



Combinación de ultrasonido de baja frecuencia con factores convencionales y/o emergentes como método de inactivación de microorganismos en alimentos

A. Franco-Vega*, E. Palou y A. López-Malo.

*Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Fundación Universidad de las Américas Puebla.
Exhacienda Sta. Catarina Mártir S/N, Cholula, Puebla. C.P.72810. México.*

Resumen

El proceso de sonicación de alimentos por medio de ultrasonido de baja frecuencia por si sólo ha resultado ser poco viable para la destrucción de microorganismos, debido a esto en la actualidad se ha propuesto el uso de tecnologías convencionales y emergentes en combinación con el ultrasonido para aumentar su efecto conservador. Dentro de las combinaciones que han sido estudiadas se encuentran aquéllas en las cuales se utiliza la composición misma del alimento (pH y a_w), compuestos químicos y las que se complementan con la variación de diferentes parámetros del proceso (temperatura, presión o su combinación). El uso del ultrasonido en combinación con estos factores, su mecanismo y efecto sobre los microorganismos son discutidos en este trabajo.

Palabras clave: ultrasonido de baja frecuencia, tratamientos combinados, inactivación de microorganismos.

Abstract

The use of low frequency ultrasound in the food industry had shown to be unfeasible for the destruction of bacterial cells due to the necessary large processing time to accomplish this task. Hence, nowadays the combination of ultrasound with conventional and emerging technologies has been proposed for enhancing their preservative effect. Within these combinations are those using the composition of the food (pH and a_w), chemical compounds, and those used with variations of process parameters (temperature, pressure and/or their combination). The use of ultrasound combined with other factors, their mechanisms, and their effects on the microorganisms are discussed in this review.

Keywords: low frequency ultrasound, combined treatments, microbial inactivation.

Introducción

Hoy en día se están evaluando en la industria de alimentos nuevas tecnologías de conservación dentro de las cuales se encuentran tratamientos como altas presiones

hidrostáticas, pulsos eléctricos, campos magnéticos e irradiación con luz ultravioleta de onda corta entre otros. Si bien la capacidad de estos tratamientos para conservar alimentos no es precisamente novedosa, su desarrollo para ser usados como una opción de procesamiento ha recibido atención recientemente (Ross *et al.*, 2003). El auge del estudio de estos tratamientos es en respuesta a

*Programa de Maestría en Ciencia de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126, fax: +52 222 229 2727
Dirección electrónica: avelina.francova@udlap.mx

la necesidad de los procesadores y tecnólogos de alimentos de ofrecer al consumidor productos mínimamente procesados, que se apeguen a las nuevas tendencias de consumo y que a la vez se encuentren libres de riesgos microbiológicos (Demidróvel y Baysal, 2009). En un estudio realizado por la *Food and Drug Administration* (FDA, 2009) acerca de estas nuevas tecnologías de conservación de alimentos, se considera al ultrasonido de baja frecuencia como una de ellas.

El uso de ultrasonido se ha estudiado desde hace varios años para la inactivación de microorganismos y se ha demostrado que tiene la habilidad de dañar su pared celular, con lo cual logra inactivarlos (Feng y Weiss, 2010). Sin embargo, el ultrasonido por sí solo no es muy eficiente en la destrucción de los microorganismos presentes en los alimentos, debido a que maneja tiempos de procesamiento relativamente largos al ser aplicado a temperaturas sub-letales (Piyasena *et al.*, 2003). En la literatura se han reportado inactivaciones de sólo un ciclo logarítmico en más de 60 minutos de procesamiento (Gabriel, 2012), presentándose además, daños en la calidad sensorial de los productos sometidos a estos tratamientos tan largos. Los daños observados se han atribuido a la desnaturalización de proteínas y generación de radicales libres que tienen la capacidad de afectar el sabor y olor del producto tratado.

Debido a esto, estudios recientes (Piyasena *et al.*, 2003.; Ross *et al.*, 2003.; Condón *et al.*, 2005.; Lee *et al.*, 2009) han propuesto el uso del ultrasonido en combinación con otras técnicas de conservación tradicionales y emergentes, para así someter a las células microbianas a un ataque desde varias direcciones (Demidróven y Baysal, 2009). Con lo anterior se busca lograr un mayor efecto en la inactivación por medio de una interacción sinérgica entre métodos tradicionales y emergentes (Leistner, 2000).

Dentro de las combinaciones que han sido probadas se encuentran aquellas en las cuales se aprovecha la composición del mismo alimento, como son el pH y la actividad de agua, la interacción con compuestos químicos (agentes antimicrobianos, ácidos orgánicos, algunas sales), y el uso de variables del proceso, como la temperatura y presión. Con estas combinaciones se han obtenido buenos resultados, no sólo en la inactivación de los microorganismos presentes si no también en una reducción de la cantidad de energía necesaria para el proceso y en la intensidad del tratamiento aplicado al alimento. El objetivo de este trabajo es hacer una revisión del efecto del ultrasonido de baja frecuencia al ser combinado con diferentes factores sobre la inactivación de microorganismos.

