permaneciendo el jugo inoculado en refrigeración (4°C). Las muestras se colocaron en tubos con 9 mL de agua de peptona 0,1% e inmediatamente se realizaron los recuentos microbiológicos correspondientes.

4.4. Tratamientos combinados de acidificación, tratamiento térmico suave y carvacrol. Se aplicó a 100 mL de jugo de zanahoria la combinación de los diferentes niveles de cada tratamiento según la metodología mencionada anteriormente. Primero se ajustó el nivel de pH, luego se añadió la concentración de carvacrol emulsionado, siguiendo los procedimientos detallados anteriormente. Una vez que el jugo acidificado y con carvacrol alcanzó la temperatura correspondiente al tratamiento térmico, se le adicionó 1 mL del inóculo, resultando un jugo con una concentración final de aproximadamente 1×10^7 UFC/mL. La toma de muestra se realizó durante el tratamiento térmico, manteniendo agitación constante y monitoreo de la temperatura, a diferentes intervalos de tiempo, aproximadamente entre 30 s a 3 min dependiendo de la severidad del tratamiento (temperatura). Las muestras se colocaron en tubos con 9 mL de agua de peptona 0,1% y se mantuvieron en agua con hielo hasta realizar los recuentos microbiológicos correspondientes, con el fin de frenar el tratamiento térmico.

5. Evaluación sensorial. A los dos tratamientos combinados seleccionados según su efectividad en cuanto a la inactivación de *E. coli*, se les realizó un análisis sensorial utilizando el método descriptivo cuantitativo. Previamente se realizó un *focus group*, en donde se acordaron los atributos a evaluar como también el lenguaje que se utilizó en el análisis descriptivo y el orden de evaluación. Un panel de 12 jueces entrenados evaluó los atributos de calidad del jugo, utilizando una escala no estructurada de 15 cm indicando la intensidad de cada atributo (Lawless y Heymann, 2010). A cada evaluador en una caseta, se le entregó 25 mL de cada una de las muestras en vasos de plástico codificados con tres dígitos aleatorios, junto con la pauta de evaluación.

6. Estudio de estabilidad física, química y microbiológica. A los 2 tratamientos seleccionados y un control sin tratar, se les efectuó un estudio de estabilidad física, química y microbiológica a través del tiempo. Se procedió a tomar muestras el día 0, 3, 7, 14, 17 y 21. Para el estudio microbiológico se realizaron las evaluaciones exigidas por el Ministerio de Salud de Chile, en el reglamento sanitario de alimentos (MINSAL, 2014) (Anexo II). También se realizaron otras evaluaciones microbiológicas no exigidas en la norma que se consideran importantes para este tipo de alimento por su microbiota natural.

Evaluaciones

1. Recuento de supervivientes. Para el recuento de *E. coli* se realizaron diluciones en tubos con 9 mL de agua de peptona 0,1%. Se sembraron 0,1 mL en la superficie de placas con Tripticasa soya agar (CASO) y se incubaron por 24 h a 37°C. Con los datos obtenidos se realizaron curvas de supervivencia en función del tiempo ($\log N/N_0$ vs t) para cada uno de los tratamientos, como también para los tratamientos combinados.

2. Recuento de Aerobios mesófilos totales. A partir de cada muestra obtenida se realizaron las diluciones seriadas correspondientes y se sembró 1 mL en agar para recuento en placa (APC), luego se incubó a 37°C por 24 h.

3. Recuento de Enterobacterias. Se sembró 1 mL de la dilución apropiada de la muestra de jugo de zanahoria de cada tratamiento combinado escogido y de la muestra control en agar violeta rojo bilis dextrosa (VRBD), luego se incubó a 37°C por 48 h.

4. Recuento de *E. coli*. Se realizó siembra en tubos por la técnica del número más probable (NMP) utilizando 3 tubos para cada dilución (3 diluciones sucesivas). Se sembraron 1 mL de cada dilución en 3 tubos de caldo verde brillante lactosa 2% de sales biliares con campana de Durham y se incubó a 37°C durante 24 h. Los tubos que resultaron positivos (formación de gas) se sembraron en superficie (1 mL) en placas con agar eosina y azul de metileno (EMB), y se incubaron por 24 h a 37°C. Tres colonias con aspecto típico se confirmaron con las pruebas bioquímicas disponibles (agar triple azúcar hierro, TSI; agar lisina hierro, LIA; y agar movilidad indol ornitina, MIO).

5. Recuento de *Lactobacillus spp.* Se sembró 1 mL en profundidad en agar De Man Rogosa y Sharp (MRS), luego se incubó a 37°C por 48 h en una atmósfera enriquecida con 5-10% de CO₂, utilizando cámaras de anaerobiosis.

6. Recuento de Hongos y levaduras. Se sembró en superficie 0,1 mL de una muestra de jugo de zanahoria de cada tratamiento combinado escogido y de la muestra control en agar Papa dextrosa (PD) acidificado (pH 3,5), luego se incubó a 25°C por 7 días.

7. Acidez titulable. Se midió utilizando NaOH 0,1N, titulando hasta pH 8,1 (AOAC, 2012). Para llevar a cabo esta evaluación se pesó 10g de jugo de zanahoria, los cuales se aforaron con 50 mL de agua destilada. Luego se fue añadiendo lentamente el NaOH 0,1N hasta alcanzar un pH de 8,1. Para determinar la acidez titulable se empleó la siguiente ecuación:

$$\% AT: \frac{(Gasto * N NaOH * meq \text{ del ácido preponderante}) * 100}{Peso \text{ muestra (g)}}$$

En dónde:

Gasto: volumen de NaOH 0,1N necesario para alcanzar un pH de 8,1

Ácido preponderante: ácido cítrico, $m_{eq} = 0,064g$

8. Sólidos solubles. Se evaluaron los sólidos solubles (°Brix) con un refractómetro (Atago ATC-1 y Atago N4, Japón) (AOAC, 2012).

9. Color. Se evaluó el color del jugo de zanahoria utilizando un colorímetro compacto triestímulo (UltraScan Pro, Hunter Lab, Estados Unidos) en el espacio Cielab. Fueron evaluados los parámetros luminosidad (L), croma o saturación (C*) y tono (H*) (Char *et al.*, 2007).

Análisis Estadístico

Las curvas de supervivencia de *E. coli* se analizaron calculando la desviación estándar de las medias. A los tratamientos combinados, se les aplicó el modelo de Weibull (Anexo 1). Los parámetros estimados de este modelo (b y n) se obtuvieron utilizando la técnica de regresión no lineal. La validación interna del modelo se llevó a cabo para determinar si describió adecuadamente los datos experimentales por medio del análisis de varianza (ANDEVA) con un nivel de confianza del 95 % y el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{adj}). Para todos los análisis de regresión se utilizó Statgraphics Centurion XV (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA, Estados Unidos).

En el caso de los ensayos físicos, químicos y sensoriales, los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) y en caso de encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey, con un nivel de significancia de 5%. Se utilizó el software estadístico Infostat 5.1. (Universidad de Córdoba, Córdoba, Argentina).

Resultados y discusión

Etapa 1: Evaluación del efecto individual de cada tipo de tratamiento

Se evaluaron los tres tipos de tratamientos de conservación de alimentos: acidificación, tratamientos térmicos suaves e incorporación de un antimicrobiano natural, carvacrol emulsionado. Se elaboraron las curvas de supervivencia de *E. coli*, frente a los diferentes métodos de conservación. Para esto, se realizaron los recuentos de las colonias sobrevivientes luego de la aplicación del tratamiento, expresándose como el logaritmo de los supervivientes sobre el número inicial de microorganismos ($\log N/N_0$).

Tratamiento de acidificación. En la Figura 3 se muestran las curvas de supervivencia obtenidas al acidificar 100 mL de jugo de zanahoria inoculado con 1 mL de *E. coli*, en tres niveles de pH (4,5 – 5,0 – 5,5), utilizando ácido cítrico al 30% p/v (Merck, Darmstadt, Alemania). Las curvas de supervivencias demuestran que el efecto en cuanto a la inactivación de *E. coli* ante la acidificación no generó una variación significativa en relación a la cantidad de sobrevivientes al cabo de 6 horas de tratamiento. Por tanto, se puede apreciar que este microorganismo sobrevivió a pH menores que el del jugo de zanahoria (pH 6,4), resultando en una baja inactivación (< 1 ciclo logarítmico), en los tres diferentes niveles de pH evaluados.

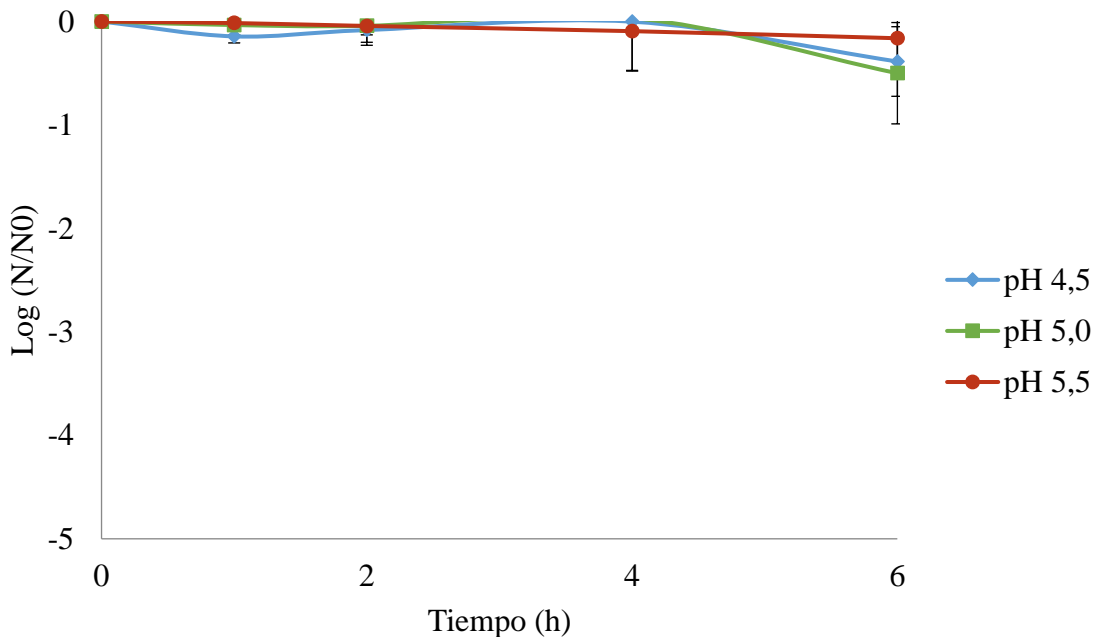


Figura 3. Curvas de supervivencia de *E. coli* ATCC 35.218 según el efecto de acidificación en jugo de zanahoria inoculado. Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias (n=3).

Numerosos estudios han demostrado que los ácidos orgánicos tienen actividad antimicrobiana, abarcando un amplio espectro de microorganismos, como son el caso de bacterias de los géneros *Cronobacter*, *Listeria*, *Salmonella* y *E. colischerichia coli* (Kim y Rhee, 2015). Uno de los estudios que han dado cuenta de esta actividad antibacteriana fue llevado a cabo en jugo de zanahoria empleando ácido cítrico y ácido caprílico, en concentraciones de 2,5 y 5,0 mM, ante la presencia de *Escherichia coli* O157:H7. Los resultados mostraron que la población bacteriana se afectó levemente al aplicar los ácidos de forma individual, sin embargo, al combinarlos se observó una alta actividad bactericida, con una concentración de 5,0 mM de cada ácido, logrando disminuir la población en 5,16 log UFC/mL (Kim y Rhee, 2015). Otro estudio realizado con jugo de naranja inoculado con *Escherichia coli* O157:H7, en el que se utilizó la acidificación a pH 2,5, 3,5 y 4,5 como medio de preservación, junto con tratamientos térmicos suaves (50°C, 55°C y 60°C), se observó que en general, mientras mayor fue la reducción del pH, mayor fue la inactivación de las bacterias. El mayor efecto se observó con una temperatura de 60°C y pH 2,5, llegando a tener una reducción de la población mayor a 5,72 reducciones logarítmicas en 20 segundos (Lee *et al.*, 2015).

Tratamientos térmicos suaves. En la Figura 4, se exponen los resultados de las curvas de supervivencia de los tratamientos térmicos suaves a 56°C, 58°C y 60°C, aplicados sobre 100 mL de jugo de zanahoria inoculado con *Escherichia coli*. Las curvas de supervivencia permiten apreciar que existió un efecto inhibitorio de la población de *E. coli* con la temperatura, logrando alcanzar hasta 3,92 reducciones logarítmicas a los 4 min de tratamiento a 60°C. Por otro lado, utilizando la menor temperatura (56°C), se alcanzó una reducción de 2,78 ciclos log a los 15 min; mientras que a 58°C se redujo la población en 3,2 ciclos log a los 6 min de exposición.

Espina *et al.* (2012), realizaron un estudio que concuerda con nuestros resultados en el hecho de que, a mayor temperatura de tratamiento térmico, disminuyó el tiempo necesario para inactivar *E. coli*. En tal estudio emplearon jugo de manzana y evaluaron el tiempo necesario para lograr 5 reducciones logarítmicas utilizando tratamientos térmicos de 54°C, 57°C y 60°C. Los autores reportaron que a medida que el tratamiento fue más intenso el tiempo necesario de exposición a la temperatura se lograba reducir hasta 5,7 veces para lograr inactivar 5 reducciones logarítmicas.

La temperatura habitual de pasteurización para jugos oscila en un rango de 72 a 83°C durante 20 segundos (Espina *et al.*, 2012). Sin embargo, tales valores comprometen la calidad organoléptica y nutricional. A temperaturas menores que 55°C la inactivación bacteriana es muy baja como lo presenta el estudio publicado por Kim y Rhee (2015), utilizando jugo de manzana inoculado con *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, calentado a 50°C y 55°C. El tratamiento a 50°C no mostró efectividad antimicrobiana ante *E. coli*, sin embargo, la población de *Salmonella typhimurium* se redujo en 2,61 log a los 10 minutos de tratamiento. Al aumentar la temperatura a 55°C la población de *E. coli* se redujo menos de 1 ciclo log a los 5 min de tratamiento, en cambio se observaron reducciones de 1,38 ciclos log de *S. typhimurium*. Tales resultados demuestran la mayor resistencia a la temperatura de *E. coli*, por lo cual tratamientos inferiores a 56°C son poco efectivos.

