

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
MAESTRIA EN MICROBIOLOGÍA APLICADA Y CONTROL DE CALIDAD
MICROBIOLÓGICA



EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE RADIACIÓN
ULTRAVIOLETA Y TERMOULTRASONICACIÓN SOBRE LA
CARGA MICROBIANA Y EL VALOR NUTRICIONAL DE LA
LECHE CRUDA.

Por:

Lic. Juan Pablo Apaza Paco

Tutor:

MSc. Rolando Illanes Castañeta

(Tesis de postgrado presentada para la obtención del grado de *Magister Scientiarum*)

La Paz –Bolivia

Marzo, 2022

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
MAESTRIA EN MICROBIOLOGÍA APLICADA Y CONTROL MICROBIOLÓGICO



COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE
RADIACIÓN ULTRAVIOLETA Y TERMOULTRASONICACIÓN
SOBRE LA CARGA MICROBIANA Y EL VALOR NUTRICIONAL
DE LA LECHE CRUDA.

Por:

Lic. Juan Pablo Apaza Paco

(Tesis de postgrado presentada para la obtención del grado de *Magister Scientiarum*)

La Paz –Bolivia

Marzo, 202



**MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA APLICADA Y
 CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICA
 ACTA DE CALIFICACIÓN DEL DOCUMENTO DE TESIS
 EQUIVALENTE AL 80%**

Fecha: La Paz, 15 de Noviembre de 2021
Programa: Maestría en Microbiología Aplicada y Control de Calidad Microbiológica
Título del Tema: EFECTO DE LA APLICACIÓN DE RADIACIÓN ULTRAVIOLETA Y TERMOULTRASONICACION SOBRE LA CARGA MICROBIANA Y EL VALOR NUTRICIONAL DE LA LECHE
Postulante: Lic. Juan Pablo Apaza Paco
Tutor: M. Sc. Rolando Illanes Castañeta
Tribunal: M. Sc. Marisel Mercedes Mamani Mamani

Nº	CALIFICACIÓN SOBRE EL 100% EN BASE A:	PORCENTAJE	CALIFICACIÓN
1	<ul style="list-style-type: none"> • Valoración de la discusión de los resultados. • Rigor científico • Correspondencia de las conclusiones con los objetivos planteados 	30%	25%
2	Valoración del cumplimiento de requisitos metodológicos	20%	20%
3	Valoración de la importancia, interés y actualidad de la temática estudiada en el plano nacional e internacional y el impacto social que produce este estudio	20%	15%
4	Bibliografía	20%	19%
5	Claridad del documento presentado	10%	9%
TOTAL		100%	91%
Comentarios:			

NOTA.- La calificación mínima de aprobación es de 71%

[Firma]
FIRMA REVISOR



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
BENEMÉRITA Y CENTENARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS

UNIDAD ACADÉMICA ACREDITADA POR EL SISTEMA DE LA UNIVERSIDAD BOLIVIANA 2014 - 2020
 La Paz - Bolivia



Fundada el 14 de Mayo de 1825

**MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA APLICADA Y CONTROL
 DE CALIDAD MICROBIOLÓGICA
 EQUIVALENTE AL 80%**

Fecha: La Paz, 29 de Octubre de 2021
Programa: Maestría en Microbiología Aplicada y Control de Calidad Microbiológica
Título del Tema: EFECTO DE LA APLICACIÓN DE RADIACIÓN UTRAVIOLETA Y TERMOULTRASONICACIÓN SOBRE LA CARGA MICROBIANA Y EL VALOR NUTRICIONAL DE LA LECHE
Postulante: Lic. Juan Pablo Apaza Paco
Tutor: M. Sc. Rolando Illanes Castañeta
Tribunal: M. Sc. Daysi Montiveros Zapata

Nº	CALIFICACIÓN SOBRE EL 100% EN BASE A:	PORCENTAJE	CALIFICACIÓN
1	<ul style="list-style-type: none"> • Valoración de la discusión de los resultados. • Rigor científico • Correspondencia de las conclusiones con los objetivos planteados 	30%	25
2	Valoración del cumplimiento de requisitos metodológicos	20%	18
3	Valoración de la importancia, interés y actualidad de la temática estudiada en el plano nacional e internacional y el impacto social que produce este estudio	20%	17
4	Bibliografía	20%	20
5	Claridad del documento presentado	10%	8
TOTAL		100%	88%

Comentarios:

revisión de tesis aprobada con observaciones

NOTA.- La calificación mínima de aprobación es de 71%

[Firma manuscrita]
FIRMA REVISOR



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
BENEMÉRITA Y CENTENARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS

UNIDAD ACADÉMICA ACREDITADA POR EL SISTEMA DE LA UNIVERSIDAD BOLIVIANA 2014 - 2020
 La Paz - Bolivia



MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA APLICADA Y CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICA
ACTA DE CALIFICACIÓN DEL DOCUMENTO DE TESIS EQUIVALENTE AL 80%

Fecha: La Paz, 16 de Noviembre de 2021
Programa: Maestría en Microbiología Aplicada y Control de Calidad Microbiológica
Título del Tema: EFECTO DE LA APLICACIÓN DE RADIACIÓN ULTRAVIOLETA Y TERMOULTRASONICACION SOBRE LA CARGA MICROBIANA Y EL VALOR NUTRICIONAL DE LA LECHE
Postulante: Lic. Juan Pablo Apaza Paco
Tutor: M. Sc. Rolando Illanes Castañeta
Tribunal: M. Sc. Lorelta Ivana Duran Arias

Nº	CALIFICACIÓN SOBRE EL 100% EN BASE A:	PORCENTAJE	CALIFICACIÓN
1	<ul style="list-style-type: none"> Valoración de la discusión de los resultados. Rigor científico Correspondencia de las conclusiones con los objetivos planteados 	30%	25
2	Valoración del cumplimiento de requisitos metodológicos	20%	15
3	Valoración de la importancia, interés y actualidad de la temática estudiada en el plano nacional e internacional y el impacto social que produce este estudio	20%	15
4	Bibliografía	20%	16
5	Claridad del documento presentado	10%	6
TOTAL		100%	77

Comentarios:

Revisar las observaciones, mejorar la metodología en donde se hicieron los análisis. En anexos debe aparecer los registros de control de calidad de los grupos ultravioleta, métodos ultravioleta, copias ATCC y otros. Los mismos ultravioleta.