Revisión bibliográfica

1. Ultrasonido de baja frecuencia

El ultrasonido tiene un gran número de aplicaciones en diversas áreas de la industria alimentaria, como son los procesos de cristalización, emulsión y congelación (Gogate y Kabadi, 2009); sin embargo, uno de los más relevantes es su poder de actuar como un proceso de conservación siendo una alternativa en la inactivación de los microorganismos responsables del deterioro de los alimentos.

El ultrasonido está definido como el proceso en el cual se generan ondas de presión con frecuencias por arriba del umbral de la audición humana (>16 kHz) (Butz y Tauscher, 2002; Arroyo *et al.*, 2011). El efecto antimicrobiano del ultrasonido está dado por las condiciones de alta temperatura y presión (1.1×10^4 - 1.07×10^5 KPa y 500 a 1500 °K) (Gogate y Kabadi, 2009) creadas durante el proceso y atribuidas a la generación, crecimiento y colapso de burbujas o cavidades

dentro del líquido. Este fenómeno es conocido como cavitación (Earnshaw, 1998).

Los cambios intensos de presión y temperatura causados durante la cavitación causan un rompimiento inducido de las paredes celulares y daño en el ADN de los microorganismos siendo atribuidos al desarrollo de radicales libres (OH^\cdot , HO_2^\cdot , y O_3^\cdot) (Furuta *et al.*, 2004). Estos y otros daños que se pueden presentar, son los responsables de la inactivación microbiana (Ross *et al.*, 2003).

Parámetros como la frecuencia, amplitud de onda, temperatura y viscosidad del medio a tratar influyen el grado de cavitación; sin embargo, la frecuencia de ultrasonido usado es uno de los factores más importantes en la efectividad del mismo (Patist y Bates, 2008). Para el procesamiento de alimentos es usado el ultrasonido de baja frecuencia que comprende de 20 a 100 kHz, también conocido como ultrasonido de alta potencia (Piyasena *et al.*, 2003). Se ha demostrado que a estos valores es donde se genera el mayor tamaño de burbuja, lo cual logra que la energía creada en la cavitación sea mayor (Salleh-Mack y Roberts, 2007).

A pesar de que la cavitación da lugar a una fuerte mezcla de las suspensiones en las que es aplicado el ultrasonido, muchas veces los microorganismos tienden a concentrarse en planos nodales donde los cambios de presión y temperatura generados no son capaces de llegar, causando así que la inactivación se vea debilitada y que a la vez el tiempo necesario para que ésta sea relevante sea demasiado largo (Furuta *et al.*, 2004). Debido a esta debilidad de su acción letal se ha considerado poco apto para la conservación de alimentos. Sin embargo, recientes estudios (López- Malo *et al.*, 2005; Mañas y Pagan, 2005.; Gómez-Díaz *et al.*, 2011) han demostrado que la combinación del ultrasonido con otras técnicas de inactivación incrementan sustancialmente la letalidad del tratamiento.

2. *Combinación con factores propios de la composición del alimento*

En el estudio de la capacidad de inactivación del ultrasonido se ha encontrado que la composición del alimento afecta tanto de manera negativa como positiva a este efecto. Dos de estos factores intrínsecos que se han determinado que pueden causar un efecto importante en el proceso de inactivación son el pH y la actividad de agua del medio, por lo cual se han estudiado sistemas tomándolos como una combinación de barreras (Salleh-Mack y Roberts, 2007;vg Arroyo *et al.*, 2011).

2.1. *pH*

Al igual que en otros procesos novedosos de inactivación microbiana el efecto de un descenso de pH ha demostrado reducir la resistencia de los microorganismos al proceso de sonicación (Salleh-Mack y Roberts, 2007). Algunos investigadores han examinado el efecto del pH al cual se realiza la sonicación de productos inoculados con *Escherichia coli* (Utsunomya y Kosaka, 1979; Salleh-Mack y Roberts, 2007), encontrando que, en efecto, la inactivación de este microorganismo aumenta a medida que el pH del medio disminuye. Resultados similares han sido reportados por Wong *et al.*, (2008) para *Salmonella spp* tratada en dos medios con pH diferente, jugo de naranja a pH 3.2 y una solución de sacarosa a pH 6.6 por medio de sonicación. Estos investigadores encontraron que la reducción más significativa se presentó en la población inoculada en el jugo de naranja, debido entre otros factores al bajo pH de este producto.