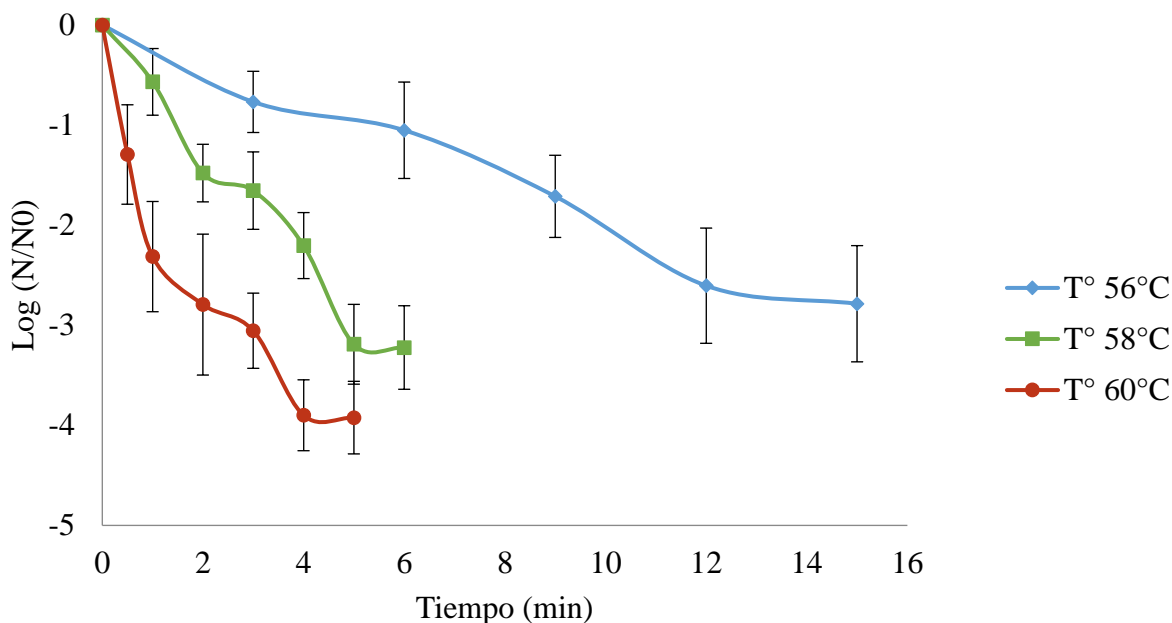


Figura 4. Curvas de supervivencia de *E. coli* según el efecto de tratamientos térmicos suaves en jugo de zanahoria inoculado. Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias (n=3).

Escherichia coli es uno de los patógenos más resistente al calor que pueden encontrarse en jugos de frutas y vegetales, por lo que se busca que un tratamiento sea capaz de reducir por lo menos 5 ciclos logarítmicos de este microorganismo pertinente para ser efectivo (US Food and Drug Administration, 2016). Según los resultados en esta etapa se observó que el tratamiento de forma individual de temperaturas suaves no es suficiente para alcanzar el mínimo requerido para la obtención de un alimento inocuo, por lo cual el uso de tecnologías de barreras es necesario para alcanzar tal valor, al combinar este tipo de tratamiento con otros métodos de preservación.

Tratamiento de adición de carvacrol emulsionado. Los resultados de las curvas de supervivencia de los tratamientos con adición de carvacrol emulsionado (CA-E), en concentraciones de 0,10; 0,15 y 0,20 $\mu\text{L}/\text{mL}$, se muestran en la Figura 5. Las curvas de supervivencia evidenciaron la escasa efectividad de las tres concentraciones evaluadas en cuanto a la inhibición de *Escherichia coli*, lográndose una reducción logarítmica < 1 ciclo log, incluso en la dosis más intensa (0,20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ CA-E). Esta situación se mantuvo inclusive a las 24 horas de tratamiento.

En el trabajo publicado por Char *et al.* (2015), se determinó que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de carvacrol, necesaria para la inhibición de *Escherichia coli* es de 0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, sin embargo, en el caso de carvacrol emulsionado esta ascendió a 1,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$. En este estudio se logró una reducción de la población bacteriana de 3,4 log, al utilizar 1,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de CA-E en jugo de zanahoria inoculado con *Escherichia coli*. Sin embargo, al usar una concentración de 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, no se alcanzó un efecto antimicrobiano significativo. No obstante, al combinar esta última concentración de carvacrol emulsionado con acidificación

del jugo (pH 4,5), se logró disminuir la población de 0,2 a 2.1 ciclos logarítmicos en dos horas de tratamiento. Por lo tanto, se concluyó que la aplicación de los métodos combinados favoreció la actividad antimicrobiana.

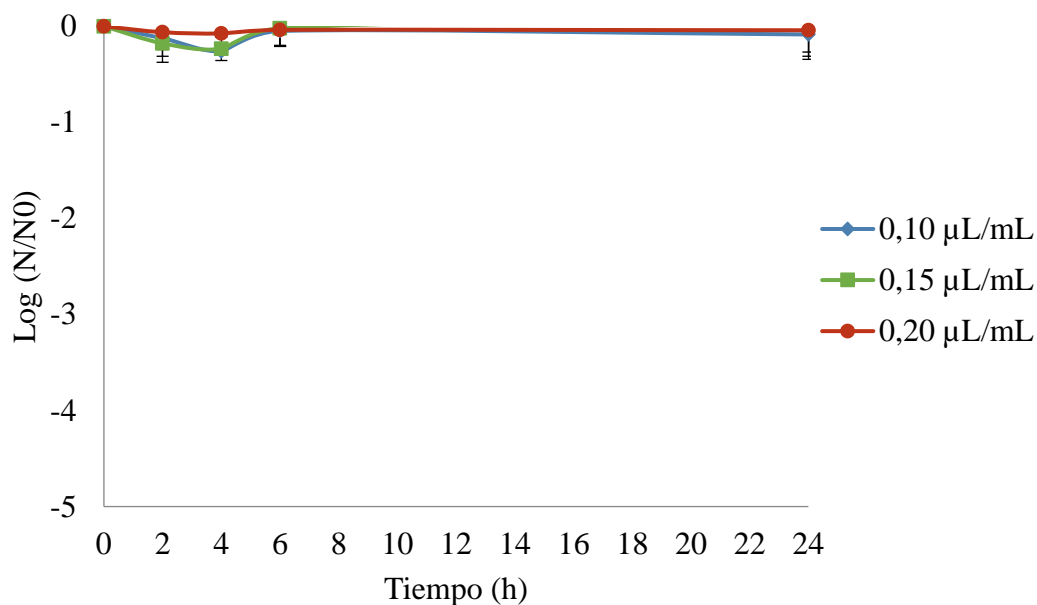


Figura 5. Curvas de supervivencia de *E. coli* según el efecto carvacrol emulsionado (CA-E), en jugo de zanahoria inoculado. Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias (n=3).

El carvacrol se caracteriza por tener un fuerte sabor y aroma, lo cual daña la calidad sensorial de los alimentos cuando se lo utiliza en concentraciones elevadas. Espina *et al.*, (2014) estudiaron el efecto de añadir carvacrol (0,02, 0,1 y 0,2 µL/mL), a jugo de tomate en cuanto a la aceptabilidad del jugo. Se observó que una concentración de 0,2 µL/mL se encontró dentro del rango tolerable luego de realizar una prueba con consumidores, no obstante, se indicó que la concentración aceptable depende de la compatibilidad del alimento con el aceite esencial, por lo que es importante evaluar cada caso particular.

Etapa 2. Evaluación del efecto combinado de los tratamientos en jugo de zanahoria inoculado con *Escherichia coli*

Para la evaluación del efecto de los tratamientos de forma combinada se realizaron 15 tratamientos que correspondían a diferentes combinaciones de los tres métodos de preservación de alimentos utilizados (tratamientos térmicos suaves, acidificación y adición de carvacrol emulsionado), aplicados en jugo de zanahoria inoculado con *Escherichia coli*. Tales combinaciones se pueden observar en el Cuadro 2 (Etapa 2). Las curvas de supervivencia se clasificaron de acuerdo a la intensidad de la temperatura que se aplicó, ya que como se evidenció en la etapa 1 es el factor preponderante a la hora de escoger el tiempo de aplicación de los tratamientos (Figura 6).

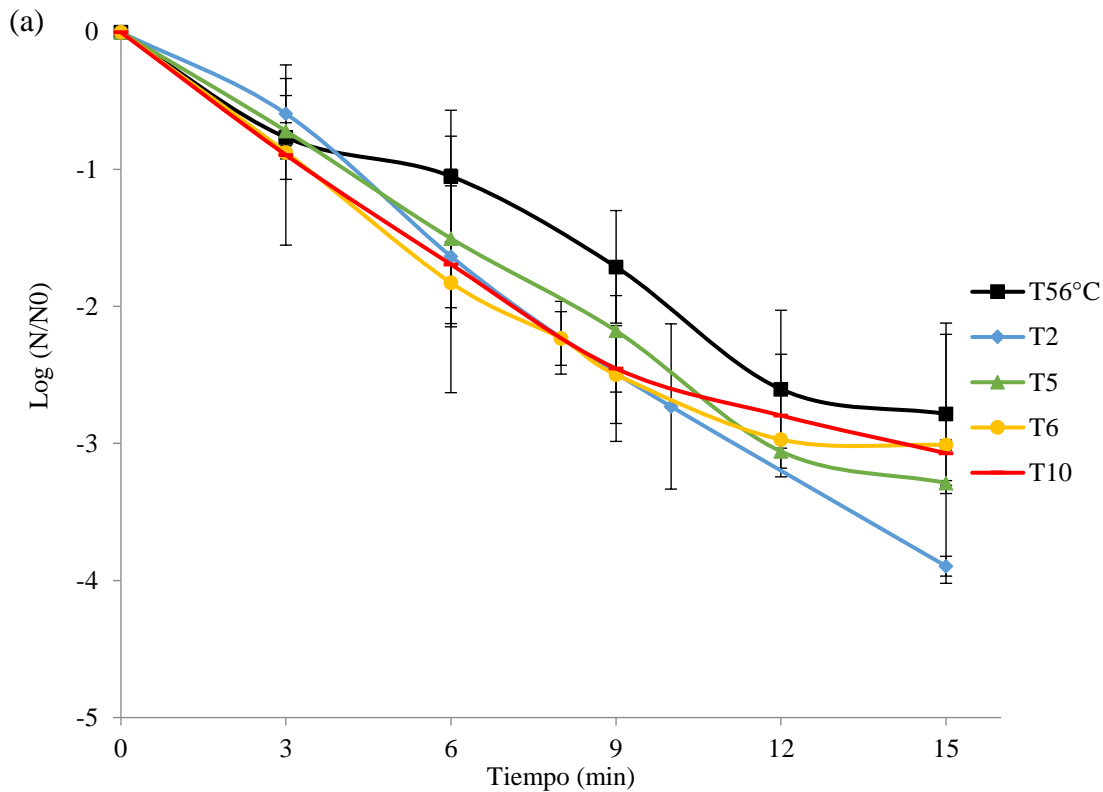


Figura 6. Curvas de supervivencia de *E. coli* ATCC 35.218 inoculado en jugo de zanahoria según el efecto de la aplicación de los tratamientos combinados (acidificación, tratamientos térmicos suaves y carvacrol emulsionado), agrupados por temperatura de tratamiento térmico. (a) 56°C. Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias (n=3).

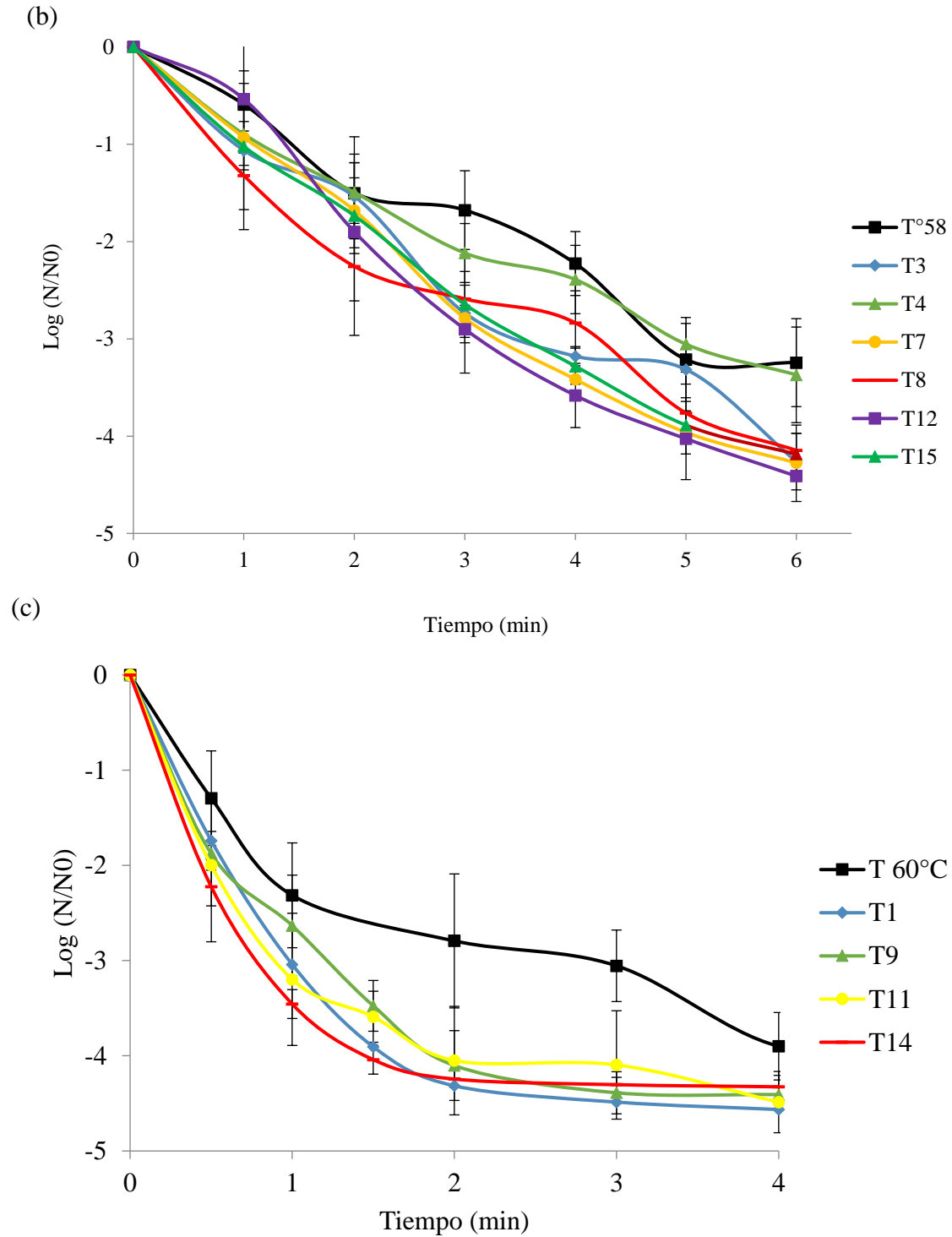


Figura 6. (continuación) Curvas de supervivencia de *E. coli* ATCC 35.218 inoculado en jugo de zanahoria según el efecto de la aplicación de los tratamientos combinados (acidificación, tratamientos térmicos suaves y carvacrol emulsionado), agrupados por temperatura de tratamiento térmico. (b) 58°C, (c) 60°C. Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias (n=3).

En la Figura 6a, se muestran las curvas de supervivencia de aquellos tratamientos en los cuales el jugo de zanahoria se procesó a 56°C. Las curvas muestran que todos estos tratamientos fueron más efectivos en cuanto a la inactivación de *E. coli*, en comparación con el tratamiento térmico de 56°C aplicado en forma individual. La reducción de la población de este microorganismo fue de 2,78 ciclos logarítmicos para el tratamiento térmico individual, mientras que se incrementó a un rango entre 3,07 a 3,89 ciclos logarítmicos en los tratamientos combinados, a los 15 min de exposición.