(Signature)

NOTA.- La calificación mínima de aprobación es de 71%

(Signature)
FIRMA REVISOR

“La imaginación
es más importante
que el conocimiento”

Albert Einstein.

Agradecimientos

A la unidad de posgrado de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas por haberme permitido continuar mi formarme como profesional, con el fin de servir a mi sociedad.

A mi asesor *MSc.* Rolando Illanes Castañeta, por los consejos y el ánimo impartido en todo momento.

Al tribunal conformado por: *MSc.* Daysi Montiveros Zapata, *MSc.* Loretta Ivana Duran Arias y *Msc.* Marisel Mercedes Mamani Mamani; por compartir su experiencia y conocimiento.

A la Universidad Boliviana Indígena Aymara Tupak Katari y la Universidad Pública de El Alto por brindarme los ambientes y equipamiento necesario para poder realizar el presente trabajo de investigación.

Al Lic. Jacinto Nery Segaline Chávez por su colaboración y guía en los ensayos realizados en el Laboratorio de Química de Alimentos de la carrera de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Pública de El Alto.

Y a todas aquellas personas de una u otra manera, colaboraron en la realización de este trabajo.

Tabla de contenido

	Página
<i>Abstract</i>	
Resumen	
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1 Definición de la leche.	3
2.1.1 Composición de la leche.	3
2.1.2 Producción lechera.	5
2.1.3 Leche y productos lácteos.	5
2.1.4 La cadena láctea.	6
2.2 Legislación y normativa.	7
2.2.1 Normativa.	8
2.2.1.1 Productos lácteos- Leche cruda y fresca.	8
2.3 Inocuidad alimentaria.	10
2.3.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA`s).	10
2.3.2 Deterioro de los alimentos.	12
2.4 Tecnologías de conservación de los alimentos.	13
2.4.1 Condiciones básicas que debe tener un método de conservación.	14
2.4.2 Pasteurización.	15
2.4.2.1 Efecto del tratamiento térmico sobre la leche	16
2.4.3 Tecnologías emergentes.	17
2.4.3.1 Irradiación de alimentos	18
2.4.3.2 Aspectos históricos.	19
2.4.3.3 Marco normativo de irradiación de alimentos.	20
2.4.4 Tipos de radiación.	21
2.4.4.1 Radiación ionizante.	22
2.4.4.2 Radiación no ionizante.	22
2.4.5 Radiación ultravioleta.	23
2.4.5.1 Mecanismo de acción de la técnica considerada.	25
2.4.5.2 Microorganismos alterantes y/o patógenos susceptibles/sensibles.	26
2.4.5.3 Factores relacionados con las condiciones de tratamiento.	27
2.4.5.4 Sensibilidad de microorganismos a UV-C.	27
2.4.5.5 Mecanismos de resistencia microbiana.	29
2.4.5.6 Efectos sobre las propiedades sensoriales de los alimentos.	30
2.4.5.7 Efectos sobre la estructura	31
2.4.6 Aplicaciones industriales	31
2.4.6.1 Frutas y verduras	31
2.4.6.2 Zumos	32
2.4.6.3 Lácteos.	32
2.4.6.4 Agua.	33

2.4.6.5 Envases para alimentos y films.	33
2.4.7 Aspectos legislativos y regulación de aplicación de radiación UV.	33
2.4.7.1 Ventajas de productos irradiados con radiación UV.	34
2.4.7.2 Desventajas de productos tratados con radiación UV.	34
2.4.8 Termoultrasonicación	35
2.4.9 Recuento de aerobios mesofilos totales en leche.	37
2.4.9.1 <i>Escherichia coli</i>	37
2.4.9.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .	40
	41
2.4.9.3 Cinética de la destrucción de los microorganismos	
2.5 Vida útil	42
2.5.1 Factores que afectan a la vida útil	43
2.5.2 Etapas para la determinación de la vida útil.	44
3. Planteamiento del problema	46
4. Justificación	47
5. Antecedentes	49
6. Objetivos	51
6.1 Objetivo general	51
6.2 Objetivos específicos	51
7. Planteamiento de la Hipótesis	52
	53
8. Diseño metodológico	
8.1 Enfoque de la investigación.	53
8.2 Tipo de investigación	53
8.2.1 Descriptivo	53
8.2.2 Correlacional	53
8.3 Variables en estudio.	53
8.4 Sitio o contexto del estudio	54
8.5 Materia prima	54
8.5.1 Población de estudio	54
8.6 Universo y población o muestra.	54
8.6.1 Criterios de inclusión.	55
8.6.2 Criterios de exclusión.	55
8.4 Procedimiento.	56
8.5 Construcción del sistema de tratamiento por radiación ultravioleta (UV).	57
8.6 Evaluación del efecto de la radiación ultravioleta y termoultrasonicación sobre leche contaminada artificialmente.	58
8.6.1 Selección de la matriz.	58
8.6.2 Contaminación artificial de la matriz con <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	59
8.6.3 Contaminación artificial de la matriz con <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	60
8.6.4 Limpieza y desinfección del sistema de tratamiento por radiación UV.	60
8.6.5 Tratamiento por radiación ultravioleta	61
8.6.6 Tratamiento por termoultrasonicación	61
8.6.7 Recuento de <i>Escherichia coli</i> .	63