Sin embargo, se ha demostrado que la efectividad de la combinación de pH y tratamiento por ultrasonido en la inactivación depende en cierta parte de la especie de microorganismo. (Ross *et al.*, 2003). Kinsloe *et al* (1954) compararon como se afectaba la resistencia de *Pseudomona aeruginosa* y

Saccharomyces cerevisiae al ser tratadas con ultrasonido a dos pH diferentes (7 y 4) encontrando que no existía cambio significativo en la sensibilidad de estos microorganismos entre ambos tratamientos.

Uno de los factores importantes a tomar en cuenta al momento de decidir usar un proceso de ultrasonido en el cual se busca ayudar con una baja de pH es la concentración de ácido que será usada. (Salleh-Mack y Roberts, 2007). Sagong *et al.* (2011) demostraron que en la inactivación de *E. coli* en lechugas tratadas con ultrasonido y ácido málico, al utilizar una concentración de 1% del ácido se obtuvieron reducciones de 1.15 ciclos logarítmicos, mientras que al aumentar la concentración al doble (2%) la inactivación sólo aumentó 0.10%. Sin embargo, se ha demostrado que al combinar concentraciones iguales de ácido cítrico o málico con ultrasonido para la inactivación de *E. coli*, la diferencia de ácido no ha representado una diferencia significativa en el nivel de inactivación del proceso (Salleh-Mack y Roberts, 2007)

2.2. Actividad de agua (a_w)

La actividad de agua es uno de los factores que tienen mayor influencia en la resistencia de los microorganismos ante diferentes factores de estrés, incluyendo dentro de éstos al ultrasonido (Patterson, 2005).

En el caso de estudios realizados variando la actividad de agua por la adición de solutos, se ha encontrado que al tratar a *Listeria monocytogenes* en un medio con altas concentraciones de sacarosa, los valores de tiempo de reducción decimal del tratamiento por ultrasonido aumentaron (Piyasena *et al.*, 2000)

Arroyo *et al.* (2011) demostraron que la resistencia al proceso aumentaba a medida que la actividad de agua del medio disminuía de valores de 0.99 a 0.94; observando que

después de un minuto de tratamiento se redujo en más de 2.5 ciclos logarítmicos a la población de *Cronobacter sakazakii* en un medio sin sacarosa ($a_w=0.99$); mientras en un medio con 44.4% (p/v) ($a_w=0.94$) se redujo en menos de 0.5 ciclos logarítmicos. Basados en estos resultados, concluyeron que este aumento en la resistencia puede deberse a que el descenso de la actividad de agua modifica la viscosidad del fluido. De igual manera, Condón *et al.* (2005), observaron que la resistencia de *L. monocytogenes* aumentó en un medio sonicado al variar su actividad de agua de 0.99 a 0.93.

Estudios como estos han demostrado que a diferencia de lo que sucede con el pH, los microorganismos sonicados presentan aumentos de resistencia de los cuando éstos se encuentran en soluciones con actividades de agua reducidas (Condón *et al.*, 2005).

3. Combinación del ultrasonido con compuestos químicos

El uso de antimicrobianos es una técnica de conservación usada desde hace mucho tiempo en la industria de alimentos dando buenos resultados; sin embargo, aparte de la limitación que presentan por la regulación a la que están sujetos, su uso en los productos comerciales también está restringido por sus altos costos y por la inhibición de su efecto antimicrobiano en sustratos complejos (Corbo *et al.*, 2009).

La adición de estos antimicrobianos combinados con técnicas no térmicas de procesamiento han demostrado presentar un buen obstáculo para los microorganismos (Ross *et al.*, 2003). Arce-García *et al.* (2002) lograron reducir la intensidad y duración del tratamiento de ultrasonido requerido en la inhibición de *Zygosaccharomyces rouxii* a un 67% y 33% del valor original por medio de la adición de sorbato de potasio, benzoato de sodio o eugenol en el medio. De igual manera

también se ha probado la efectividad de la combinación de antimicrobianos naturales con sonicación. Ferrante *et al.* (2007) investigaron la respuesta de *Listeria monocytogenes* en jugo de naranja tratado a temperatura moderada con ultrasonido de alta intensidad y la adición de diferentes concentraciones de vainillina y citral encontrando que la presencia de estos dos antimicrobianos aumentaron el efecto bactericida del proceso.