Aquellos casos en que el jugo se calentó a 58°C (Figura 6b), se observó una tendencia similar. La inhibición de los tratamientos combinados resultó entre 0,2 y 1,2 ciclos log superior que la inhibición del jugo tratado sólo térmicamente. El tratamiento más efectivo (T12) alcanzó una reducción de 4,4 log UFC/mL a los 6 minutos de tratamiento, en cambio con el tratamiento individual de 58°C solo redujo la población en 3,2 ciclos logarítmicos.

En cuanto a las curvas de supervivencia obtenidas como resultado de aquellos tratamientos expuestos a una temperatura de 60°C (Figura 6c), denominados como T1, T9, T11 Y T14, se observó que las combinaciones aplicadas a esta temperatura alcanzaron reducciones entre 4,1 y 4,6 ciclos logarítmicos de la población de *E. coli*, a los 4 minutos de tratamiento. Tales resultados superan al tratamiento individual a 60°C, el cual, al mismo tiempo de aplicación, solo alcanzó una reducción de 3,9 log UFC/mL. La combinación más efectiva correspondió a T1 (60°C – pH 5,5 – 0,15 µL/mL de CA-E), resultando una reducción de la población microbiana de 4,6 ciclos logarítmicos. Cabe mencionar, que los tratamientos combinados más efectivos (T1 y T14) alcanzaron dicha inactivación a los 2 min de tratamiento y que hubo escaso incremento de la inactivación en tiempos posteriores.

Observando los resultados de todos los tratamientos a las tres temperaturas aplicadas (56, 58 y 60°C), combinadas con acidificación (entre pH 5,5 y 4,5) y carvacrol emulsionado (entre 0,10 y 0,20 µL/mL), se evidenció que en todos los tratamientos combinados se logró una reducción superior al tratamiento individual de temperatura. Asimismo, el efecto individual de la acidificación y carvacrol emulsionado, fueron mínimos en todas las intensidades estudiadas (resultados de Etapa 1). Por lo tanto, el efecto de los tratamientos combinados fue mayor a la suma de los efectos de los tratamientos individuales. Se define un efecto aditivo, cuando los efectos combinados de dos o más agentes son iguales a la suma de los efectos individuales; y que un efecto es sinérgico, cuando el efecto es superior a la suma de sus efectos individuales (Ait-Ouazzou *et al.*, 2013). Por lo tanto, según se observó en las curvas de supervivencia, en todos los tratamientos combinados se logró un efecto sinérgico. Efectivamente se cumplieron los principios del concepto de métodos combinados, el cual está basado en una combinación de factores o técnicas de conservación de alimentos con un enfoque de ataque multiobjetivo. Esta mirada permitió emplear barreras en baja intensidad, que producen mínima alteración de las características del jugo, obteniendo un efecto sinérgico.

Una parte crucial en el uso de barreras es la alteración de la homeóstasis microbiana que mantiene la estabilidad interna de la célula bacteriana. Los factores de preservación perturban uno o más mecanismos de homeóstasis, para evitar la multiplicación celular, obligando a la célula a permanecer en una fase de latencia o provocar su muerte (Leistner,

2000). En el caso de las barreras utilizadas en esta investigación, la reducción de pH o acidificación con ácidos orgánicos, provoca que al atravesar la membrana y pasar al citoplasma los ácidos débiles se disocian generando una base conjugada lo que causa una alta acumulación de aniones, dado que no pueden retornar por la membrana (Hazan *et al.*, 2004). En relación a los antimicrobianos naturales, éstos son capaces de causar toxicidad en el citoplasma de los microorganismos, dado que ingresan por la membrana citoplasmática dañando la estructura de la misma y polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos, logrando provocar la lisis de la célula (Bakkali *et al.*, 2008). Generalmente la susceptibilidad de las bacterias a los aceites esenciales, se incrementa con el descenso del pH en los alimentos. En escenarios de bajo pH la hidrofobicidad de los aceites esenciales aumenta, por lo cual es más fácil disolver los lípidos en la membrana de las bacterias (Burt, 2004). En cuanto a los tratamientos térmicos, éstos tienen efectos más severos, pues actúan desnaturalizando proteínas y ADN de los microorganismos, como también provocando la lisis de la membrana lipídica (Madigan *et al.*, 2003).

Numerosos estudios que evidencian la posibilidad de tener un efecto sinérgico al combinar diferentes tecnologías de preservación de alimentos. Un ejemplo de éstos, es el caso de la investigación realizada por Abdenour *et al* (2013), en donde utilizaron carvacrol (1,3 mL) y tratamientos térmicos suaves (54°C y 60°C), para la inactivación de *E. coli* O157:H7 en jugo de mango, naranja, manzana y tomate. Estos autores evaluaron el tiempo necesario para reducir la población microbiana en 5 ciclos logarítmicos, ya sea en los tratamientos individuales de temperatura como en combinación con carvacrol. Dentro de sus resultados, se demostró que al utilizar el carvacrol combinado con temperatura, se redujo entre 3 a 6 veces el tiempo de aplicación en comparación con el tratamiento individual a 54°C y que, a 60°C, el tiempo para la combinación disminuyó entre 84% y 75% respecto del tratamiento individual en jugos de naranja, manzana, mango y tomate.

Aplicación del modelo de Weibull. La inactivación térmica de microorganismos tradicionalmente ha sido descrita según una cinética de primer orden, por lo cual generalmente los procesos de preservación de alimentos se guían bajo este concepto en donde se considera que la letalidad de la población microbiana es lineal. Sin embargo, muchas veces la reducción de los microorganismos se presenta de forma no lineal, lo cual cambia significativamente el tiempo de muerte dependiendo de la concavidad de la curva (hacia arriba o hacia abajo). La explicación de esta curvatura se atribuye a la existencia de una forma acumulativa que sigue una distribución temporal de eventos letales, lo cual quiere decir que cada organismo, de manera individual, muere o se inactiva a un tiempo específico, significando que algunos microorganismos mueren antes y otros después (Couvert *et al.*, 2005; Peleg y Cole, 1998). Algunos modelos matemáticos son capaces de describir la inactivación no lineal, como tal es el caso del modelo del Weibull. Este modelo, se ha utilizado en varios estudios tanto de tratamientos térmicos como no térmicos. Se basa en la hipótesis de que la resistencia al estrés de una población sigue una distribución de frecuencias de resistencias del tipo Weibull. Este modelo es capaz de describir tanto tendencias lineales, como cóncavas o convexas (Coroller *et al.*, 2006).

Por tales antecedentes, en el presente estudio se aplicó el modelo de Weibull para describir y cuantificar los datos experimentales obtenidos en cuanto a la inactivación de *Escherichia*

coli ante los tratamientos combinados en jugo de zanahoria inoculado. En base a este modelo, se obtuvieron los parámetros “*b*” y “*n*” (Cuadro 4), el primero representa el grado o la tasa de inactivación de la población microbiana, y el segundo está relacionado con la forma o tendencia de la curva de supervivencia, siendo $n < 1$: concavidad hacia arriba, $n = 0$: lineal y $n > 1$: concavidad hacia abajo. Estos parámetros al cuantificar la respuesta permitieron comparar los tratamientos entre sí y facilitar la selección de las combinaciones más efectivas.

El Cuadro 4 muestra los parámetros y el ajuste del modelo a los datos experimentales. Los valores del coeficiente de determinación ajustado (R^2 aj) estuvieron en el rango entre 93,4% y 99,5%, lo cual significa que el modelo logró un buen ajuste en todos los casos.

Cuadro 4. Parámetros del modelo de Weibull que describen la inactivación de *E. coli*, inoculado en jugo de zanahoria sometido a tratamientos combinados agrupados según la intensidad del tratamiento térmico.

Tratamiento	pH	Temperatura (°C)	Emulsión Carvacrol ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	<i>b</i>	<i>n</i>	R^2 adj
T2	4,5	56	0,15	0,27	0,99	99,2
T5	5,5	56	0,15	0,30	0,90	98,7
T6	5	56	0,10	0,55	0,65	97,0
T10	5	56	0,20	0,49	0,69	98,5
T3	5	58	0,15	1,05	0,77	97,6
T4	5,5	58	0,10	0,90	0,74	99,6
T7	4,5	58	0,20	1,33	0,80	98,6
T8	4,5	58	0,10	1,07	0,62	98,6
T12	5	58	0,15	1,04	0,84	96,8
T13	5,5	58	0,20	0,83	0,91	96,8
T15	5	58	0,15	1,09	0,77	96,8
T1	5,5	60	0,15	3,00	0,36	93,8
T9	5	60	0,20	2,81	0,38	96,3
T11	4,5	60	0,15	3,00	0,32	96,3
T14	5	60	0,10	3,29	0,25	94,6

Al hacer una comparación de los resultados del parámetro *b*, se observa que en aquellos tratamientos en los cuales se aplicó una temperatura de 56°C el más efectivo fue T6 (pH 5 – 0,10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ CA-E), ya que al presentar un $b = 0,55$, significa que la tasa de inactivación es mayor comparada con los otros tratamientos al mismo nivel de temperatura.

En el caso de los tratamientos sometidos a 58°C, T7 (pH 4,5 – 0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ CA-E) es aquel que presentó el mayor valor del parámetro *b* (1,33), y T13 (pH 5,5 – 0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ CA-E), junto con T4 (pH 5,5 – 0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ CA-E) resultaron los menores valores (0,83 y 0,90,

respectivamente). Se observó una tendencia más dominante del factor de acidificación al mostrar mejores resultados de inactivación de la bacteria en los tratamientos con pH 4,5. En el grupo de los tratamientos a los que se les aplicó una temperatura de 60°C, el que mostró una tasa más alta de inactivación fue T14 (pH 5,0 – 0,1 µL/mL CA-E), con un valor de b de 3,29.

Claramente la temperatura fue el factor dominante en los tratamientos combinados, ya que al comparar el parámetro b de todos los tratamientos se observan amplias diferencias entre los tratamientos de 56°C y 60°C. Todos los tratamientos presentaron $n < 1$, parámetro que evidencia la concavidad hacia arriba que se observa en las curvas de supervivencia. En general, el valor de b aumentó y el de n disminuyó a medida que aumentó la efectividad del tratamiento.

La figura 7 muestra el ajuste del modelo de Weibull a los datos experimentales, para cada grupo de curvas a cada temperatura. En las mismas se observa que el modelo ajustó adecuadamente a los puntos experimentales. Asimismo, quedó en evidencia el efecto del parámetro de forma, con valores $n < 1$ que implican curvas con concavidad hacia arriba, sin hombro y con cola.

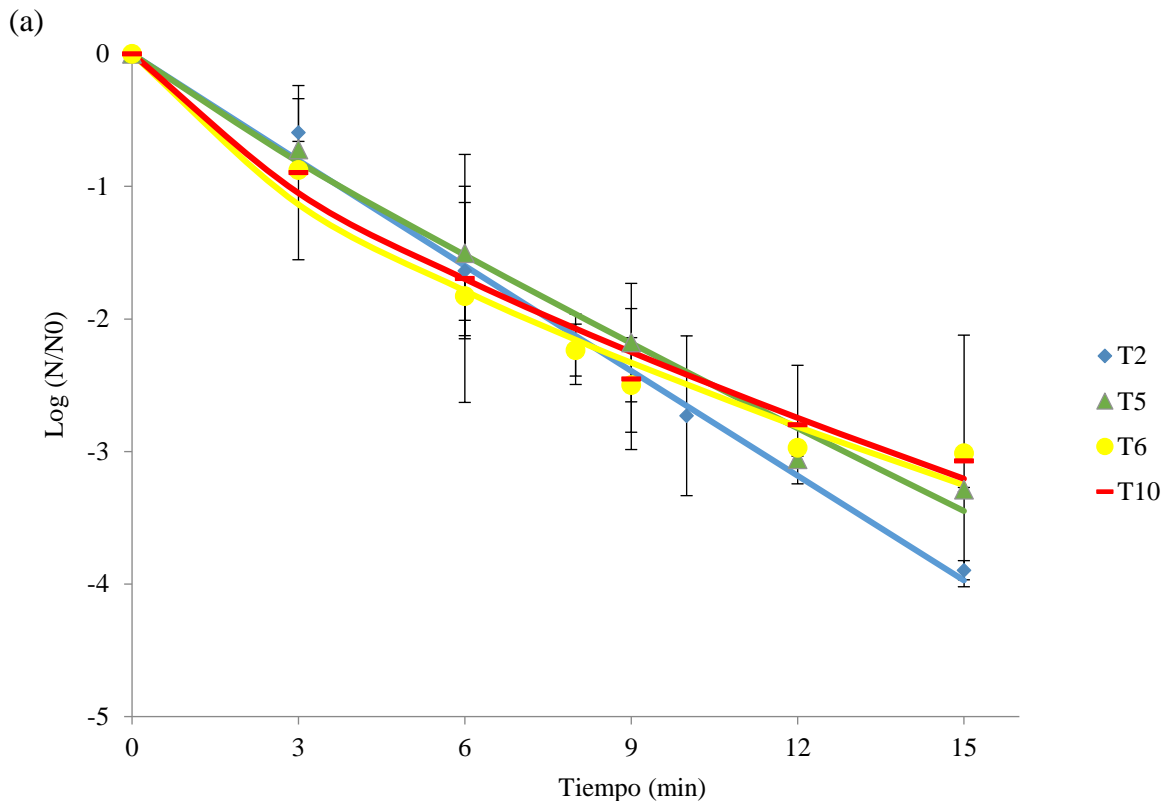
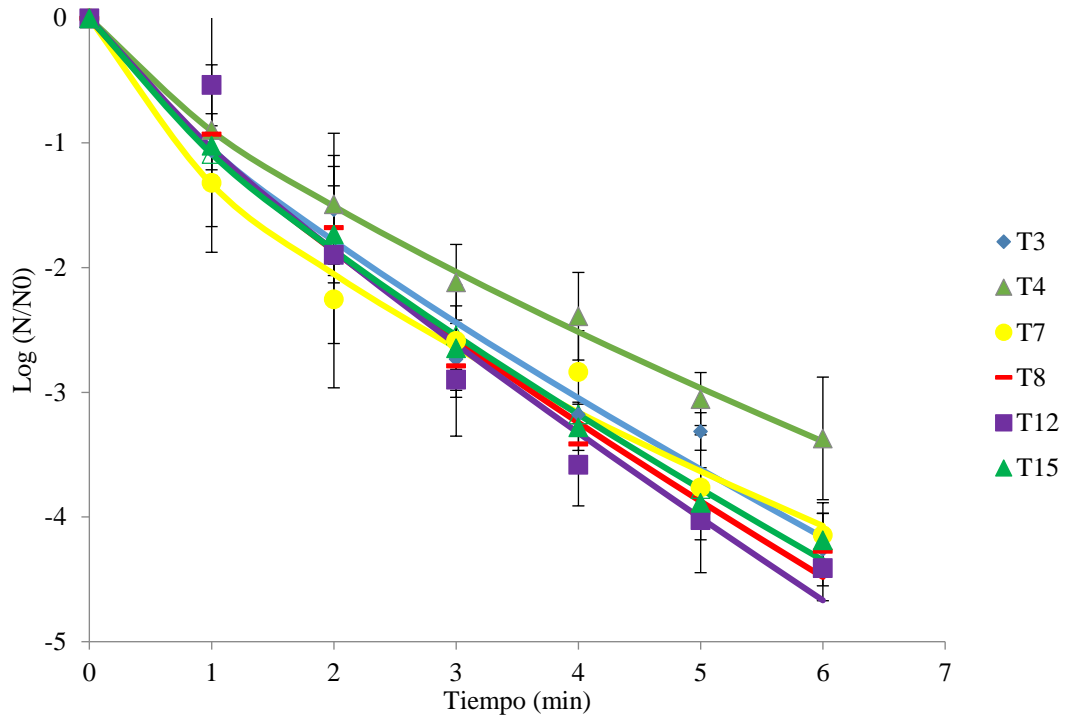


Figura 7. Ajuste del modelo de Weibull a los datos experimentales de *E. coli* ATCC 35.218 ante la aplicación de los tratamientos combinados (acidificación, tratamientos térmicos suaves y carvacrol emulsionado) en jugo de zanahoria inoculado. (a) 56°C; (b) 58°C; (c) 60°C. Datos experimentales (puntos), ajuste del modelo de Weibull (líneas). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias ($n=3$).