8.6.8 Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> .	63
8.6.9 Cálculo de la letalidad	64
8.7 Estimación del efecto sobre el valor nutricional los macronutrientes (proteína, grasa, carbohidratos) y micronutrientes (vitaminas y minerales) de la leche después del tratamiento con radiación ultravioleta y termoultrasonificación.	64
8.7.1 Calibración del equipo.	64
8.7.1.1 Limpieza del analizador.	65
8.7.1.2 Programación del LactoStar	65
8.8 Comparación de las propiedades fisicoquímicas (densidad, punto de congelación, extracto seco magro) de la leche después del tratamiento con radiación ultravioleta y termoultrasonificación.	66
8.8.1 Programación del LactoStar	66
8.9 Determinación de la vida útil de la matriz tras haber sido sometido a radiación UV y termoultrasonificación.	66
8.9.1 Evaluación sensorial	66
8.9.2 Evaluación fisicoquímica	67
8.9.2.1 Acidez titulable	67
8.9.2.2 pH	68
8.9.3 Evaluación microbiológica	68
8.9.3.1 Recuento de aerobios mesofilos	68
8.10 Análisis estadísticos	69
9. Resultados y discusión	70
9.1 Construcción del sistema de tratamiento	70
9.2 Evaluación del efecto de la radiación ultravioleta y termoultrasonificación sobre leche contaminada artificialmente.	72
9.2.1 Efecto sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	72
9.2.2 Efecto sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	78
9.3 Estimación del efecto sobre el valor nutricional los macronutrientes (proteína, grasa, carbohidratos) y micronutrientes (vitaminas y minerales) de la leche después del tratamiento con radiación ultravioleta y termoultrasonificación.	82
9.3.1 Estimación del efecto sobre el valor nutricional del porcentaje de los macronutrientes (proteína, grasa, carbohidratos).	83
9.3.1.1 Tratamiento con radiación UV.	83
9.3.1.2 Termoultrasonificación	91
9.3.2 Estimación del efecto sobre el valor nutricional sobre el porcentaje de los micronutrientes (vitaminas, minerales).	91
9.3.2.1 Radiación ultravioleta	94
9.3.2.2 Termoultrasonificación	97
9.4 Comparación de las propiedades fisicoquímicas (densidad, punto de congelación) de la leche después del tratamiento con radiación ultravioleta y termoultrasonificación.	97
9.4.1 Radiación ultravioleta	97
9.4.2 Termoultrasonificación	99
9.5 Determinación de la vida útil	101
9.5.1 Características fisicoquímicas.	101

9.5.2 Características microbiológicas	102
9.5.3 características organolépticas	103
10. Conclusiones	104
11. Recomendaciones	106
12. Perspectivas futuras	107
13. Bibliografía	108
Anexos	

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Composición de la leche de vaca (Bendicho et al., 2002)	4
Tabla 2. Requerimiento microbiológico de la leche cruda y fresca NB: 33013-2013 (IBNORCA).	9
Tabla 3. Requisitos de composición de la leche cruda y fresca NB: 33013-2013 (IBNORCA).	9
Tabla 4. Requisitos fisicoquímicos de la leche cruda y fresca NB: 33013-2013 (IBNORCA).	9
Tabla 5. Países que han aprobado la irradiación de alimentos (Loaharanu, 1995)	20
Tabla 6. Sensibilidad al UV de distintos tipos de virus (Hijnen <i>et al</i> , 2006)	28
Tabla 7. Operación de las variables de estudio en la comparación del efecto de la radiación ultravioleta y termoultrasonificación.	29
Tabla 8. Criterio de confirmación del recuento presuntivo (NB 32005: 2004).	54
Tabla 9. Indicadores de la evaluación organoléptica.	
Tabla 10. Análisis de varianza para los tratamientos de pasteurización a 60; 70; 80 °C a diferentes tiempos.	74
Tabla 11. Análisis de varianza para los tratamientos por radiación UV a 1; 7; 13 L/min a diferentes tiempos.	76
Tabla 12. Análisis de varianza para los tratamientos por termoultrasonificación a temperaturas de 50; 60; 70 °C a diferentes tiempos.	77
Tabla 13. Análisis de varianza para los tratamientos de pasteurización a 60; 70; 80 °C a diferentes tiempos.	79
Tabla 14. Análisis de varianza para los tratamientos por radiación UV a 1,3; 7; 13 L/min a diferentes tiempos.	81
Tabla 15. Análisis de varianza para los tratamientos por termoultrasonificación a temperaturas de 50; 60; 70 °C a diferentes tiempos.	82
Tabla 16. Análisis de varianza para los tratamientos por acción UV a 1; 7; 13 L/min a diferentes tiempos con respecto al porcentaje de proteína.	84
Tabla 17. Análisis de varianza para los tratamientos por acción UV a 1; 7; 13 L/min a diferentes tiempos con respecto al porcentaje de grasa.	86
Tabla 18. Análisis de varianza para los tratamientos por acción UV a 1; 7; 13 L/min a diferentes tiempos con respecto al porcentaje de lactosa.	87
Tabla 19. Análisis de varianza para los tratamientos por termoultrasonificación a temperaturas de 50; 60; 70 °C a diferentes tiempos sobre el porcentaje de proteína.	89