Por su parte, los ácidos orgánicos, han demostrado que además de tener la característica de ser generalmente reconocidos como seguros (GRAS por sus siglas en ingles), tienen la habilidad de inactivar a los microorganismos causantes del deterioro de alimentos (Sagong *et al.*, 2011). Algunos ejemplos de los ácidos orgánicos añadidos a alimentos son el ácido cítrico, málico, láctico y acético. Dentro de sus ventajas como conservadores se encuentra su rápida acción y amplio espectro de acción. Además estos productos son efectivos a un amplio rango de temperaturas y no son afectados por la dureza del agua; sin embargo, su alto costo y corrosividad son algunos de sus defectos (Marriot y Gravani, 1991). Por estas razones es que en la actualidad se busca disminuir, dentro de la industria, la dosis de ácidos orgánicos utilizados en los procesos de desinfección, dando así pauta a la combinación de este proceso con nuevas tecnologías como el ultrasonido.

Existen reportes que indican que la combinación del ultrasonido con ácidos orgánicos, como el málico y el cítrico, tiene un efecto significativo sobre la reducción en la población de microorganismos (Salleh-Mack y Roberts, 2007; Singh *et al.* 2002). Esto se atribuye a que la combinación actúa de la misma manera que con los sanitizantes acuosos, penetrando en pliegues de hojas de frutas y vegetales, en donde los ácidos orgánicos no pueden acceder fácilmente por sí solos, y de esta manera incrementando la

velocidad de reacción entre el ácido y los componentes celulares (Ross *et al.*, 2003).

Sagong *et al.* (2011) sometieron lechugas inoculadas con *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. typhimurium* con un tratamiento combinado de ácido málico, láctico o cítrico con ultrasonido. Los resultados demostraron que al combinar los tratamientos se mejora de manera general la efectividad de los ácidos orgánicos al inhibir a los patógenos presentes en las lechugas. Por otro lado, se ha reportado que en productos vegetales mínimamente procesados donde se compara la efectividad del tratamiento combinado contra el tratamiento de ultrasonido por sí solo, el tratamiento combinado además de ser capaz de inactivar a los microorganismos no causa cambios significativos en la apariencia del producto. Este es un factor de vital importancia, ya que el tratamiento por ultrasonido que es efectivo para la inactivación generalmente afecta la calidad sensorial del producto (Singh *et al.* 2002).

Es por esto que hoy en día el uso de ultrasonido combinado con ácidos orgánicos se puede considerar como una buena opción para la industria de alimentos orgánicos, ya que da la opción de que se aumente la seguridad microbiológica de sus productos y a la vez ésta pueda reducir la cantidad de ácido que usa dentro de sus procesos de conservación.

Los desinfectantes acuosos son otro método de conservación que ha sido probado en combinación con el ultrasonido. Una de las ventajas con las que cuenta combinar estos dos tratamientos radica en que puede dar pie a la reducción en la concentración de químicos necesarios para la sanitización y desinfección de alimentos. Además, en algunos métodos químicos de sanitización en los cuales los microorganismos han desarrollado resistencia al compuesto, el uso alternativo del ultrasonido se ha presentado como una opción

debido a la simplicidad del proceso y a la ausencia de producción de compuestos tóxicos (Furuta *et al.*, 2004).

El lavado de productos frescos con sanitizantes acuosos como el cloro, el peróxido de hidrógeno y el fosfato trisódico ha sido ampliamente usado para reducir su carga microbiana (Sagong *et al.*, 2011); sin embargo, se ha demostrado que usando concentraciones de 50 a 200 ppm (la cual es ampliamente usada para desinfectar productos) no es capaz de reducir poblaciones iniciales de microorganismos mayores a 10^2 Ufc/mL (Sapers, 2001).

Cuando el ultrasonido es usado en combinación con tratamientos químicos (Cl_2 , H_2O_2 , O_3), el intenso gradiente de presión promueve la penetración de los químicos a través de la membrana celular, y la cavitación facilita la desaglomeración de los grupos de microorganismos en la solución desinfectante; incrementando así su eficacia (Gogate y Kabadi, 2009). Phull *et al.* (1997) investigaron la aplicación de ultrasonido en combinación con cloro como una técnica de desinfección para *E. coli* y reportaron que la sonicación tuvo la ventaja de ampliar el efecto normal de la cloración y que la combinación tuvo mejores resultados sobre la reducción del microorganismo que la sonicación por sí sola.

Por otra parte, para la reducción de microorganismos aglomerados, lograda por la cavitación, Blume y Neis (2005) reportan la eficacia en tratamiento en aguas residuales en combinación con cloro, observando una notoria reducción en el tamaño de los mismos.

4. Combinación de ultrasonido con temperatura y presión

4.1. Termosonicación

Si bien es cierto que dentro del proceso de cavitación se genera en el fluido un aumento de temperatura, ésta no dura mucho tiempo ni es capaz de llegar a todas las células (Mañas y Pagan, 2005). La termosonicación es el método en el cual los alimentos son sometidos a una combinación de ultrasonido con altas temperaturas (Demidróvel y Baysal, 2009). El uso de esta combinación se ha dado debido a que se reducen las temperaturas y tiempos de proceso en tratamientos como la pausterización y esterilización; logrando los mismos valores de letalidad que con los procesos tradicionales.