(b)



(c)

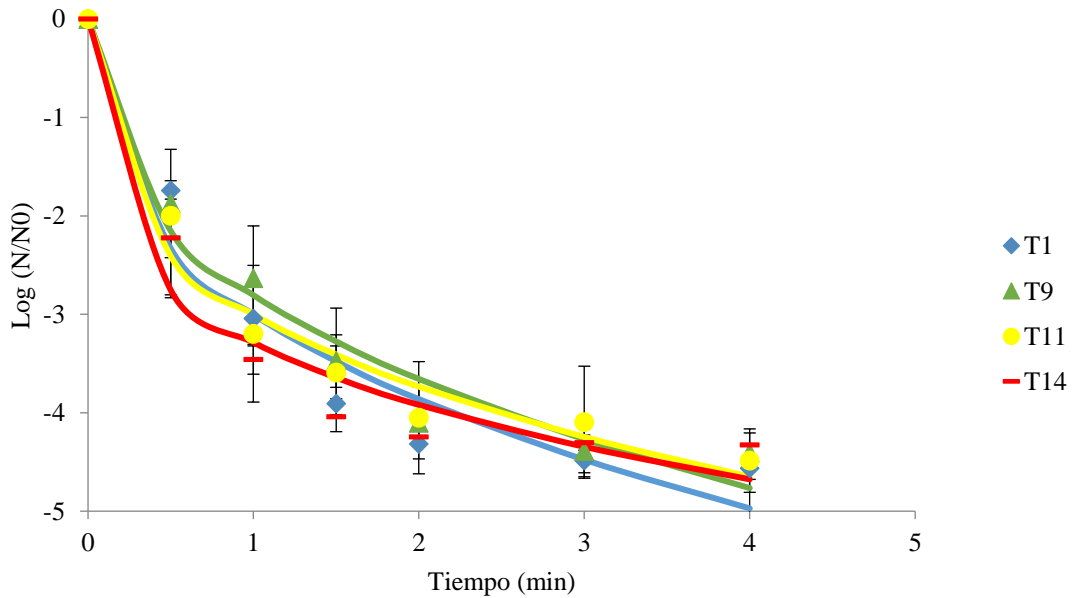
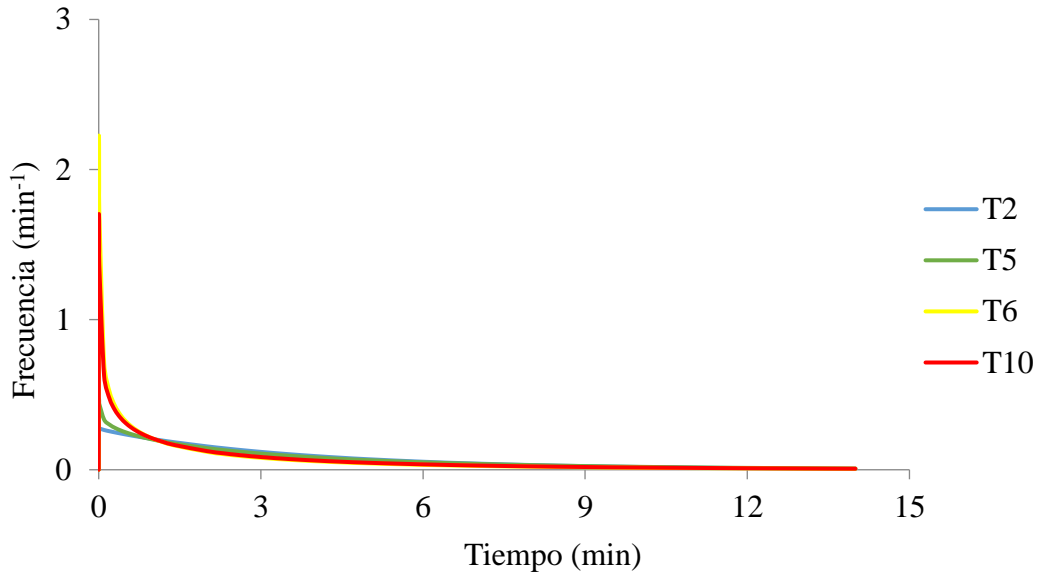


Figura 7. (continuación) Ajuste del modelo de Weibull a los datos experimentales de *E. coli* ATCC 35.218 ante la aplicación de los tratamientos combinados (acidificación, tratamientos térmicos suaves y carvacrol emulsionado) en jugo de zanahoria inoculado. (a) 56°C; (b) 58°C; (c) 60°C. Datos experimentales (puntos), ajuste del modelo de Weibull (líneas). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias ($n=3$).

A partir de los parámetros b y n se generaron las distribuciones de frecuencia de resistencia (Figura 8) y se calcularon los estadísticos asociados: moda, varianza, media y coeficiente de sesgo (Cuadro 5).

(a)



(b)

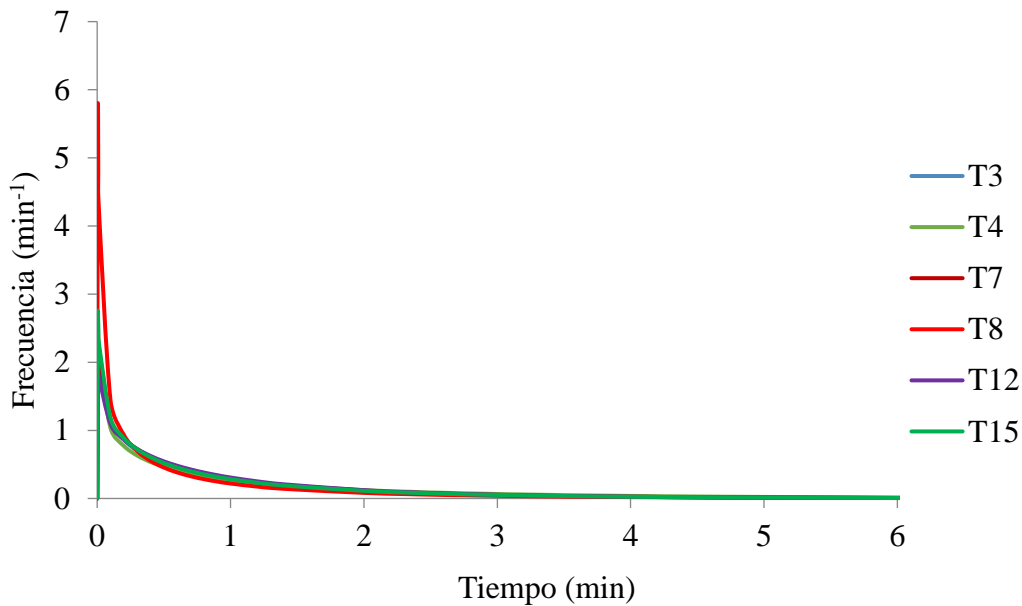


Figura 8. Distribuciones de frecuencias de resistencias de *E. coli* inoculado en jugos de zanahoria sometidos a los tratamientos combinados a 56°C (a), 58°C (b) y 60 °C (c).

(c)

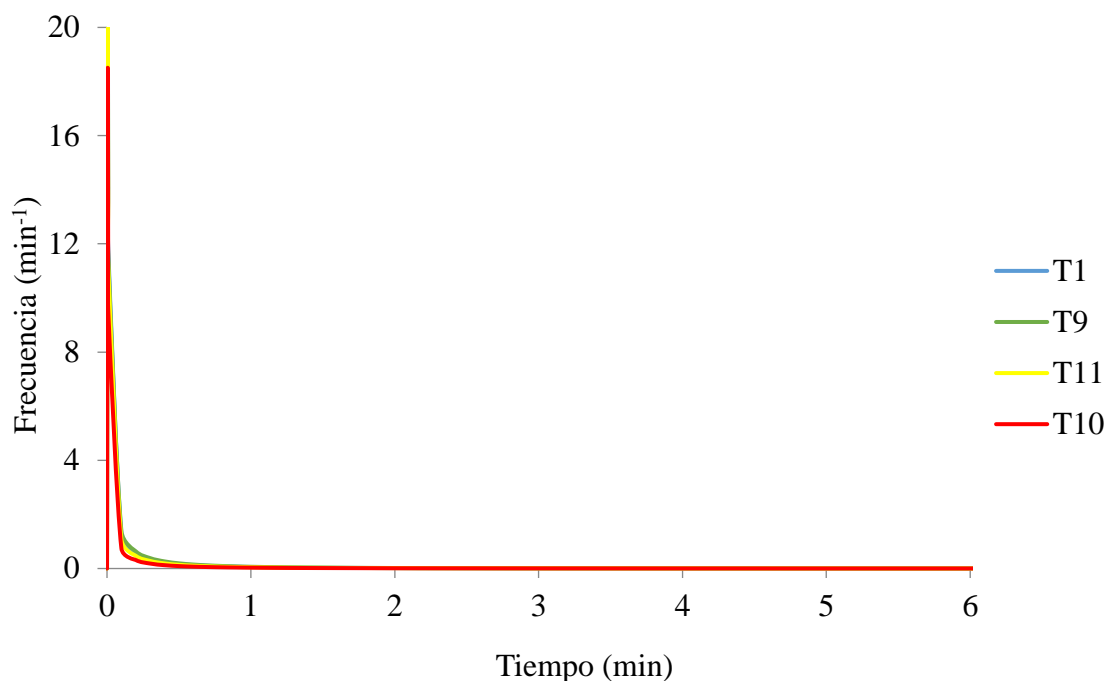


Figura 8 (Continuación). Distribuciones de frecuencias de resistencias de *E. coli* inoculado en jugos de zanahoria sometidos a los tratamientos combinados a 56°C (a), 58°C (b) y 60 °C (c).

Cuadro 5. Parámetros asociados a la aplicación del Modelo de Weibull

Tratamiento	pH	Temperatura (°C)	Emulsión Carvacrol (μL/mL)	Moda (t_{cm})	Media (t_c)	Varianza (σ_{tc}^2)	Coefficiente de sesgo (v_1)
T2	4,5	56	0,15	0,03	3,75	14,27	2,14
T5	5,5	56	0,15	0,34	3,97	19,74	2,39
T6	5	56	0,1	0,93	3,35	28,15	3,67
T10	5	56	0,2	0,86	3,57	27,88	3,35
T3	5	58	0,15	0,20	1,10	2,08	2,88
T4	5,5	58	0,1	0,28	1,38	3,62	3,05
T7	4,5	58	0,2	0,16	1,04	1,73	2,75
T8	4,5	58	0,1	0,28	0,91	2,30	3,98
T12	5	58	0,15	0,14	1,05	1,58	2,59
T13	5,5	58	0,2	0,10	1,29	2,04	2,35
T15	5	58	0,15	0,18	1,04	1,86	2,87
T1	5,5	60	0,15	0,23	0,22	0,63	14,06
T9	5	60	0,2	0,24	0,25	0,75	12,18
T11	4,5	60	0,15	0,36	0,23	1,23	22,60
T14	5	60	0,1	0,64	0,20	2,55	54,38

Los resultados de las curvas de distribución de frecuencias muestran que la inactivación de *Escherichia coli* ante todas las combinaciones de tratamientos térmicos, CA-E y acidificación aplicadas en jugo de zanahoria inoculado, tienen un sesgo hacia la derecha, lo cual concuerda con los valores del coeficiente de sesgo (Cuadro 5). Este coeficiente aumentó a medida que aumentó la intensidad del tratamiento, debido a que la sensibilidad de la bacteria fue mayor, necesitando menor tiempo de exposición al tratamiento para lograr su inactivación. Los valores de la moda indican que la población se inactivó rápidamente, dejando atrás una poca fracción de sobrevivientes más resistentes. En cuanto a las medias, oscilan entre 0,2 y 3,97, disminuyendo a medida que aumentó la severidad del tratamiento térmico. Las varianzas se redujeron a medida que incrementó la temperatura de los tratamientos, sugiriendo que hubo mayor homogeneidad en la respuesta de la población microbiana frente al efecto inhibitorio de los tratamientos combinados.

El comportamiento observado en este trabajo concuerda con un estudio realizado en jugo de naranja inoculado con *Listeria innocua* sometido a tratamientos térmicos (57 a 61 °C) combinados con el antimicrobiano natural vainillina (500 a 1000 ppm), donde a mayor intensidad de los tratamientos se obtuvieron mayores valores de b , presentando valores de $n < 1$ para las combinaciones más severas (Char *et al.*, 2009). Una tendencia similar se reportó cuando se evaluó carvacrol emulsionado en dosis de 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 1,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 1,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ante *E. coli* y *L. plantarum*. En ambos microorganismos se observó que el grado de inactivación aumentó al incrementar la dosis del antimicrobiano, obteniéndose valores de b entre 0,10 a 3,09 para *E. coli* y entre 0,06 y 2,31 para *L. plantarum*, demostrando mayor sensibilidad de *E. coli* frente al carvacrol emulsionado.

Etapas 3. Selección de los mejores tratamientos, evaluación sensorial, estabilidad física, química y microbiológica.

Selección de los mejores tratamientos. Se seleccionaron dos tratamientos según su efectividad en relación a la inactivación de *Escherichia coli*. Para tal objetivo se utilizó el parámetro b obtenido a través de la aplicación del modelo de Weibull con el fin de escoger aquellos tratamientos que tenga la mejor tasa de efectividad (Cuadro 6). También se consideró aquellos tratamientos que presumiblemente tuvieran una menor afectación de las características organolépticas del jugo de zanahoria. En este sentido, se seleccionaron para esta etapa los tratamientos T7 (pH 4,5 – 58°C – 0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$) aplicado por 8 minutos y T14 (pH 5,0 – 60°C – 0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$) por 4 minutos. El tiempo de aplicación se determinó en base a los resultados de la etapa 2 y por pruebas previas, con el objetivo de alcanzar 5 reducciones logarítmicas.