Tabla 20. Análisis de varianza para los tratamientos por termoultrasonificación a temperaturas de 50; 60; 70 °C a diferentes tiempos sobre el porcentaje de grasa.	90
Tabla 21. Análisis de varianza para los tratamientos por termoultrasonificación a temperaturas de 50; 60; 70 °C a diferentes tiempos sobre el porcentaje de lactosa.	91
Tabla 22. Análisis de varianza para los tratamientos por acción UV a 1; 7; 13 L/min a diferentes tiempos con respecto al porcentaje de vitaminas.	93
Tabla 23. Análisis de varianza para los tratamientos por acción UV a 1; 7; 13 L/min a diferentes tiempos con respecto al porcentaje de minerales.	94
Tabla 24. Análisis de varianza para los tratamientos por termoultrasonificación a temperaturas de 50; 60; 70 °C a diferentes tiempos sobre el porcentaje de vitaminas.	95
Tabla 25. Análisis de varianza para los tratamientos por termoultrasonificación a temperaturas de 50; 60; 70 °C a diferentes tiempos sobre el porcentaje de minerales.	96
Tabla 26. Análisis de varianza para los tratamientos por acción UV a 1; 7; 13 L/min a diferentes tiempos con respecto a la densidad.	98
Tabla 27. Análisis de varianza para los tratamientos por acción UV a 1; 7; 13 L/min a diferentes tiempos con respecto Al punto de congelación.	99
Tabla 28. Análisis de varianza para los tratamientos por termoultrasonificación a temperaturas de 50; 60; 70 °C a diferentes tiempos sobre la densidad.	100
Tabla 29. Análisis de varianza para los tratamientos por termoultrasonificación a temperaturas de 50; 60; 70 °C a diferentes tiempos sobre el punto de congelación.	101
Tabla 30. Características organolépticas de la matriz a diferentes tratamientos.	103

Índice de figuras

	Página
Figura 1. <i>Logotipo para alimentos tratados con radiación (Ehlermann, 2009).</i>	21
Figura 2. Espectro de radiación electromagnética (Fernández, 2016).	24
Figura 3. Rango germicida (Sozer, 2009).	24
Figura 4. <i>Modificaciones en el ADN debido a tratamiento con radiación UV (Lado y Yousef, 2002)</i>	25
Figura 5. Equipo de ultrasonido (Illanes 2018)	36
Figura 7. Descripción de las etapas a seguir para establecer y validar la vida útil de los alimentos (Alapont, 2020).	45
Figura 8. Descripción del proceso metodología de la medición del efecto de la aplicación de radiación UV y termoultrasonificación sobre la leche.	56
Figura 9. Prototipo del sistema de tratamiento por radiación ultravioleta (AutoCAD)	57
Figura 10.- Disposición en 3D de los componentes del sistema de tratamiento por radiación Ultravioleta (AutoCAD).	58
Figura 11. Partes de una placa seca rehidratable (www.3M.com/microbiology).	69
Figura 12. Componentes del sistema de tratamiento radiación ultravioleta. a) Sistema completo realizando el tratamiento de la matriz. b) Caudalímetro del sistema y c) Lámpara UV en la carcasa.	70
Figura 13. Efecto del proceso de pasteurización sobre la cepa de <i>E.coli</i> ATCC 25922.	73
Figura 14. Efecto de la aplicación de radiación UV sobre la cepa de <i>E. coli</i> ATCC 25922.	75
Figura 15. Efecto de la aplicación de termoultrasonificación sobre la cepa de <i>E.coli</i> ATCC 25922.	76
Figura 16. Efecto del proceso de pasteurización sobre la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923	79
Figura 17. Efecto de la aplicación de radiación UV sobre la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923	80
Figura 18. Efecto de la aplicación de termoultrasonificación sobre la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923.	81
Figura 19. Efecto de la aplicación de radiación UV el porcentaje de proteína.	83

<i>Figura 20.</i> Efecto de la aplicación de radiación UV el porcentaje de grasa.	85
<i>Figura 21.</i> Efecto de la aplicación de radiación UV el porcentaje de lactosa.	86
<i>Figura 22.</i> Efecto de la aplicación de termoultrasonificación sobre el porcentaje de proteína.	88
<i>Figura 23.</i> Efecto de la aplicación de termoultrasonificación sobre el porcentaje de grasa.	89
<i>Figura 24.</i> Efecto de la aplicación de termoultrasonificación sobre el porcentaje de lactosa.	90
<i>Figura 25.</i> . Efecto de la aplicación de radiación UV sobre el porcentaje de vitaminas.	91
<i>Figura 26.</i> Efecto de la aplicación de radiación UV sobre el porcentaje de minerales.	93
<i>Figura 27.</i> Efecto de la aplicación de termoultrasonificación sobre el porcentaje de vitaminas.	94
<i>Figura 28.</i> Efecto de la aplicación de termoultrasonificación sobre el porcentaje de minerales.	96
<i>Figura 29.</i> Efecto de la aplicación de radiación UV sobre la densidad.	97
<i>Figura 30.</i> Efecto de la aplicación de radiación UV sobre el punto de congelación.	98
<i>Figura 31.</i> Efecto de la aplicación de termoultrasonificación sobre la densidad.	99
<i>Figura 32.</i> Efecto de la aplicación de termoultrasonificación sobre el punto de congelación.	100
<i>Figura 33.</i> Punto de corte por medio del pH.	101
<i>Figura 34.</i> Punto de corte por medio del porcentaje de acidez titulable.	102
<i>Figura 35.</i> Punto de corte por medio del recuento aerobios mesofilos totales.	102

Abreviaturas

AFNOR	Asociación francesa de normalización
AOAC	Asociación Oficial de Agroquímica.
ATCC	Colección americana de cepas.
Atm	Atmosfera.
Aw	Actividad agua
ETA	Enfermedad de transmisión por alimento.
FAO	Organización para la alimentación y la agricultura.
FDA	Fundación de medicamentos y alimentos.
gl	Grados de libertad.
IAE	Intoxicación alimentaria estafilococica.
ISO	Organización internacional de estandarización
KDa	Kilo Dalton.
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad.
NB	Norma boliviana
NC	Nivel crítico
OMS	Organización mundial de la salud.
PCA	Placas de agar para recuento.
rpm	Revoluciones por minuto.
SE	Enterotoxina estafilocócica.
UFC	Unidades formadoras de colonias.