Si bien, por debajo de los 50°C no existe un efecto significativo en la inactivación de la mayoría de los microorganismos, una vez que esta temperatura es rebasada, es notorio y considerable dicho efecto (Piyasena *et al.*, 2003). Se ha dicho que el uso de temperatura combinado con ultrasonido puede llegar a afectar su capacidad de conservación de la sonicación; sin embargo, estos estudios se refieren a casos en los que se usa más de 80°C . Esta comprobado que a estas temperaturas la presión de vapor puede llegar a amortiguar el efecto de la cavitación disminuyendo la intensidad del colapso.

A medida que se usan temperaturas de proceso más altas durante el ultrasonido, las burbujas causantes de la cavitación se forman más rápidamente, esto junto con un incremento en la presión de vapor y una disminución en la tensión superficial (Salleh-Mack y Roberts, 2007). Las células

bacterianas se vuelven más sensibles a los tratamientos térmicos si éstas han sido sometidas previamente a un tratamiento de ultrasonido. Un aumento en el número de células muertas ha sido observado en productos en los cuales se han combinado el ultrasonido con un tratamiento térmico, comparado con el mismo alimento sólo expuesto a ultrasonido. Algunos investigadores han reportado una reducción en la resistencia al tratamiento térmico de esporas bacterianas cuando son sonicadas en agua (Hua y Thompson, 2000) a una temperatura en el rango de los 70-95°C, e iguales reducciones se han observado en especies de *Bacillus* como *B. cereus* y *B. stearothermophilus* tratados con altas temperaturas a 20 kHz (Demidróven y Baysal, 2009).

En bacterias Gram negativas se ha encontrado una diferencia de más de un ciclo logarítmico de reducción al aumentar la temperatura de proceso sólo en 10°C (Salleh-Mack y Roberts, 2007). Muñoz *et al.* (2011) reportaron la efectividad del proceso sobre *E. coli* presente en jugo de naranja en el cual se lograron de 1 a 2 ciclos logarítmicos de reducción. Sin embargo, los autores describieron que se manejaron dos temperaturas de termosonicación (40 y 50°C) y que a pesar de lo esperado, la mayor inactivación no se logró a la temperatura más alta sino a los 40°C con una reducción de 1.6 ciclos logarítmicos.

4.2. Manosonicación

La manosonicación es el proceso en el cual se usan ondas de ultrasonido de alta frecuencia bajo presión en combinación con temperaturas no letales (Arroyo *et al.*, 2011). Cuando se incrementa la presión hidrostática del medio que se encuentra alrededor de las burbujas de cavitación, da como resultado un descenso en la presión de vapor dentro de la burbuja, y por lo tanto un incremento en la intensidad de la explosión de la burbuja. Los microorganismos

son capaces de resistir en muchos casos altas presiones, pero son incapaces de seguir resistiendo los rápidos cambios de presión producidos durante el procesamiento con ultrasonido (Salleh-Mack y Roberts, 2007).

Se han reportado mejoras en la inactivación al usar manosonicación en microorganismos como *Y. enterocolitica*, esporas de *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Aeromonas hydrophila* (Lee *et al.*, 2009). En la inactivación de *Listeria monocytogenes* al combinar la sonicación con un aumento de presión a 200 kPa, el tiempo necesario para reducir el 90% de la carga microbiana se reduce a 1.5 min, siendo que en un tratamiento de sonicación por sí sólo, son necesarios 4.3 min (Piyasena *et al.*, 2003).

A pesar de que se ha reportado la efectividad de la manosonicación, existe un límite en la presión que puede ser usada dentro de este procesamiento. Tal límite ésta marcado debido a que se han observado procesos en los cuales, a pesar de aumentar la presión ya no existe un efecto letal. Se ha encontrado que para la inactivación de *Yersinia enterocolitica* por medio de manosonicación, la presión máxima es de 400 kPa (Raso *et al.*, 1998), ya que después de esta presión ya no existe una diferencia significativa en la reducción de la población. Según Lee *et al.* (2009) es posible que esto suceda ya que cuando la presión ha alcanzado su punto límite, la amplitud de la presión ultrasónica ya no es capaz de superar la presión hidrostática y la fuerza cohesiva del líquido.