Cuadro 6. Tratamientos combinados seleccionados para evaluación sensorial, estabilidad física, química y microbiológica.

Tratamiento	pH	Temperatura (°C)	Emulsión Carvacrol (μL/mL)	<i>b</i>
T7	4,5	58	0,2	1,33
T14	5,0	60	0,1	3,29

Evaluación sensorial. Se realizó una evaluación sensorial a los dos tratamientos seleccionados, T7 y T14, utilizando el método descriptivo cuantitativo (QDA). Los atributos que se consideraron se seleccionaron por medio de un *focus group* de 7 evaluadores y correspondieron a “intensidad de color”, “aroma a zanahoria”, “aroma herbáceo”, “acidez”, “persistencia”, “sabor a zanahoria” y “sabor herbáceo”. El QDA se efectuó con un panel 12 jueces entrenados utilizando una escala no estructurada de 15 cm, sobre la cual indicaron la intensidad percibida de cada atributo (Anexo II). Los resultados obtenidos al realizar la evaluación sensorial, se muestran en el Anexo VI (Cuadro 16). Se destacó una alta intensidad de color percibido (T7: 11,86 y T14: 11,46). En cuanto a los atributos asociados a nariz, el aroma a zanahoria y aroma herbáceo obtuvieron resultados dentro de un rango de 7,10 a 7,89. En boca destacó una alta persistencia (T7: 9,21 y T14: 9,07) y en relación al sabor a zanahoria y herbáceo los resultados fueron desde 6,69 a 9,39, lo cual puede estar relacionado con la percepción del carvacrol. Por otro lado, la acidez fue bien tolerada, con valores T7: 4,26 y T14: 2,34; sin embargo, los evaluadores percibieron la diferencia de pH de las muestras. Estos resultados denotan que los jugos de zanahoria tratados se describieron con una marcada intensidad de color, como también aroma y sabor a zanahoria; sin embargo, también se logró percibir la presencia del carvacrol mediante el descriptor sabor herbáceo. Gráficamente la descripción de los jugos de zanahoria tratados en base a los atributos descritos se muestra en la Figura 9.

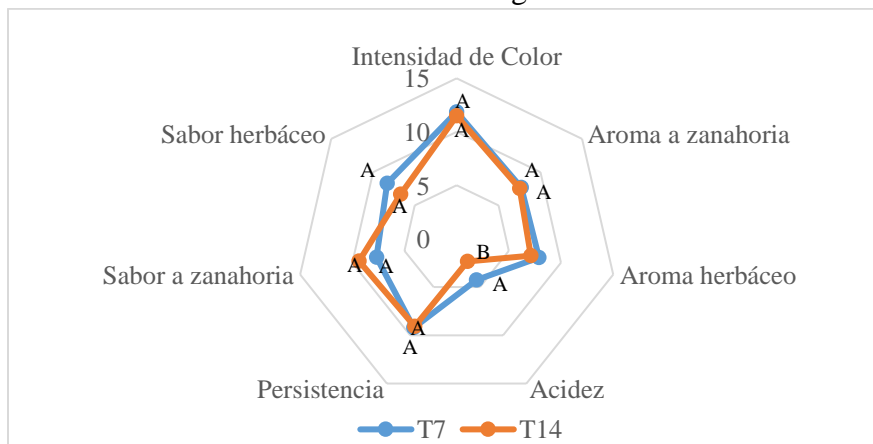


Figura 9. Evaluación de los atributos sensoriales de los jugos de zanahoria, sometidos a los tratamientos seleccionados T7 y T14. Letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, según el test de Tuckey a un nivel de significancia de 5%. (n =14).

Se aplicó un análisis de varianza con la finalidad de identificar diferencias significativas entre los tratamientos para cada uno de los atributos evaluados. Se utilizó la prueba de Tukey para encontrar diferencias significativas con un nivel de significancia de un 5%. Sólo se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos para acidez (Anexo VI). Para los otros atributos no se percibieron diferencias significativas entre T7 y T14.

Los resultados obtenidos se explican por el hecho de que los tratamientos combinados que fueron seleccionados tienen concentraciones bajas de carvacrol, que fueron percibidas como similares, y temperaturas de tratamiento moderadas que no afectaron significativamente las características organolépticas de los jugos tratados T7 (pH 4,5 – 58°C – 0,2 µL/mL CA-E) y T14 (pH 5,0 – 60°C – 0,1 µL/mL CA-E). Excepción a esto es el caso del pH, en donde sí fue percibido como significativamente diferente por los panelistas.

Picouet *et al.* (2015), evaluaron el efecto de la aplicación de tratamientos térmicos y de altas presiones en jugo de zanahoria acidificados y no acidificados, para determinar cambios en el contenido de carotenos, seguridad microbiológica y las propiedades sensoriales. Dentro de la evaluación sensorial realizaron un análisis descriptivo cuantitativo, en donde los atributos a considerar fueron “color naranja”, “aroma a zanahoria”, “acidez”, “dulzor” y “persistencia”, tales parámetros son similares a los utilizados para evaluar los tratamientos de este estudio. Los autores reportaron que aquellos jugos acidificados presentaron una mayor intensidad de color naranja, al igual que de los atributos “persistencia” y “aroma a zanahoria”. También en este estudio se destacó que, al aplicar tratamientos térmicos y acidificación a jugo de zanahoria, se observó un aumento de la “intensidad de color” respecto del control sin tratar.

Estudio de estabilidad microbiológica. A un jugo de zanahoria sin tratar (control) y a los tratamientos seleccionados: T7 (pH 4,5 – 58°C – 0,2 µL/mL CA-E) y T14 (pH 5,0 – 60°C – 0,1 µL/mL CA-E), se les realizó un estudio de estabilidad microbiológica durante 21 días de almacenamiento refrigerado (4°C). Las evaluaciones microbiológicas que se escogieron fueron de acuerdo a las exigidas por el MINSAL (Anexo 2), junto con otros microorganismos relevantes para este tipo de alimento.

La aplicación de los tratamientos seleccionados disminuyó la velocidad de desarrollo de la población de microorganismos aerobios mesófilos (RAM), tanto el tratamiento T7 como T14 mostraron diferencias significativas con el crecimiento de la microflora microbiana del jugo control a medida que transcurrieron los días de almacenamiento (Figura 10). El nivel alcanzado de estos microorganismos fue muy inferior a $\approx 10^5$, límite exigido por el Reglamento Sanitario de los Alimentos en referencia a jugos no pasteurizados (MINSAL, 2014). Al día 21 de almacenamiento, T7 presentó un recuento de $5,6 \times 10^3$ UFC/mL, y T14 de 2,1 UFC/mL, valores aún inferiores a los que se exigen por norma (Anexo VII, Cuadro 17). En cambio, el tratamiento control, al día 7 de almacenamiento tuvo recuentos de $1,7 \times 10^5$ UFC/mL, lo cual indica que ya desde ese día un jugo sin tratar se considera no apto para consumo humano.

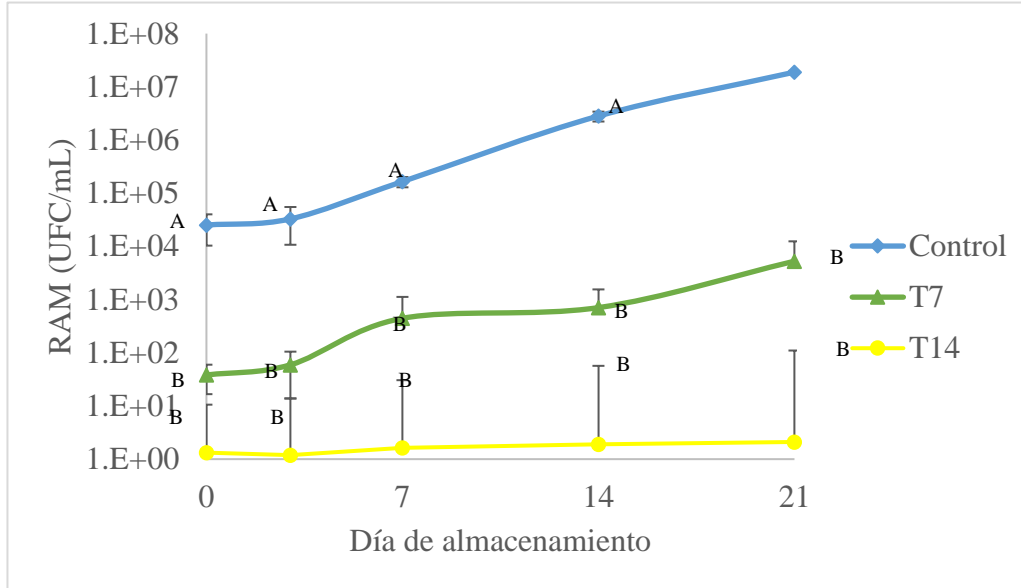


Figura 10. Recuento de Aerobios Mesófilos (RAM) de jugos de zanahoria almacenados a 4°C. Barras verticales indican desviación estándar de las medias. Letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, según el test de Tuckey a un nivel de significancia de 5%. (n = 3).

En la Figura 11, se muestran los recuentos de las poblaciones de enterobacterias sobrevivientes, en jugos tratados (T7 y T14) y en jugo sin tratar (Control). Los jugos tratados T7 y T14 presentaron niveles indetectables en toda la duración del estudio en almacenamiento. Por otro lado, el control inició con una población de $3,7 \times 10^3$ UFC/mL y alcanzó $1,9 \times 10^6$ UFC/mL a los 21 días de almacenamiento (Anexo VII).

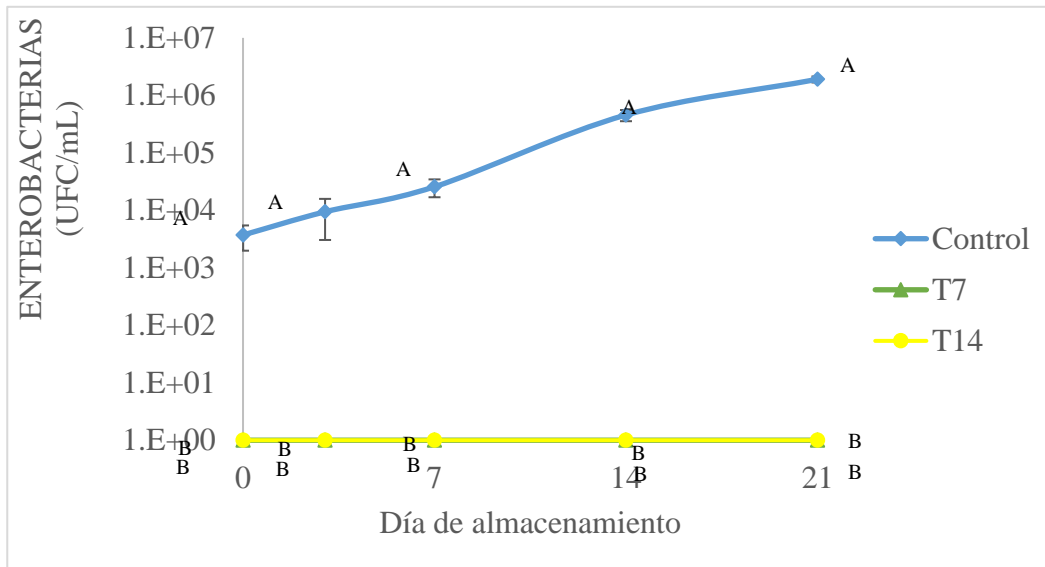


Figura 11. Recuento de Enterobacterias de jugos de zanahoria almacenados a 4°C. Barras verticales indican desviación estándar de las medias. Letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, según el test de Tuckey a un nivel de significancia de 5%. (n = 3).

En el caso de *Lactobacillus sp.*, ambos tratamientos seleccionados fueron efectivos para la inactivación de este tipo de bacterias, mostrando recuentos indetectables durante los 21 días de almacenamiento (Anexo VII). El control alcanzó una población de $7,8 \times 10^4$ UFC/mL al término del almacenamiento (Figura 12).

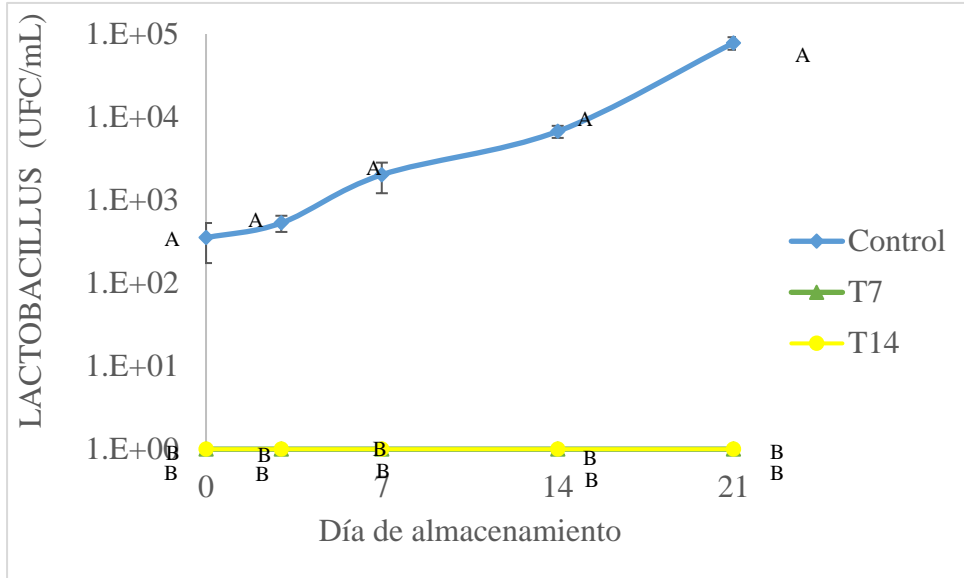


Figura 12. Recuento de *Lactobacillus sp* de jugos de zanahoria almacenados a 4°C. Barras verticales indican desviación estándar de las medias. Letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, según el test de Tuckey a un nivel de significancia de 5%. (n = 3).

Los hongos y levaduras resultaron indetectables para el jugo tratado con T14 y el T7 llegó a una población de $2,1 \times 10^1$ UFC/mL al día 21 (Figura 13, Anexo VII). Por el contrario, el control partió con cierta carga inicial que aumentó a $6,3 \times 10^3$ UFC/mL, el último día de medición.