Simbología

c	Número máximo permitido de unidades de muestra rechazables en un plan de muestreo de 2 clases o unidades de muestra provisionalmente aceptables en un plan de muestreo de 3 clases.
g	gramo.
Hi	Hipótesis alterna.
Ho	Hipótesis nula.
log	Logaritmo.
m	Límite microbiológico que separa la calidad aceptable de la rechazable.
M	Los valores de recuentos microbianos superiores a "M" son inaceptables, el alimento representa un riesgo para la salud.
min	minuto.
mL	mililitro.
mm	milímetro.
n	Número de unidades de muestra requeridas para realizar el análisis.
pH	Potencial de hidrogeniones
s	Segundo.

Abstract

In recent years, the development of technologies and processes has been sought to guarantee the safety and quality of the milk, as well as to be able to obtain an appropriate useful life period for its commercialization and reduce the withdrawal of the product from the stalls. It is important to highlight that there is a current trend towards the demand for less processed and safe foods that guarantee consumer safety; because milk can be a source of infection or food poisoning (ETA's). The present work has the objective of evaluating the effect of the application of UV radiation and thermal ultrasonication on the microbial load and nutritional value of milk.

An experimental design 32 was used for both study groups, for UV radiation with three flow rates (1.3, 7 and 13 L / min) with respect to thermoultrasonication with three temperatures (50, 60 and 70 ° C). The response variables were the count of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, nutritional value (percentage of protein, fat and lactose); Finally, within the physicochemical parameters (density and freezing point), the useful life of the matrix that was subjected to the treatments under study was determined.

The evaluation of the effect was carried out on the strain of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, where it was observed that the pasteurization method reduces the microbial load after 5 minutes of treatment at a temperature of 80 ° C with both microorganisms and that a count of $<1 \times 10^1$ CFU / mL. On the other hand, with UV radiation treatment, a count of $<1 \times 10^1$ CFU / mL is not reached throughout the time of the test with the three flow rates used in the study, where the *E.coli* strain presents more resistance than the *S. aureus* strain. Finally, thermoultrasonication reaches similar values with pasteurization because it achieves the reduction of the microbial load up to a count of $<1 \times 10^1$ CFU / mL at exposure times 1 and 3 min. Regarding the nutritional value of milk, it was observed that the UV radiation method, at the flow rates of 1.3 and 7L / min, does not affect the percentage of protein, fat and lactose, but at a flow rate of 13L / min. It causes the decrease in the percentage of fat and lactose mainly, to values that would not be the norm. Concerning thermoultrasonication, the percentages of protein, fat and lactose remain unaltered during the treatment

time. For future studies on the impact of the conservation method, it would be convenient to analyze this phenomenon with other food matrices.

Key Words: UV radiation, thermal ultrasonication, contamination, nutritional value, milk.

Resumen

En los últimos años se ha buscado el desarrollo de tecnologías y procesos para garantizar la inocuidad y calidad de la leche, así como para poder obtener de un periodo de vida útil apropiado para su comercialización y reducir retiro del producto de los puestos de venta. Es importante resaltar que existe la tendencia actual a la demanda de alimentos menos procesados, inocuos y que garanticen la seguridad al consumidor; porque la leche puede ser fuente de cuadros de infección o intoxicación alimentaria (ETA's). El presente trabajo tiene el objetivo de evaluar el efecto de la aplicación de la radiación UV y termoultrasonicación sobre la carga microbiana y valor nutricional de la leche.

Se trabajó con un diseño experimental 3^2 para ambos grupos de estudio, para la radiación UV con tres caudales (1,3; 7 y 13 L/min) con respecto a la termoultrasonicación con tres temperaturas (50; 60 y 70 °C) se tuvo como variables de respuesta el recuento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, valor nutricional (porcentaje de proteína, grasa y lactosa); dentro de los parámetros fisicoquímicos (densidad y punto de congelación) por último se determinó la vida útil de la matriz que fue sometida a los tratamientos en estudio.

La evaluación del efecto se realizó sobre la cepa de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, donde se observó que el método de pasteurización disminuye la carga microbiana a los 5 minutos de tratamiento a una temperatura de 80°C con ambos microorganismos y que se llega a un recuento de $<1 \times 10^1$ UFC/mL. Por otra parte con el tratamiento de radiación UV, no se llega a un recuento de $<1 \times 10^1$ UFC/mL a lo largo del tiempo de la prueba con los tres caudales usados en el estudio, donde la cepa de *E. coli* presenta más resistencia que la cepa de *S. aureus*. Finalmente la termoultrasonicación llega a valores similares con la pasteurización porque logra la reducción de la carga microbiana hasta un recuento de $<1 \times 10^1$ UFC/mL a tiempos 1 y 3 min de exposición. Con respecto al valor nutricional de la leche donde se observó que el método de radiación UV, a los caudales de 1,3 y 7 L/min no afecta el porcentaje de proteína, grasa y lactosa, pero a un caudal de 13 L/min ocasiona el descenso del porcentaje de grasa y lactosa principalmente, hasta valores que no estarían en norma. Concerniente a la termoultrasonicación los porcentajes de proteína, grasa y lactosa se mantienen sin alteración alguna

durante el tiempo de tratamiento. De cara a los futuros estudios sobre la repercusión del método de conservación, sería conveniente analizar este fenómeno con otras matrices alimentarias.