Su ventaja en la sanitización y/o inactivación de microorganismos se ve más en productos sensibles al calor, o en aquellos en que las condiciones extremas de proceso pueden perjudicar la calidad del alimento. Además, otra ventaja de la manosonicación es que su capacidad de inactivación de microorganismos de una misma especie no varía con las diferentes cepas de éste, a

diferencia de lo que pasa con los tratamientos térmicos que dependen en gran medida de las especies y cepas de microorganismos que se encuentran en el material. Arroyo *et al.* (2011) encontraron que al aplicar ultrasonido a una amplitud de onda de 117 μm y 200 kPa de tratamiento a cuatro diferentes cepas de *C. sakazakii* no existían diferencias de resistencia entre ellas ante la misma intensidad de tratamiento.

4.3. Manotermosonicación

Se ha demostrado que al trabajar a presión atmosférica el poder del ultrasonido disminuye de manera drástica cuando es aplicado a temperaturas por debajo de los 60°C (Raso *et al.*, 1999). Sin embargo, se ha encontrado que cuando las temperaturas del proceso exceden el punto de ebullición en el alimento hay una pérdida en el efecto de cavitación junto con una alta tensión de vapor de agua a estas temperaturas. La aplicación de presión estática a un tratamiento de termosonicación, también conocido como manotermosonicación (MTS) ha sido investigada para mejorar la intensidad de la cavitación de las burbujas creadas durante el proceso de sonicación (Raso *et al.*, 1998).

Al presurizar el líquido durante la termosonicación, la cavitación se mantiene aún a temperaturas de ebullición. Este tratamiento ha sido usado de manera efectiva contra distintos microorganismos. Comparada la inactivación lograda con un tratamiento térmico a la misma temperatura, con la inactivación por MTS en bacterias Gram positivas (*Listeria monocytogenes* y *Streptococcus faecium*) y Gram negativas (*Salmonella*), se ha observado que existe un aumento de 3.4-4 y de 5-6.3 ciclos logarítmicos de reducción, respectivamente (Lee *et al.*; 2009). Por otra parte, cinco ciclos logarítmicos de reducción fueron logrados para *L. monocytogenes* al aplicar ultrasonido en combinación con 62°C y 200 kPa por 2

minutos, y en *S. entérica* a 60°C y 175 kPa por 0.9 minutos (Álvarez *et al.*, 2003).

5. Combinación de ultrasonido con tecnologías emergentes

Las tecnologías emergentes son una opción que se ha venido estudiando en la industria alimentaria en la búsqueda de nuevas opciones de procesamiento de alimentos (Muñoz *et al.*, 2011). Estas han demostrado tener la capacidad de inactivar microorganismos, sin embargo, para lograrlo por si solas necesitan del uso de intensidades de tratamiento muy altas, causando de esta manera cambios en las propiedades de los alimentos y aumentando el requerimiento de energía y por lo tanto el costo del proceso. Por lo anterior su uso en la industria de manera individual se ha convertido en una práctica poco factible.

Algunos de los factores que se han encontrado que más afectan la efectividad de estas tecnologías es la resistencia de las esporas bacterianas y la composición del alimento, entre otros (Leistner y Gould, 2002). Debido a esto es que se ha propuesto la combinación de estas tecnologías emergentes para optimizar su efecto antimicrobiano, formando de esta manera una tecnología de obstáculos.

En el caso del ultrasonido se ha probado combinarlo con pulsos eléctricos y se han logrado inactivar a la población inicial de *B. subtilis* hasta 4 ciclos logarítmicos (Jin *et al.*, 1998). Este efecto aditivo también ha sido demostrado en la inactivación de *E. coli* en jugo de naranja, logrando inactivaciones de hasta 3.93 ciclos logarítmicos al utilizar 5.1 J/cm² y 2.8 minutos de ultrasonido a 24 kHz y 100 μm (Muñoz *et al.*, 2011). Gómez-Díaz *et al.* (2011) estudiaron la inactivación de *Zygosaccharomyces bailli* al tratar jugo de manzana con luz ultravioleta de onda corta y ultrasonido de baja frecuencia, los autores reportan el descenso de 7 ciclos logarítmicos

de una población inicial 10^8 ufc/mL cuando el jugo inoculado con la levadura se sometió a 20 kHz con una amplitud de onda de 120 μ m en combinación con una intensidad de luz ultravioleta de 1100 μ W/cm².

En otros casos se ha estudiado la combinación del ultrasonido con alguna tecnología emergente además de la adición de un desinfectante para observar su sinergismo. Un ejemplo de esto es el caso de la combinación de sonicación con irradiación e hipoclorito de sodio en la inactivación de *Bacillus cereus* (Ji-Hyoung Ha *et al.*, 2012). En este estudio se utilizaron tratamientos de irradiación de 0.1, 0.2 y 0.3 kGy, de 600 a 1000 ppm de hipoclorito de sodio y de 5 a 20 minutos de ultrasonificación, encontrando que las combinaciones destruyeron de manera total a la población inicial (10^3 ufc/mL) de esporas de esta bacteria, a diferencia del tratamiento en el cual sólo se combinaba la radiación con el ultrasonido en el cual solo se pudo reducir la población inicial a la mitad.