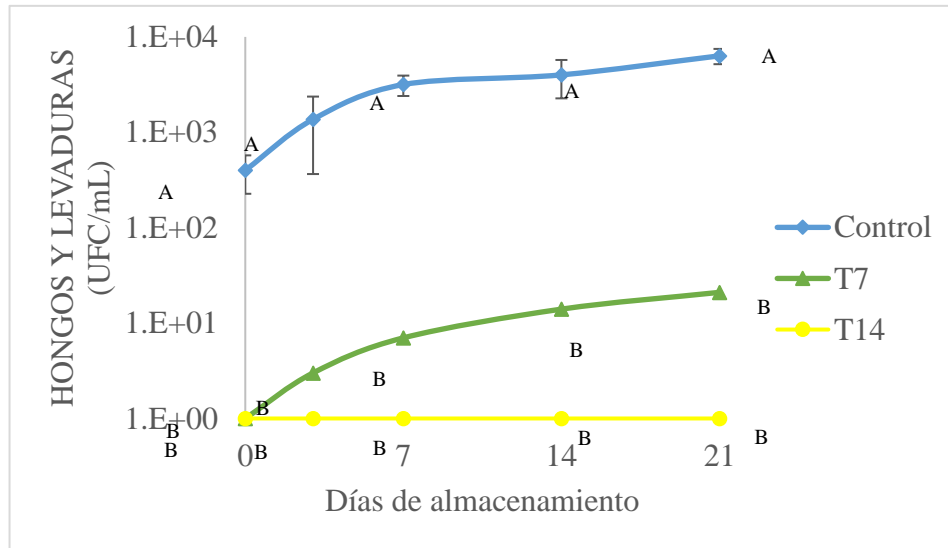


Figura 13. Recuento de Hongos y Levaduras de jugos de zanahoria almacenados a 4°C. Barras verticales indican desviación estándar de las medias. Letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, según el test de Tuckey a un nivel de significancia de 5%. (n = 3).

Por otro lado, se determinó ausencia de *E. coli* durante todo el periodo de evaluación.

El jugo de zanahoria, dado a su baja acidez, es susceptible al desarrollo de microorganismos, limitando notoriamente su tiempo de almacenamiento al no aplicar algún tratamiento de control (Aguiló-Aguayo *et al.*, 2014; Martínez - Flores *et al.*, 2015). El jugo sin tratar de este estudio alcanzó niveles de RAM $\approx 10^5$ UFC/mL, al día 7 de almacenamiento, tornándose no apto para el consumo. Otros estudios de jugo de zanahoria almacenados a 4°C reportan que a los 10 días sin recibir ningún tipo de tratamiento alcanza un crecimiento de la población de aerobios mesófilos superior a 10^5 UFC/mL. También se señala que el crecimiento de enterobacterias aumento en 5,05 log UFC/mL a los 10 días, y en cuanto a hongos y levaduras a los 16 días aumenta en 6,91 log UFC/mL (Martínez-Flores *et al.*, 2015).

Picouet *et al.*, 2015 estudió la efectividad de los tratamientos aplicados para controlar la microflora natural de jugo de zanahoria. Evaluaron una combinación de tratamientos térmicos con acidificación, en donde se aplicó un tratamiento térmico de 80°C por 7 minutos y se redujo el pH a 5,5 en jugo de zanahoria almacenado a 5°C por 29 días. Estos tratamientos lograron mantener bajos los niveles de RAM, hongos y levaduras, no superando a 1,2 y 0,2 log UFC/mL, respectivamente. Según los resultados obtenidos los jugos tratados con una combinación de acidificación, tratamientos térmicos suaves y carvacrol emulsionado, lograron mantener la estabilidad microbiológica hasta el día 21 almacenamiento a 4°C, por lo cual los tratamientos seleccionados son una alternativa para obtener un producto inocuo por tal periodo.

Estudio de estabilidad química y física. Se realizaron estudios de acidez titulable, sólidos solubles y color, para evaluar el impacto de la aplicación de los tratamientos seleccionados sobre los parámetros de calidad en el jugo de zanahoria.

Acidez titulable. Los resultados de la evaluación de acidez titulable en el transcurso del periodo de almacenamiento se presentan como porcentaje de ácido cítrico anhídrido en el Cuadro 7. Se evidenció que los jugos tratados (T7 y T14), se mantuvieron estables los 21 días de almacenamiento a 4°C. En el caso de T7 el rango fue de 0,335 a 0,458%, y T14 desde 0,184 a 0,199%, sin mostrar diferencias significativas en ambos casos. El control osciló en un rango de 0,076 a 0,355%, siendo desde el día 14 significativamente el aumento de acidez.

Cuadro 7. Resultados de acidez titulable de jugos de zanahoria en almacenamiento a 4°C.

Día de almacenamiento	Acidez Titulable		
	Control	T7	T14
0	0,076 ± 0,012 ^A	0,344 ± 0,078 ^A	0,197 ± 0,015 ^A
3	0,081 ± 0,02 ^A	0,335 ± 0,062 ^A	0,184 ± 0,04 ^A
7	0,084 ± 0,011 ^A	0,436 ± 0,031 ^A	0,194 ± 0,019 ^A
14	0,191 ± 0,076 ^B	0,456 ± 0,025 ^A	0,196 ± 0,021 ^A
21	0,355 ± 0,082 ^C	0,458 ± 0,018 ^A	0,199 ± 0,016 ^A

Datos expresados en % de ácido cítrico anhidrido. Letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en un mismo tiempo, según test de Tuckey con un 5% de significancia (n = 3).

El aumento de acidez titulable en el jugo control se debió a que los microorganismos usan el azúcar como nutriente dando como resultado del proceso la producción de ácidos orgánicos (Rivas *et al.*, 2006). Jugos tratados con ultrasonido y temperaturas medias (50°C, 54°C y 58°C) y mantenidos en almacenamiento a 4°C, reportaron un aumento en la acidez titulable de 0,3 a 0,81% en aquellos calentados a 50°C a los 14 días, aquellos tratados a 54°C alcanzaron el máximo a los 14 días y jugos calentados a 58°C mostraron diferencias recién a los 20 días de almacenamiento (Martínez-Flores *et al.*, 2015). En general, tal como se obtuvieron los resultados con los tratamientos T7 y T14, la acidez titulable no varía mucho ya que al poder controlar los microorganismos se previene que esta disminuya en el tiempo. Chia *et al.*, (2012), trataron jugos de piña con tratamientos térmicos, obteniendo resultados en 13 semanas de almacenamiento en donde la acidez titulable no fue afectada en todo este periodo.

Sólidos Solubles. Los resultados de la evaluación de los cambios en la concentración de sólidos solubles, expresados en °Brix, en el tiempo se presentan en el Cuadro 8. Se observa que en los jugos tratados (T7 y T14), tanto como en el control, no se evidenciaron diferencias significativas en este parámetro al pasar los días de almacenamiento a 4°C.

Cuadro 8. Resultados de sólidos solubles de jugos de zanahoria en almacenamiento a 4°C.

Día de almacenamiento	Sólidos Solubles (°Brix)		
	Control	T7	T14
0	10,5 ± 0,4 ^{Aa}	9,7 ± 0,2 ^{Aa}	10,1 ± 0,7 ^{Aa}
3	,9,2 ± 0,2 ^{Aa}	9,4 ± 0,1 ^{Aa}	9,2 ± 0,5 ^{Aa}
7	9,7 ± 0,1 ^{Aa}	10,1 ± 0,3 ^{Aa}	9,5 ± 0,6 ^{Aa}
14	9,1 ± 0,1 ^{Aa}	9,3 ± 0,2 ^{Aa}	9,7 ± 0,2 ^{Aa}
21	9,4 ± 0,3 ^{Aa}	9,2 ± 0,4 ^{Aa}	10,3 ± 0,4 ^{Aa}

Letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en un mismo tiempo. Letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas en el tiempo para un mismo tratamiento, según test de Tuckey con un 5% de significancia (n = 3).

La evaluación de sólidos solubles generalmente es utilizada como parámetro de calidad en jugos. Al igual que en el presente estudio, jugos de zanahoria tratados con altas presiones y altas temperaturas mostraron resultados sin diferencias significativas en cuanto a mediciones de sólidos solubles por 21 días de almacenamiento a 4°C (Zhang *et al.*, 2016). Yu y Vasantha (2012), reportaron que tratamientos a 90°C por 2 min, junto con una acidificación (pH 4,37), no evidenciaron cambios significativos en este parámetro de calidad por el mismo periodo de evaluación que el presente estudio.

Color. Para el análisis de color se utilizaron las mediciones realizadas en el espacio CIE $L^*a^*b^*$ y CIE $L^*C^*h^*$, obteniéndose los parámetros luminosidad (L^*), eje rojo-verde (a^*), eje amarillo-azul (b^*), croma (C^*) y ángulo de tono (h^*). Los resultados se muestran en el Anexo VIII. El parámetro de luminosidad (Figura 14a) no mostró variaciones durante todo el período de almacenamiento para el caso de los dos tratamientos como también para el control. En el caso de a^* (Figura 14b), no se vio afectado por la aplicación de los tratamientos T7 y T14 durante los 21 días, manteniendo su estabilidad. Se observa un leve aumento del parámetro asociado al eje rojo-verde en los tratamientos tratados, pero éste no resultó significativo.

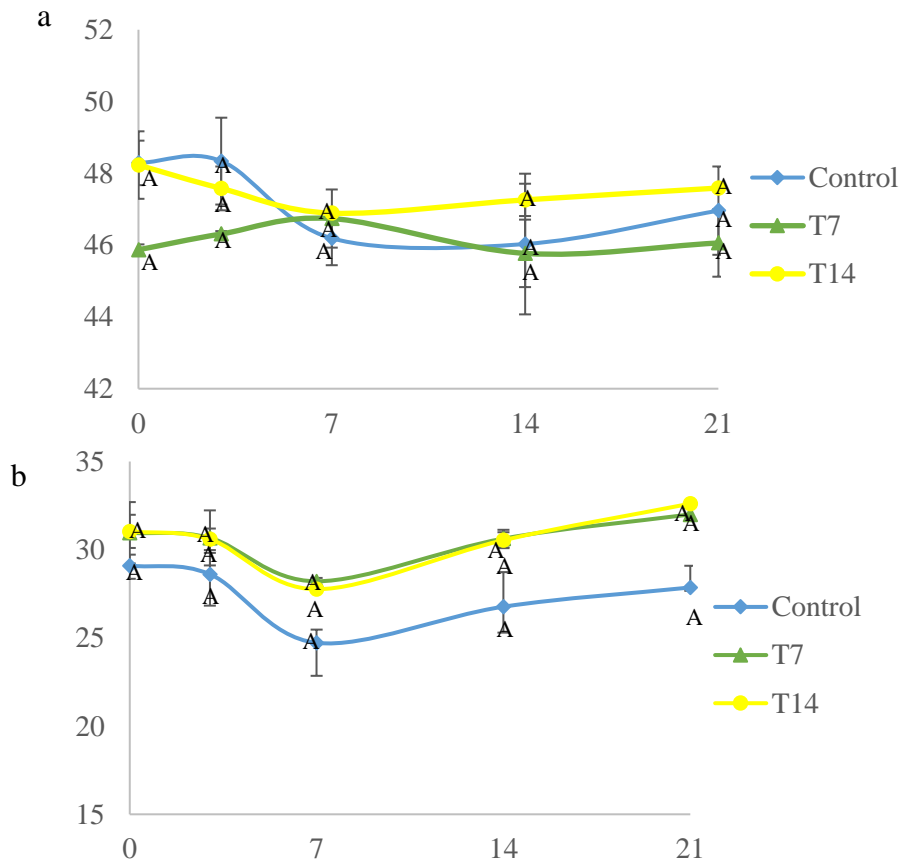


Figura 14. Resultados de parámetros de color en jugos de zanahoria sometidos a T7, T14 y jugo sin tratar (control), almacenados a 4°C por 21 días: (a) L^* , (b) a^* , (c) b^* , (d) C^* y (e) h^* . Barras verticales indican desviación estándar de las medias, $n = 3$. Letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para un mismo tiempo, según el test de Tuckey a un nivel de significancia de 5%.

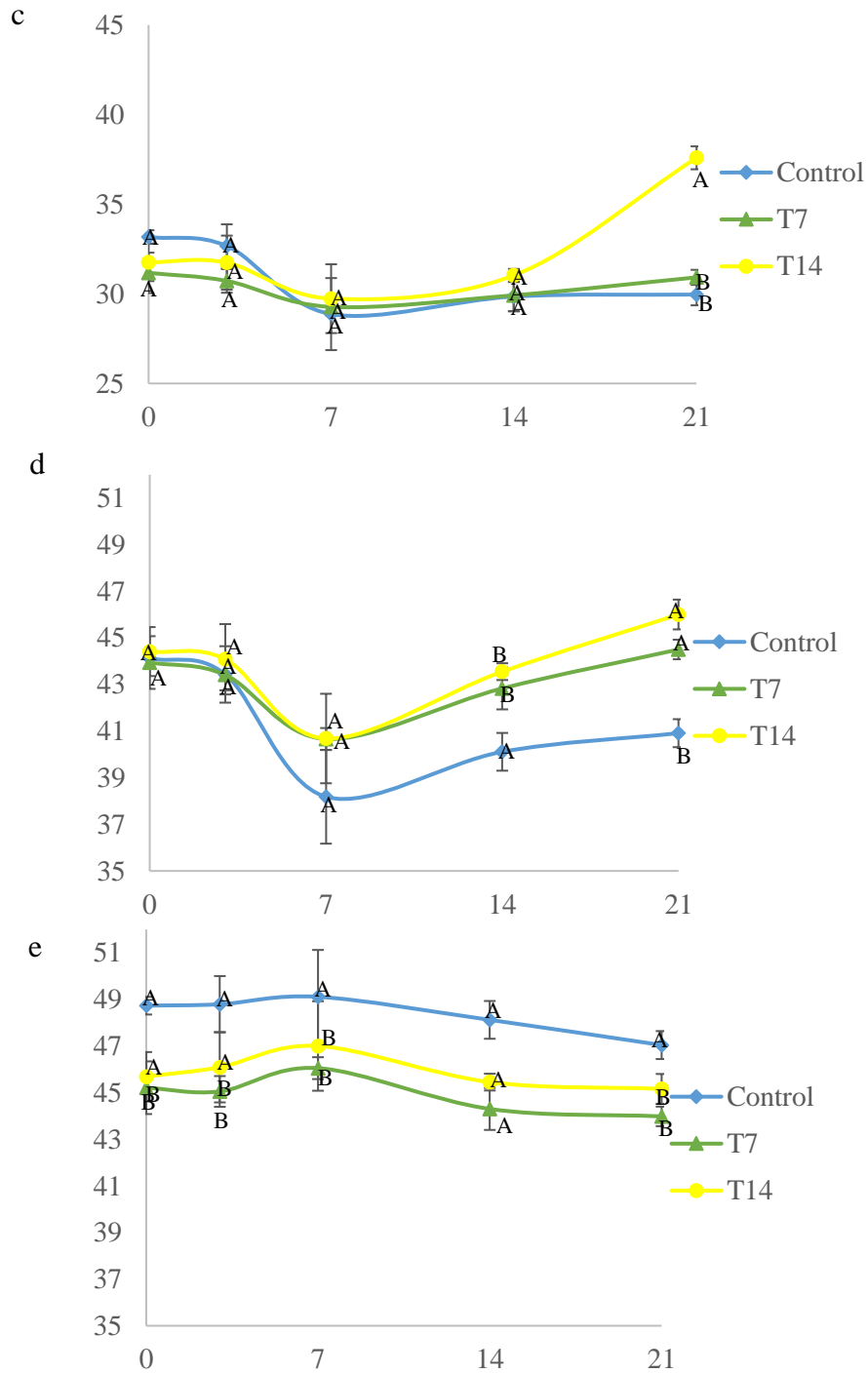


Figura 14 (Continuación). Resultados de parámetros de color en jugos de zanahoria sometidos a T7, T14 y jugo sin tratar (control), almacenados a 4°C por 21 días. L* (a)^oC, a* (b), b*(c), C* (d) y h* (e). Barras verticales indican desviación estándar de las medias, n = 3. Letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos un mismo tiempo, según el test de Tuckey a un nivel de significancia de 5%.