Palabras Clave: Radiación UV, termoultrasonificación, contaminación, valor nutricional, leche,

1. Introducción

En la industria alimentaria durante mucho tiempo ha buscado controlar la carga microbiana junto con la conservación de las propiedades nutricionales del alimento, la industria láctea no sería la excepción, porque se aplica el tratamiento térmico como método de conservación, por ello en algunos casos la inocuidad alimentaria está acompañada con la pérdida de las características organolépticas y nutricionales. Al pasar el tiempo se han ido desarrollando nuevas alternativas de procesamiento y remergiendo otras tecnologías que no fueron estudiadas a profundidad, las llamadas “*Emerging Technologies*” como la aplicación de ondas ultrasónicas, presiones altas, campos magnéticos entre otros, que puedan reducir la carga microbiana (Illanes *et al.*, 2018), de modo que se puede recurrir al estudio de tecnologías no térmicas como radiación ultravioleta y la termoultrasonificación para la conservación de los alimentos.

En los últimos años se ha buscado el desarrollo de tecnologías y procesos para garantizar la inocuidad y calidad de la leche, así como para poder obtener de un periodo de vida útil apropiado para su comercialización a nivel local y reducir retiro del producto de los puestos de venta. Es importante resaltar que existe la tendencia actual a la demanda de alimentos menos procesados, inocuos y que garanticen la seguridad al consumidor; porque la leche puede ser fuente de cuadros de infección o intoxicación alimentaria (ETA's).

La aplicación de la radiación ultravioleta (UV) sobre la leche busca reducir el crecimiento de microorganismos, adicionalmente como una alternativa de desinfección que ofrece ventajas desde el punto de vista logístico, llegando a no generar residuos en el alimento y no existen restricciones por las entidades reguladoras (López *et al.* 2005). En el caso

específico de la termoultrasonificación se señala que su costo es relativamente bajo comparado a otras tecnologías, además que la adquisición, instalación y manejo de los equipos es más sencillo.

Ambas tecnologías han sido ampliamente utilizadas en la inactivación de mohos, levaduras y bacterias en diversos tipos de alimentos donde se ha comprobado que al cambiar alguna de las variables de tratamiento son eficaces.

La evaluación del efecto de la aplicación de la radiación ultravioleta y termoultrasonificación frente a la pasteurización como método de conservación control, presento cinco etapas en el presente estudio: 1) diseño y construcción de un sistema de radiación UV para la leche, 2) comparación del efecto sobre bacterias Gram (+) y Gram (-), 3) impacto sobre el valor nutricional de la leche que fue tratada por los tres métodos de conservación, 4) efecto sobre las propiedades fisicoquímicas de control de la leche y 5) conocimiento de la vida útil de la matriz tras haber sido sometido a los métodos de conservación evaluados.

2. Marco teórico

2.1 Definición de la leche.

La denominación de leche, sin indicación de la especie animal de que procede, se reserva a la *leche de vaca*. Toda leche que proceda de una hembra lechera, que no sea la vaca debe designarse por la denominación leche seguida de la especie animal de la que procede: leche de cabra, leche de Oveja (Agudelo, 2005). Podemos encontrar varias definiciones para el término de leche entre los cuales podemos destacar: *Desde el punto de vista normativo*; según la norma boliviana (NB) 320013:2013. Define a la leche como: *un líquido limpio y fresco, producto del ordeño higiénico, obtenido de la segregación de las glándulas mamarias de vacas sanas, exenta de calostro y sustancias neutralizantes, conservantes y libre de inhibidores. Sin ningún tipo de adición y extracción de sus componentes.*

Desde el punto de vista nutricional la leche se definiría como *un alimento puro más próximo a la perfección. Su principal proteína, la caseína, contiene los aminoácidos esenciales y como fuente de calcio, fósforo y riboflavina (vitamina B12), contribuye significativamente a los requerimientos de vitamina A y B1 (tiamina). Por otra parte, los lípidos y la lactosa constituyen un importante aporte energético.*

2.1.1 Composición de la leche.

La leche es un fluido biológico complejo, cuya composición y propiedades físicas varían de una especie a otra en función de las necesidades dietéticas de las crías, así como también existe un amplio margen de variación, e incluso entre individuos de una raza de la misma especie

Se sabe que la leche ofrece constituyentes integrados por agua en su fracción líquida y en la que se hallan en suspensión o disolución tanto componentes nutritivos energéticos (*grasas e hidratos de carbono*) como elementos nutritivos plásticos (*proteínas y minerales*). Entre los biocatalizadores figuran pigmentos, enzimas y vitaminas. De hecho, la leche contiene cantidades adecuadas de casi todas las vitaminas necesarias para el funcionamiento correcto de los procesos bioquímicos que se producen en el organismo humano y que son esenciales para su correcto funcionamiento. Sin embargo, los factores intrínsecos del alimento lo hacen vulnerable a contaminación microbiana, que por un lado, ocasionaría una enfermedad por transmisión por los alimentos (ETA's) o deterioro y acortamiento de la vida útil del mismo.

En la Tabla 1, se refleja la composición general de la leche de vaca. Los datos cuantitativos que se recogen son sólo aproximados, ya que varían en función de múltiples factores. De hecho, debe quedar claro que la composición exacta de una muestra de leche únicamente se puede conocer mediante su análisis químico pormenorizado (Amiot *et al.*, 1991).