Sin embargo, el éxito de la combinación no sólo depende de su capacidad de inactivación de las diferentes tecnologías por separado, sino también de su compatibilidad técnica para el proceso; ya que existen combinaciones que limitan la utilidad del proceso. En el caso de las combinaciones de ultrasonido con otras tecnologías emergentes aquí mencionadas es evidente que la mayor desventaja es que el procesamiento está limitado a alimentos líquidos.

Conclusiones

En general, la combinación del proceso de ultrasonido de baja frecuencia con otros factores de estrés convencionales y emergentes ha demostrado tener un efecto sobre la eficiencia de esta tecnología en la inactivación

de los microorganismos presentes en los alimentos.

Estas diferentes combinaciones ofrecen la posibilidad de desarrollar procesos de conservación con los cuales se generen productos microbiológicamente seguros y en los cuales a la vez se logre el aprovechamiento de la composición propia del alimento, y una reducción en la concentración de los componentes químicos usados, así como del tiempo e intensidad del ultrasonido, convirtiéndose de esta manera en procesos que se adaptan a las nuevas tendencias en el consumo de alimentos.

Si bien en los diferentes métodos citados dentro de este trabajo se han presentado buenos resultados en la inactivación de los microorganismos a las condiciones que se realizaron, es necesario seguir investigando a nuevas condiciones en diferentes alimentos para así aumentar la información que pueda validar estos procesos. Además es importante tomar en cuenta las condiciones críticas de cada uno de estos procesos ya que de ello dependerá la relevancia de su acción como tecnología de conservación para los alimentos.

Agradecimientos

La autora Franco-Vega agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad de las Américas Puebla (UDLAP) por el apoyo para sus estudios de posgrado.

Referencias

- Álvarez, I., Mañas, P., Sala, F.J., Condón, S., 2003. Inactivation of *Salmonella enteric* serovar enteritidis by ultrasonic waves under pressure at different water

- activities. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:668–672.
- Arce-Garcia, M.R., Jimenez-Munguia, M.T., Palou, E., Lopez-Malo, A., 2002. Ultrasound treatments and antimicrobial agents effects on *Zygosaccharomyces rouxii*. *IFT Annual Meeting Book of Abstracts*. 2002, Session 91E-18.
- Arroyo, C., Cebrián, G., Pagán, R. y Condón, S. 2011. Inactivation of *Cronobacter sakazakii* by ultrasonic waves under pressure in buffer and foods. *International Journal of Food Microbiology*. 144:446-454.
- Blume, T. y Neis, U. 2005. Improving chlorine disinfection of wastewater by ultrasound application, *Water Science. Technology*. 52:139.
- Butz, P. y Tauscher, B., 2002. Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research International* 35 (2/3), 279 – 284.
- Condón, S., Raso, J., Pagán, R., 2005. Microbial inactivation by ultrasound. En: Barbosa- Cánovas, G.V., Tapia, M.S., Cano, M.P. (Eds.), *Novel Food Processing Technologies*. CRC Press, Boca Ratón, pp. 423–442.
- Corbo, M., Bevilacqua, A., Campaniello, D., D’Amato, D., Speranza, B. y Sinigaglia, M. 2009. Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and non-thermal approaches- a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 44:223-241.
- Demidróvel, A. y Baysal, T. 2009. The use of ultrasound and combined technologies in food preservation. *Food Reviews International*. 25:1-11.
- Earnshaw, R.G., 1998. Ultrasound: a new opportunity for food preservation. En: Povey, M.J.W., Mason, T.J. (Eds.), *Ultrasound in Food Processing*. Blackie Academic and Professional, Londres. pp. 183 – 192.
- Feng, H. y Weiss, J. 2010. Power ultrasound in food processing. En: D. R. Heldman. (Ed.) *Encyclopedia of agricultural, food and biological engineering*. CRC Press. Nueva York USA. P. 500-504.
- FDA. Food and Drug Administration. US. 2009. *Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies*. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm100158.htm>. Accesada 14 de febrero de 2012.
- Ferrante, S., Guerrero, S y Alzamora, S. 2007. Combined use of ultrasound and natural antimicrobials to inactivate *Listeria monocytogenes* in orange juice. *Journal of Food Protection*. 70(8):1850-1856.
- Furuta, M., Yamaguchi, M., Tsukamoto, T., Yim, B., Stavarache, C., Hasiba, K. y Maeda, Y. 2004. Inactivation of *Escherichia coli* by ultrasonic irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry*. 11:57-60.
- Gabriel, A. 2012. Microbial inactivation in cloudy apple juice by multi-frequency Dynashock power ultrasound. *Ultrasonic Sonochemistry*. 19:346-351.
- Gogate, P. y Kabadi, A. 2009. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*. 44:60-72.
- Gómez-Díaz, J., Santiesteban-López, A., Palou, E. y López-Malo, A. 2011. *Zygosaccharomyces bailii* inactivation by means of UV light and low-frequency ultrasound treatments. *Journal of Food Protection*. 74(10):1751-1755.
- Ji-Hyoung Ha, Hyun-Joo Kim, Sang-Do Ha. 2012. Effect of combined radiation and NaOCl/ultrasonication on reduction of *Bacillus cereus* spores in rice. *Radiation Physics and Chemistry*. DOI 10.1016/j.radphyschem.2012.01.026.
- Hua, I y Thompson, J. 2000. Inactivation of *Escherichia coli* by sonication at discrete ultrasonic frequencies. *Water Research*. 34(15):3888-3893.
- Kinsloe, H., Ackerman, E., Reid, J.J., 1954. Exposure of microorganisms to measured sound fields. *Journal of Bacteriology*. 68:373–380.
- Jin, Z.T., Su, Y., Tuhela, L., Singh, B., Zhang, Q.H., 1998. Inactivation of *Bacillus subtilis* using high voltage pulsed electric fields and ultrasonication. *IFT Annual Meeting Book of Abstracts*, 1998, Session 59C-15.