Se evidenció diferencia entre los tratamientos en el parámetro b^* (Figura 14c) del jugo a los 14 días en el tratamiento T14. En cuanto al croma (Figura 14d), este presentó diferencias significativas comparando el control con los tratamientos al día 14 de almacenamiento. En la Figura 14e, se ve de manera gráfica el comportamiento del parámetro h^* durante el transcurso del periodo de evaluación, mostrando que existieron diferencias significativas entre el control y los jugos tratados (T7 y T14), desde el día 3 de refrigeración.

El color es una característica importante en alimentos y en jugo de zanahoria por lo general se ve afectado por tratamientos de pasteurización lo cual está relacionado con la pérdida de carotenoides. La luteína y α y β -carotenos se degradan al someter un jugo de zanahoria acidificado a un pH de 4,0 y pasteurizado a 105°C por 30 s. También se señala que esta degradación aumenta a medida que se alarga el tiempo de almacenamiento y la temperatura a la cual se mantiene (Chen *et al.*, 1996). Esto puede explicar la disminución en el contenido de los carotenos y los cambios en los parámetros b^* , C^* y h^* en los últimos días de evaluación.

Conclusiones

- La inhibición de *Escherichia coli* por parte de los tratamientos individuales de acidificación y carvacrol emulsionado no fue suficiente para alcanzar 5,0 ciclos de reducciones logarítmicas de la población microbiana, incluso luego de horas de tratamiento. La aplicación de tratamientos térmicos suaves fue más efectiva; sin embargo, tampoco se alcanzó el nivel requerido.
- El uso de tratamientos combinados es una opción que permite generar una mayor reducción de microorganismos, utilizando intensidades menores que las utilizadas por los tratamientos tradicionales de preservación de alimentos. La combinación de los diferentes métodos empleados en el presente estudio permitió que actuaran como múltiples barreras y se produjera un efecto sinérgico, frente a los microorganismos, ya que se lograron reducciones mayores al combinarlos que en el caso de su aplicación de forma individual.
- Se lograron obtener diferencias superiores a 1 ciclo logarítmico al comparar los tratamientos térmicos individuales (ya que es el tratamiento individual más intenso comparado con los tratamientos de acidificación y la aplicación de carvacrol emulsionado) con los tratamientos combinados.
- La aplicación del modelo de Weibull tuvo un alto nivel de ajuste, obteniendo un coeficiente de determinación ajustado (R^2 aj) entre 93,4% y 99,5%, por lo cual resultó efectivo para evaluar el comportamiento de la población de *E. coli*. En base al parámetro b obtenido con este modelo, se seleccionaron dos tratamientos T7 (58 °C - CA-E 0,20 μ L/mL - pH 4,5) y T14 (60 °C - CA-E 0,10 μ L/mL - pH 5,0), con valores de b de 1,33 y 3,29, respectivamente.
- La evaluación sensorial de los tratamientos seleccionados evidenció que la aplicación de estas tecnologías a las intensidades escogidas para este estudio, no afectaron la calidad organoléptica del jugo, ya que no se encontraron diferencias significativas en todos los atributos evaluados, a excepción de la acidez, lo cual concuerda con la acidificación aplicada.
- En el estudio en almacenamiento se evaluó la estabilidad microbiológica tanto de jugos tratados con los tratamientos seleccionados como un control que correspondió a jugo sin tratar. Los resultados indicaron que ambos tratamientos fueron efectivos para el control de la microflora natural de los jugos, lográndose mantener un jugo apto para el consumo por lo menos 21 días a 4°C.
- La acidez titulable y los sólidos solubles no fueron afectados al aplicar los tratamientos, ya que los resultados mostraron estabilidad a través de los días. En menor medida, se observó una disminución en el parámetro de color ángulo de tono (h^*).
- En base a estos resultados se puede concluir que se cumplió con la hipótesis planteada, dado que la combinación de tratamientos permitió obtener jugos inocuos logrando también mantener los parámetros de calidad. El uso de las combinaciones de tecnologías de preservación de alimentos es una alternativa para obtener jugos de hortalizas inocuos, dado su riesgo por la baja acidez, manteniendo las características de calidad al ser de menor impacto e intensidad que los tratamientos convencionales.

Literatura Citada

Ait-Ouazzou, A; L. Espina; D. García-Gonzalo y R. Pagán. 2013, jul. Synergistic combination of physical treatments and carvacrol for *Escherichia coli* O157:H7 inactivation in apple, mango, orange, and tomato juices. Food Control. 32 (1): 159 – 167

Aguiló-Aguayo, I.; N. Brunton; D. Rai; E. Balagueró; M. Hossain and J. Valverde. 2014, dec. Polyacetylene levels in carrot juice, effect of pH and thermal processing. Food Chemistry. 152: 370 – 377

Anandi, S.; P. Wiersma; D. Atrubin; V. Dubey; D. Zink; G. Skinner *et al.* 2008, nov. International outbreak of severe botulism with prolonged toxemia caused by commercial carrot juice. Clinical Infectious Diseases. 47: 1245 – 51

AOAC. 2012. Official methods of analysis of the association official analytic chemists. 18^o ed. Gatherburg, Maryland, USA. 6095 p.

Arcsott, S and S. Tanumihardjo. 2010, feb. Carrots of many colors provide basic nutrition and bioavailable phytochemicals acting as a functional food. Comprehensive reviews in food science and food safety. 9: 223 – 239

Bakkali, F.; S. Averbeck; D. Averbeck and M. Idaomar. 2008, feb. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology. 46 (2): 446–475

Boeing, H.; A. Bechthold; A. Bub; S. Ellinger; D. Haller; A. Kroke *et al.* 2012, sep. Critical review: Vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. European Journal of Nutrition. 51 (6): 637 – 663

Burt, S. 2004, ago. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology. 94 (3): 223–253

Char, C.; S. Guerrero y S. Alzamora. 2007. An innovative minimally processed orange juice: microbiological, color and sensory evaluation during refrigerated storage. IFT Annual Meeting 2007. Contribution No. 140-07.

Char, C.; S. Guerrero and S. Zamora. 2009, ene. Survival of *Listeria innocua* in thermally processed orange juice as affected by vanillin addition. Food Control. 20 (1): 67-74

Char, C.; L. Cisternas; F. Pérez and S. Guerrero. 2015, ago. Effect of emulsification on the antimicrobial activity of carvacrol. Journal of Food. 14 (2): 186 – 192

Chen, H.; H. Peng and B. Chen. 1996, dec. Stability of carotenoids and vitamin A during storage of carrot juice. Food Chemistry. 57 (4) : 497 – 503

Chia, S.; S. Rosnah; M. A Noranizan and W.D Wan Ramli. 2012, ene. The effect of storage

on the quality attributes of ultraviolet-irradiated and thermally pasteurised pineapple juices. International Food Research Journal. 19 (3): 1001 – 1010

Coroller, L; I. Leguerinel; E. Mettler; N. Savy and P. Mafart. 2006, oct. 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

Couvert, O; S. Gaillard; N. Savy; P. Mafart and I. Leguérinel. 2005, ene. Survival curves of heated bacterial spores: effect of environmental factors on Weibull parameters. International Journal of Food Microbiology. 101 (1): 73 – 81

Datt, K.; S. Karki; N. Singh and S. Attri. 2012, ene. Chemical composition, functional properties and processing of carrot—a review. Journal of Food Science and Technology. 49 (1): 22 – 32

Donsí, F.; M. Annunziata; M. Sessa and G. Ferrari. 2011, nov. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. Food Science and Technology. 44 (9): 1908-1914.

Espina, L; M. Somolinos; A. Ait Ouazzou; S. Condón; D. García-Gonzalo and R. Pagán. 2012, sep. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in fruit juices by combined treatments of citrus fruit essential oils and heat. International Journal of Food Microbiology. 159 (1): 9 – 16

Gong, Y.; Yu, J.; Qian, P.; Meng, J.; Zhang, X. and R. Lu. 2014, nov. Comparative study of the microbial stability and quality of carrot juice treated by high-pressure processing combined with mild temperature and conventional heat treatment. Journal of Food Process Engineering. 38 (4): 395 – 404

Hazan, R; A. Levine and H. Abeliovich. 2004, ago. Benzoic acid, a weak organic acid food preservative, exerts specific effects on intracellular membrane trafficking pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology. 70 (8): 4449 – 4457

Huseyin, D.; M. Karapinar and S. Karabiyikli. 2012, feb. The survival of *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* and *L. monocytogenes* in black carrot (*Daucus carota*) juice. International Journal of FoodMicrobiology. 153 (2): 212–215

Kim, S.A y M.S Rhee. 2015. Synergistic antimicrobial activity of caprylic acid in combination with citric acid against both *Escherichia coli* O157:H7 and indigenous microflora in carrot juice. FoodMicrobiology. 49: 166 – 172

Lawless, H. y H. Heymann. 2010. Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices. Segunda Edición. Estados Unidos: Springer Science + Business Media. 596 p. (Food Science Text Series)

Lee, Y.; S. Kim and D.H. Kang. Effect of pH for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in orange juice by ohmic heating. LWT - Food Science and Technology. 62 (1): 83 – 88

Leistner, L. 2000, abr. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. International Journal of Food Microbiology. 55 (2 - 3): 181–186

Madigan, M; J, Martinko and J. Parker. 2003. Brock biología de los microorganismos. Décima edición. Pearson Prentice Hall. Illinos, Estados Unidos. 1296 pag.

Martínez-Flores, H.; M.G. Garnica; D. Bermúdez; P. Raj and G. Barbosa. 2015, abr. Physico- chemical parameters, bioactive compounds and microbial quality of thermo-sonicated carrot juice during storage. Food Chemistry. 172: 650 – 656

MINSAL. 2010. Reglamento Sanitario de los Alimentos. DTO. No 977/96. http://web.minsal.cl/sites/default/files/files/DECRETO_977_96%20actualizado%20a%20Enero%202015.pdf> Consultado el: 24 abril de 2015

O’Beirne, D.; E. Gleeson; M. Auty and K. Jordan. 2014, jun. Effects of processing and storage variables on penetration and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-cut packaged carrots. Food Control. 40: 71 – 77

Patterson, M.; A. McKay; M. Connolly and M. Linton. 2012, may. The effect of high hydrostatic pressure on the microbiological quality and safety of carrot juice during refrigerated storage. Food Microbiology. 30: 205 – 212

Peleg, M. and M. B. Cole. 1998. Reinterpretation of microbial survival curves. Food Science. 38: 353 – 380.

Picouet, P; C. Sárraga; S. Cofán; N. Belletti and M. D, Guàrdia. 2015, jun. Effects of thermal and high-pressure treatments on the carotene content, microbiological safety and sensory properties of acidified and of non-acidified carrot juice. LWT - Food Science and Technology. 62 (1): 920 – 926

Rivas, A.; D. Rodrigo; A. Martínez; G.V. Barbosa-Cánova and M. Rodrigo. 2006, dic. Effect of PEF and heat pasteurization on the physical–chemical characteristics of blended orange and carrot juice. LWT - Food Science and Technology. 39 (10): 1163 – 1170

Sengun, I and M. Karapinar. 2004, nov. Effectiveness of lemon juice, vinegar and their mixture in the elimination of *Salmonella typhimurium* on carrots (*Daucuscarota*L.). International Journal of Food Microbiology. 96 (3): 301– 305

Slavin, J. and B. Lloyd. 2012, jul. Health benefits of fruits and vegetables. Advances in Nutrition. 3: 506-516

Tingting, M.; C. Tan; J. Luo; R. Zhou; X. Sun and J. Ma. 2013, dec. Influence of technical processing units on polyphenols and antioxidant capacity of carrot (*Daucus carota* L.) juice. Food Chemistry. 141 (3): 1637–1644

Tola, Y. y H. Ramaswamy. 2014, abr. Thermal destruction kinetics of *Bacillus licheniformis* spores in carrot juice extract as influenced by pH, type of acidifying agent and heating method. LWT Food Science and Technology. 56 (1): 131-137

Turgis, M.; M. Millette; S. Salmieri and M. Lacroix. 2012, aug. Elimination of *Listeria* inoculated in ready-to-eat carrots by combination of antimicrobial coating and γ -irradiation. Radiation Physics and Chemistry. 81 (8): 1170–1172

U.S Food and Drug Administration. 2012. Code of Federal Regulations Title 21. Recuperado en: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?CFRPart=114&showFR=1>>Consultado el: 5 enero de 2015

Yu, L and H. Vasantha. 2012, nov .Effect of acidification on quality and shelf-life of carrot juice. Canadian Journal of Plant Science. 92 (6): 1113 – 1120

Zhang, Y; X, Liu; Y. Wang; F. Zhao; Z. Sun and X. Liao.2016, feb. Quality comparison of carrot juices processed by high-pressure processing and high-temperature short-time processing. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 33: 135 – 144

Anexo I

Modelo de distribución de frecuencias de resistencia tipo Weibull

Los datos de las curvas de supervivencia de *E. coli* en jugo de zanahoria expuesto a los diferentes tratamientos se ajustarán a la forma acumulativa de la distribución de frecuencias de resistencias de Weibull (Peleg y Cole, 1998):

$$S_{(t)} = \frac{N_t}{N_0} = \exp(-bt^n)$$

Donde S es la fracción de microorganismos supervivientes, t es el tiempo, b y n son los parámetros. El factor b representa el tiempo de contacto necesario para inactivar el primer ciclo logarítmico de la población, y n está relacionado con la tendencia de la curva de inactivación. A partir de los valores de los parámetros b y n, se graficarán las curvas de frecuencias de resistencias utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{d\phi}{dt_c} = bnt_c^{n-1} \exp(-bt_c^n)$$

Utilizando dichos parámetros (b y n) se calcularán también otros parámetros que proporcionaron una mejor explicación de las frecuencias observadas:

Moda de la distribución (t_{cm}): representa el tiempo de tratamiento en el cual la mayoría de la población muere o se inactiva.

$$t_{cm} = [(n-1)/nb]^{1/n}$$

Media (\bar{t}_c): corresponde al tiempo de inactivación promedio.

$$\bar{t}_c = \{\Gamma[(n+1)/n]\}/b^{1/n}$$

Varianza (σ_{tc}^2): varianza de la media

$$\sigma_{tc}^2 = \{\Gamma[(n+2)/n] - (\Gamma[(n+1)/n])^2\}/b^{2/n}$$

Coefficiente de sesgo (skewness) (v_1): representa el sesgo de la distribución y está relacionado con los miembros más resistentes de la población microbiana.

$$v_1 = \frac{[\Gamma(n+3/n)/b^{3/n}]}{[\Gamma(n+2/n)/b^{2/n}]^{3/2}}$$

Anexo II**Pauta para Análisis Sensorial**

Evaluación de: jugo a base de zanahorias

Por favor, indique con una **línea vertical** sobre la escala el punto que mejor describa la **intensidad** de cada atributo de la muestra.