Tabla 1. Composición de la leche de vaca (Bendicho et al., 2002)

	Composición (g/l)	Estado físico de los componentes
· Agua	905	Agua libre (disolvente + agua ligada (3,7%))
· Glúcidos: lactosa	49	Solución
· Lípidos	35	
Materia grasa propiamente dicha.....	34	Emulsión de los glóbulos grasos (3 a 5 micras)
Lecitina (fosfolípidos)	0,5	
Parte insaponificable (esteroles, carotenos, tocoferoles)	0,5	
· Prótidos	34	Suspensión micelar de fosfocaseinato de cal
Caseína	27	(0,08 a 0,12 micras)
Prótidos "solubles" (globulinas, albúminas)	5,5	Solución (coloidal)
Sustancias nitrogenadas no proteicas.....	1,5	Solución (verdadera)
· Sales	9	Solución o estado coloidal (P y Ca)
Del ácido cítrico (en ácido)	2	(Sales de K, Ca, Na, Mg, etc.)
Del ácido fosfórico (P ₂ O ₅)	2,6	
Del ácido clorhídrico (NaCl)	1,7	
· Componentes diversos (vitaminas, enzimas, gases disueltos)	indicios	
· Extracto seco (total).....	127	
· Extracto seco desengrasado	92	

2.1.2 Producción lechera.

En el departamento de La Paz en la provincia Omasuyos se encuentra la cuenca lechera del altiplano que desde 1985 se encuentran organizados a nivel de *módulos comunales* y mediante estas a una asociación provincial de productores de leche.

La actividad lechera en la zona fue impulsada de manera importante desde 1973 por el Programa de Fomento Lechero (PROFOLE), el mismo que obedecía a una política orientada a mejorar los niveles nutricionales en el país mediante el consumo de leche fluida. Pese a que la actividad en el país y principalmente dentro el cordón lechero del altiplano paceño creció de manera importante, los niveles de consumo de leche en nuestro país (38 - 40 L/año/persona) sigue siendo bajo en relación a los niveles recomendados por la FAO (150 L/año/persona). La producción primaria de leche en el Municipio de Achacachi, durante los últimos 7 años contó con el importante apoyo del Programa de Desarrollo Lechero del Altiplano (PDLA), quien al

margen de fortalecer la producción de leche, apoyó hacia otros niveles dentro la cadena productiva de la leche, logrando viabilizar por ejemplo el acceso al crédito, transformación y/o elaboración de derivados lácteos, sanidad y nutrición animal, fortalecimiento organizacional, formación de promotores de sanidad animal y peritos lecheros con cuya participación la actividad hoy en día se ve fortalecida.

En la actualidad las industrias lecheras como PIL, DELIZIA, LACTEOSBOL principalmente acopian esta materia prima. Donde solo por mencionar como dato Lacteosbol procesa de 18000 a 20000 L/día.

2.1.3 Leche y productos lácteos.

Según el *Codex Alimentarius*, por producto lácteo se entiende un *producto obtenido mediante cualquier elaboración de la leche, que puede contener aditivos alimentarios y otros ingredientes funcionalmente necesarios para la elaboración*. La diversidad de productos lácteos varía considerablemente de región a región y entre países de la misma región, según los hábitos alimentarios, las tecnologías disponibles de elaboración de la leche, la demanda de mercado y las circunstancias sociales y culturales.

El consumo per cápita de leche y productos lácteos es mayor en los países desarrollados, pero la diferencia con muchos países en desarrollo se está reduciendo. La demanda de leche y productos lácteos en los países en desarrollo está creciendo como consecuencia del aumento de los ingresos, el crecimiento demográfico, la urbanización y los cambios en los regímenes alimentarios. Esta tendencia es más pronunciada en Asia oriental y sudoriental, especialmente en países muy poblados como China, Indonesia y Viet Nam. La creciente demanda de leche y productos lácteos ofrece a los productores (y a otros actores de

la cadena láctea) de las zonas perirurbanas de alto potencial productivo una buena oportunidad para mejorar sus medios de vida mediante el aumento de la producción.

Considerando el volumen, la leche líquida es el producto lácteo más consumido en todo el mundo en desarrollo. Tradicionalmente, la demanda de leche líquida es mayor en los centros urbanos y la de leche fermentada en las zonas rurales, pero los productos lácteos procesados están adquiriendo una creciente importancia en muchos países.

2.1.4 La cadena láctea.

Las cadenas lácteas vinculan a los protagonistas y actividades involucrados en la entrega de la leche y los productos lácteos al consumidor final; con cada actividad, el producto aumenta de valor. Una cadena láctea puede abarcar la producción, transporte, procesamiento, envasado y almacenamiento de la leche. Estas actividades necesitan insumos, como financiación y materias primas, que se utilizan para añadir valor y para hacer llegar los productos lácteos a los consumidores. Cada participante en la cadena debe dar al producto el mayor valor añadido al costo mínimo.

Establecer una cadena láctea eficaz, higiénica y económica no es una tarea fácil en muchos países en desarrollo, debido, entre otros, a:

- las dificultades para establecer un sistema viable de recolección y transporte de la leche, a causa de los pequeños volúmenes de leche producida por explotación y a la lejanía de los lugares de producción.
- al estacionalidad de la oferta de leche.
- las deficiencias en materia de tecnología y conocimientos para la recolección y el procesamiento de la leche.

- las distancias de los lugares de producción a las unidades de procesamiento y de ahí hasta los consumidores;
- las dificultades para establecer instalaciones de refrigeración.

2.2 Legislación y normativa.

Según la Constitución Política del Estado Plurinacional de Bolivia, **Artículo 16** cita *“que toda persona tiene derecho al agua y a la alimentación, donde el estado tiene la obligación de garantizar la inocuidad alimentaria”*. Y en el **Artículo 75** menciona que *“los consumidores gozan al suministro de alimentos, fármacos y productos en general en condiciones de inocuidad”*. Así mismo debemos mencionar la definición que proporciona la OMS/OPS para inocuidad *“Alimentos respecto de los cuales hay una garantía de que no causarán daño al consumidor y proporcionarán el valor nutricional previsto”*.