- Lee. H., Zhou. B., Liang.W., Feng. H. y Martin, S. 2009. Inactivation of *Escherichia coli* cells with sonication, manosonication, thermosonication, and manothermosonication: Microbial responses and kinetics modeling. *Journal of Food Engineering*. 93:354-364.
- Leistner, L., 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55:181 – 186.
- Leistner, L., Gould, G.W., 2002. *Hurdle Technologies Combination Treatments for Food Stability, Safety and Quality*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- López-Malo. A., Palou. E., Jiménez-Fernández. M., Alzamora. M. y Guerrero, S. 2005. Multifactorial fungal inactivation combining thermosonication and antimicrobials. *Journal of Food Engineering*. 67(1-2):87-93.
- Mañas y Pagan, 2005. Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*. 98:1387–1399.
- Marriott, N.G. y Gravani, R.B., 1991. Principles of food sanitation. *Food Chemistry*. 41(3):363-364.
- Muñoz. A., Palgan, I., Noci. F., Morgan. D., Cronin. D. Whyte.P. y Lyng. J. 2011. Combinations of High intensity light pulses and thermosonication for the inactivation of *Escherichia coli* in orange juice. *Food Microbiology*. 28:1200-1204.
- Patist. A. y Bates, D. 2008. Ultrasonics innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 9:147-154.
- Patterson, M.F., 2005. Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology* 98:1400–1409.
- Piyasena. P., Mohareb, E. y McKellar, R. 2003. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 87:207-2016.
- Phull. S., A.P. Newman, J.P. Lorimer, B. Pollet, T.J. Mason. 1997. The development and evaluation of ultrasound in the biocidal treatment of water, *Ultrasonics. Sonochemistry*. 4:157.
- Raso, J., Pagan, R., Condon, S. y Sala, F. J. 1998. Influence of temperature and pressure on the lethality of ultrasound. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(2):465-471.
- Raso. J., Mañas. P., Pagan. R. y Sala. F. 1999. Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*. 5:157–162.
- Ross. A., Griffiths. M., Mittal. G. y Deeth. H. 2003. Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 89:125-138.
- Sagong. H., Lee. S., Chang. P.,Heu. S., Ryu. S., Choi. Y. y Kang. D. 2011. Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *International Journal of Food Microbiology*. 145:287-292.
- Salleh-Mack. S. y Roberts. J. 2007. Ultrasound pasteurization: The effects of temperature, soluble solids, organic acids and pH on the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922. *Ultrasonics Sonochemistry*. 14:323-329.
- Sapers, G.M., 2001. Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetable products. *Food Technology and Biotechnology*. 39:305–311.
- Singh, N., Singh, R.K., Bhunia, A.K., Stroshine, R.L., 2002. Efficacy of chlorine dioxide, ozone and thyme essential oil on a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 35:720–729
- Utsunomya. Y. y Kosaka. Y. 1979. Application of supersonic waves to foods. *Journal of the Faculty of Applied Biological Science*. 18:225-231.
- Wong. E., Pérez. A. y Vaillant. F. 2008. Combined effect of osmotic pressure and sonication on the *Salmonella* Spp. In concentrated orange juice. *Journal of Food Safety*. 28(4):499-513.