Muestra nº

Atributo

Ausente		Extremadamente elevado
VISUAL	Intensidad de color	

Ausente		Extremadamente elevado
NARIZ	Aroma a zanahoria	

Ausente		Extremadamente elevado
	Aroma herbáceo	

Ausente		Extremadamente elevado
BOCA	Acidez	

Ausente		Extremadamente elevado
	Persistencia	

Ausente		Extremadamente elevado
	Sabor a zanahoria	

Ausente		Extremadamente elevado
	Sabor herbáceo	

Ausente		Extremadamente elevado

Anexo III

Cuadro 9. Norma para zumos, néctares, bebidas a base de frutas y verduras no pasteurizados.

**ZUMOS, NÉCTARES, BEBIDAS A BASE DE FRUTAS
Y VERDURAS NO PASTEURIZADOS**

Parámetro	Plan de Muestreo			Límite por gramo		
	Categoría	Clases	n	c	m	M
Rcto. Aerobios Mesóf.	5	3	5	2	10 ⁴	10 ⁵
E. Coli	6	3	5	1	10	10 ²

Dónde “n” es el número de unidades de muestra que se examinan; “c” es el número máximo de unidades de muestra que puede contener un número de microorganismos comprendidos entre “m” y “M” para que el alimento sea aceptable; “m” es el valor del parámetro microbiológico para el cual o por debajo del cual el alimento no representa un riesgo para la salud; “M” es el valor del parámetro microbiológico por encima del cual el alimento representa un riesgo para la salud. Fuente: Ministerio de Salud de Chile (2014).

Anexo IV

Datos experimentales de curvas de supervivencia de los tratamientos térmicos suaves, adición de carvacrol emulsionado y acidificación en forma individual

Cuadro 10. Datos experimentales de curvas de supervivencia de *Escherichia coli* inoculada en jugos de zanahoria sometidos a un tratamiento individual de acidificación

Tiempo (h)	pH								
	4,5			5,0			5,5		
0	0	±	0	0	±	0	0	±	0
1	-0,14	±	0,06	-0,03	±	0,03	-0,01	±	0,11
2	-0,08	±	0,12	-0,04	±	0,09	-0,04	±	0,19
4	-0,00	±	0,48	0,03	±	0,10	-0,09	±	0,38
6	-0,39	±	0,34	-0,50	±	0,49	-0,16	±	0,39

Cuadro 11. Datos experimentales de curvas de supervivencia de *Escherichia coli* inoculada en jugos de zanahoria sometidos a tratamientos térmicos suaves

Tiempo (min)	Temperatura								
	56°C			58°C			60°C		
0	0	±	0	0	±	0	0	±	0
0,5							-1,294	±	0,50
1				-1,58	±	0,33	-2,314	±	0,55
2				-1,47	±	0,59	-2,793	±	0,70
3	-0,77	±	0,31	-1,72	±	0,46	-3,055	±	0,38
4				-2,28	±	0,61	-3,900	±	0,35
5				-3,29	±	0,44	-3,923	±	0,36
6	-1,05	±	0,48	-3,52	±	0,66			
9	-1,71	±	0,41						
12	-2,60	±	0,58						
15	-2,79	±	0,58						

Cuadro 12. Datos experimentales de curvas de supervivencia de *Escherichia coli* inoculada en jugos de zanahoria sometidos a tratamientos con carvacrol emulsionado

Tiempo (h)	Carvacrol emulsionado						c		
	0,10 µL/mL		0,15 µL/mL		0,2 µL/mL				
0	0	±	0	0	±	0	0	±	-
2	-0,12	±	0,15	-0,17	±	0,15	-0,062	±	0,12
4	-0,26	±	0,32	-0,24	±	0,40	-0,075	±	0,14
6	0,17	±	0,22	-0,02	±	0,03	-0,038	±	0,23
24	-0,08	±	0,16	0,01	±	0,22	-0,042	±	0,21

Anexo V

Datos experimentales de curvas de supervivencia de los tratamientos combinados

Cuadro 13. Datos experimentales de curvas de supervivencia de *Escherichia coli* inoculada en jugos de zanahoria sometidos a tratamientos combinados a una temperatura de 56°C

Tiempo (min)	Tratamientos							
	T2		T5		T6		T10	
0	0	± 0	0	± 0	0	± 0	0	± 0
3	-0,59	± 0,26	-0,72	0,06	-0,88	± 0,05	-0,90	± 0,66
6	-1,64	± 0,51	-1,50	± 0,51	-1,83	± 0,30	-1,69	± 0,94
9	-2,23	± 0,27	-2,18	± 0,45	-2,23	± 0,20	-2,45	± 0,53
12	-2,73	± 0,60	-3,06	± 0,02	-2,50	± 0,36	-2,80	± 0,45
15	-3,90	± 0,07	-3,29	± 0,02	-2,97	± 0,00	-3,07	± 0,95

Cuadro 14. Datos experimentales de curvas de supervivencia de *Escherichia coli* inoculada en jugos de zanahoria sometidos a tratamientos combinados a una temperatura de 58°C

Tiempo (min)	Tratamientos							
	T3		T4		T7		T8	
0	0	± 0	0	± 0	0	± -	0	± 0
1	-1,06	± 0,20	-0,90	0,32	-0,93	± 0,37	-1,32	± 0,27
2	-1,54	± 0,44	-1,49	± 0,57	-1,68	± 0,57	-2,25	± 0,48
3	-2,74	± 0,08	-2,12	± 0,30	-2,79	± 0,51	-2,59	± 0,49
4	-3,18	± 0,10	-2,39	± 0,35	-3,42	± 0,52	-2,84	± 0,58
5	-3,31	± 0,15	-3,05	± 0,21	-3,96	± 0,31	-3,76	± 0,37
6	-4,26	± 0,29	-3,37	± 0,49	-4,27	± 0,48	-4,15	± 0,21

Cuadro 14 (Continuación). Datos experimentales de curvas de supervivencia de *Escherichia coli* inoculada en jugos de zanahoria sometidos a tratamientos combinados a una temperatura de 58°C

Tiempo (min)	Tratamientos					
	T12		T13		T15	
0	0	± 0	0	± 0	0	± 0
1	-0,52	± 0,28	-1,02	± 0,65	-0,59	± 0,34
2	-1,62	± 0,13	-1,73	± 0,39	-1,50	± 0,31
3	-2,32	± 0,04	-2,65	± 0,34	-1,68	± 0,40
4	-3,11	± 0,26	-3,28	± 0,19	-2,23	± 0,33
5	-3,47	± 0,36	-3,89	± 0,15	-3,21	± 0,43
6	-4,10	± 0,08	-4,19	± 0,21	-3,24	± 0,45

Cuadro 15. Datos experimentales de curvas de supervivencia de *Escherichia coli* inoculada en jugos de zanahoria sometidos a tratamientos combinados a una temperatura de 60°C

Tiempo (min)	Tratamientos											
	T1			T9			T11			T14		
0	0	±	0	0	±	0	0	±	0	0	±	0
0,5	-1,74	±	0,55	-1,87	±	0,50	-2,00	±	0,05	-2,22	±	0,58
1	-3,04	±	0,53	-2,63	±	0,32	-3,20	±	0,69	-3,46	±	0,15
2	-3,91	±	0,27	-3,48	±	0,54	-3,59	±	0,27	-4,04	±	0,15
2	-4,32	±	0,37	-4,10	±	0,12	-4,05	±	0,57	-4,24	±	0,09
3	-4,49	±	0,22	-4,39	±	0,17	-4,10	±	0,57	-4,30	±	0,08
4	-4,56	±	0,08	-4,41	±	0,29	-4,49	±	0,32	-4,33	±	0,12

Anexo VI

Evaluación sensorial por el método descriptivo-cuantitativo

Cuadro 16. Evaluación sensorial de los atributos del jugo de zanahoria sometidos a los tratamientos combinados seleccionados

Tipo	Atributo	T7	T14
Visual	Intensidad de Color	11,86 ± 0,93 ^A	11,46 ± 2,00 ^A
Nariz	Aroma a zanahoria	7,54 ± 3,94 ^A	7,71 ± 3,96 ^A
	Aroma herbáceo	7,89 ± 2,96 ^A	7,10 ± 3,30 ^A
Boca	Acidez	4,26 ± 2,30 ^A	2,34 ± 1,39 ^B
	Persistencia	9,21 ± 3,35 ^A	9,07 ± 3,16 ^A
	Sabor a zanahoria	7,96 ± 2,65 ^A	9,36 ± 2,73 ^A
	Sabor herbáceo	8,31 ± 3,01 ^A	6,69 ± 3,40 ^A

Letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para un mismo atributo, la cual se realizó mediante el test de Tuckey con un nivel de significancia de 5%. n = 14

Anexo VII

Datos experimentales del estudio de estabilidad microbiológica de los jugos de zanahoria sometido a los tratamientos seleccionados y a un control de jugo sin tratar

Cuadro 17. Resultados de recuentos microbiológicos de aerobios mesófilos (RAM) en jugos almacenados a 4°C

Día	RAM		
	Control	T7	T14
0	2,5, E+04 ± 0,0, E+00 ^A	3,8, E+01 ± 2,2, E+01 ^B	1,3, E+00 ± 9,3, E+00 ^B
3	3,3, E+04 ± 8,4, E+03 ^A	5,9, E+01 ± 4,6, E+01 ^B	1,2, E+00 ± 1,3, E+01 ^B
7	1,7, E+05 ± 1,1, E+04 ^A	4,4, E+02 ± 6,8, E+02 ^B	1,6, E+00 ± 2,9, E+01 ^B
14	2,8, E+06 ± 5,5, E+04 ^A	7,1, E+02 ± 8,5, E+02 ^B	1,9, E+00 ± 5,5, E+01 ^B
21	1,9, E+07 ± 9,4, E+05 ^B	5,3, E+03 ± 7,2, E+03 ^B	2,1, E+00 ± 1,1, E+02 ^B

Letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para un mismo atributo, la cual se realizó mediante el test de Tuckey con un nivel de significancia de 5%. n = 3

Cuadro 18. Resultados de recuentos microbiológicos de enterobacterias en jugos almacenados a 4°C

Día	Enterobacterias		
	Control	T7	T14
0	3,7, E+03 ± 1,7, E+03 ^A	0 ^B	0 ^B
3	9,4, E+03 ± 6,4, E+03 ^A	0 ^B	0 ^B
7	2,6, E+04 ± 8,8, E+03 ^A	0 ^B	0 ^B
14	4,6, E+05 ± 1,0, E+05 ^A	0 ^B	0 ^B
21	1,9, E+06 ± 2,3, E+05 ^B	0 ^B	0 ^B

Letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para un mismo atributo, la cual se realizó mediante el test de Tuckey con un nivel de significancia de 5%. n = 3

Cuadro 19. Resultados de recuentos microbiológicos de *Lactobacillus sp.*, en jugos almacenados a 4°C

Día	<i>Lactobacillus sp.</i>		
	Control	T7	T14
0	3,5, E+02 ± 1,8, E+02 ^A	0 ^B	0 ^B
3	5,3, E+02 ± 1,2, E+02 ^A	0 ^B	0 ^B
7	2,0, E+03 ± 8,1, E+02 ^A	0 ^B	0 ^B
14	6,7, E+03 ± 1,1, E+03 ^A	0 ^B	0 ^B
21	7,8, E+04 ± 1,3, E+04 ^B	0 ^B	0 ^B

Letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para un mismo atributo, la cual se realizó mediante el test de Tuckey con un nivel de significancia de 5%. n = 3

Cuadro 20. Resultados de recuentos microbiológicos de hongos y bacterias en jugos almacenados a 4°C

Día	Hongos y Levaduras		
	Control	T7	T14
0	4,0, E+02 ± 1,7, E+02 ^A	1,0, E+00 ± 2,5, E+00 ^B	0
3	1,4, E+03 ± 1,0, E+03 ^A	3,0, E+00 ± 4,5, E+00 ^B	0
7	3,2, E+03 ± 7,6, E+02 ^A	7,0, E+00 ± 7,8, E+01 ^B	0
14	4,0, E+03 ± 1,7, E+03 ^A	1,4, E+01 ± 8,7, E+01 ^B	0
21	6,3, E+03 ± 1,2, E+03 ^B	2,1, E+01 ± 7,8, E+01 ^B	0

Letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para un mismo atributo, la cual se realizó mediante el test de Tuckey con un nivel de significancia de 5%. n = 3

Anexo VIII

Datos experimentales de la evaluación de los parámetros de color

Cuadro 21. Resultados de la evaluación de los parámetros de color en espacio CIE L*a*b* y CIE L*C*h* para el jugo de zanahoria control, sometida a T7 y a T14

Tratamiento	Día	L*	a*	b*	C*	h*
Control	0	48.29 ± 0.62 A	29.10 ± 0.75 A	33.17 ± 0.38 A	44.12 ± 0.78 A	48.73 ± 0.42 A
	3	48.34 ± 1.51 A	28.61 ± 1.78 A	32.67 ± 1.21 A	43.43 ± 2.08 A	48.79 ± 0.75 A
	7	46.19 ± 0.75 A	24.72 ± 1.87 A	28.87 ± 2.01 A	38.18 ± 2.49 A	49.11 ± 0.29 A
	14	46.03 ± 1.96 A	26.77 ± 1.47 A	29.85 ± 0.81 A	40.11 ± 0.38 A	48.12 ± 2.33 A
	21	46.96 ± 1.23 A	27.86 ± 0.19 A	29.96 ± 0.60 B	40.91 ± 0.31 B	47.04 ± 0.77 A
T7	0	45.87 ± 0.15 A	30.96 ± 1.74 A	31.17 ± 1.13 A	43.94 ± 2.03 A	45.21 ± 0.58 B
	3	46.31 ± 0.08 A	30.67 ± 1.56 A	30.72 ± 0.66 A	43.41 ± 1.57 A	45.05 ± 0.83 B
	7	46.74 ± 0.81 A	28.21 ± 0.19 A	29.27 ± 0.47 A	40.66 ± 0.21 A	46.05 ± 0.67 B
	14	45.77 ± 0.94 A	30.63 ± 0.50 A	29.92 ± 0.90 A	42.83 ± 0.27 B	44.30 ± 1.37 A
	21	46.06 ± 0.94 A	32.00 ± 0.37 B	30.92 ± 0.42 B	44.50 ± 0.60 A	43.98 ± 0.06 B
T14	0	48.23 ± 0.94 A	31.04 ± 2.19 A	31.76 ± 1.05 A	44.41 ± 2.29 A	45.69 ± 1.09 AB
	3	47.58 ± 0.61 A	30.59 ± 2.52 A	31.74 ± 1.51 A	44.08 ± 2.84 A	46.09 ± 1.00 AB
	7	46.89 ± 0.03 A	27.76 ± 2.05 A	29.73 ± 1.92 A	40.68 ± 2.79 A	47.00 ± 0.29 B
	14	47.26 ± 0.45 A	30.54 ± 1.32 A	31.03 ± 0.36 A	43.55 ± 0.66 B	45.45 ± 1.58 A
	21	47.59 ± 0.04 A	32.61 ± 0.55 B	37.59 ± 0.64 A	46.00 ± 0.83 A	45.16 ± 0.07 B