Por lo descrito anteriormente la industria alimentaria y el gobierno de estado por medio de las gobernaciones y alcaldías comparten la responsabilidad de asegurar que los alimentos proporcionados al consumidor sean seguros y que no se conviertan en un foco de brote o de contagio de enfermedades transmisibles por alimentos. Esta responsabilidad compartida es de amplio alcance con el fin de asegurar que se cumplan las expectativas del consumidor, procurar que los alimentos no sean alterados y que sean procesados adecuadamente.

El control de la inocuidad de los alimentos juega un rol muy importante en la salud del ser humano. Por esta razón se trata de un campo que se rige por numerosas normas y directrices que abarcan cada uno de los distintos ámbitos en la industria de alimentos, desde la producción de materia prima, hasta el muestreo que ha de realizarse para el control de la inocuidad de los productos, incluyendo los límites establecidos para cada para cada parámetro

medido, este control normativo no solo se aplica a los centros productores, sino también a los laboratorios.

2.2.1 Normativa.

2.2.1.1 Productos lácteos- Leche cruda y fresca.

Dentro de la normativa boliviana (Tabla 2), se describen los requerimientos microbiológicos para leche cruda y fresca.

Tabla 2. Requerimiento microbiológico de la leche cruda y fresca NB: 33013-2013 (IBNORCA).

Parámetros	Valor de referencia	Norma de referencia
TRAM (Tiempo de reducción de azul de metileno)	>1 hora	NB 33013-2013
Recuento total bacterias mesófilos	< 4 x10 ⁶ UFC/mL	NB 33013-2013
Recuento de células somáticas	< 1x10 ⁴ UFC/mL	NB 33013-2013
Bacterias esporulados	< 1x10 ² UFC/mL	NB 33013-2013

Así mismo debemos hacer mención a los requisitos de composición (Tabla 3) y parámetros fisicoquímicos (Tabla 4) según norma boliviana, los mismos deben ser cumplidos para poder ser comercializados a la población.

Tabla 3. Requisitos de composición de la leche cruda y fresca NB: 33013-2013 (IBNORCA).

Parámetros	Valor de referencia	Norma de referencia
Materia grasa mínimo %	3.00	NB 33013-2013
Proteínas mínimo %	3.00	NB 33013-2013
Lactosa mínimo %	4.50	NB 33013-2013
Cenizas máximo %	0,70	NB 33013-2013
Solidos totales mínimo %	11,2	NB 33013-2013

Tabla 4. Requisitos fisicoquímicos de la leche cruda y fresca NB: 33013-2013 (*IBNORCA*).

Parámetros	Valor de referencia	Norma de referencia
Acidez titulable (ácido lactico) %	0,13 a 0,18	NB 33013-2013
Impurezas macroscópicas	Maximo Disco B	NB 33013-2013
Densidad a 20°C g/mL	1,028-1,034	NB 33013-2013
Punto crioscopico °C	-0,510 a -0,540	NB 33013-2013
2.3 Prueba de alcohol 70-83%	Negativo	NB 33013-2013
pH a 20°C	6,60-6,80	NB 33013-2013
Materia grasa en %	Mínimo 3,00	NB 33013-2013
Solidos no grasos %	Mínimo 8,2	NB 33013-2013

Inocuidad alimentaria.

El trasfondo del control de la inocuidad alimentaria radica en dos posibles escenarios, el primero la generación de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's) donde los afectados serían los consumidores dependiendo del grupo etario (niños, adultos mayores) y condición fisiológica (mujeres en gestación y personas inmunodeprimidas); y el segundo escenario donde la contaminación microbiana altera las características organolépticas del producto ocasionando pérdidas para la industria alimentaria por el gran número de unidades por lote de producción.

2.3.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's) constituyen una causa importante de estrés negativo, muertes evitables y carga económica innecesaria (OMS/OPS), causando aproximadamente 76 millones de enfermedades, 325,000 hospitalizaciones y 5,000 muertes en los Estados Unidos cada año (Garay *et al.*, 2011). Las enfermedades transmitidas

por los alimentos son un sinónimo de incomodidad y ausentismo laboral. Para algunos, especialmente niños en edad escolar, adultos mayores que residen en instituciones de atención médica y aquellos con sistemas inmunológicos comprometidos, las enfermedades transmitidas por los alimentos son más graves e incluso mortales.

Se calcula que el costo anual por atención médica en casos de las enfermedades transmitidas por los alimentos está entre los 10 mil y los 83 mil millones de dólares (OMS/FAO). La naturaleza de los alimentos y de las enfermedades transmitidas por los mismos han cambiado drásticamente en el último siglo, a pesar de que muchos adelantos tecnológicos como la *pasteurización* y *sistemas óptimos de envasado* han eliminado algunas enfermedades pero por otro lado la incorporación de un sistema de gestión de calidad, buenas prácticas de manufactura (BPM) y el sistema de análisis de puntos críticos de control (HACCP) entre otros; han identificado nuevas causas de enfermedades transmitidas por los alimentos.

Debemos considerar que la vigilancia de los alimentos es compleja debido a diversos factores. (i) falta de notificaciones de casos. A pesar de que los casos pueden ser severos e incluso mortales, los casos más leves a menudo no son detectados mediante los sistemas de vigilancia de rutina. (ii) muchos de los patógenos que son transmitidos a través de los alimentos también pueden ser transmitidos a través del agua o de persona a persona, lo cual hace que el rol de la transmisión vía los alimentos sea confuso y (iii) Finalmente, los patógenos o agentes que aún no han sido identificados, y que por ende no pueden ser diagnosticados, también suelen provocar un porcentaje elevado de casos (Lahou *et al.*, 2014).

En repetidas ocasiones los datos de brotes epidemiológicos han identificado cinco factores de riesgo importantes asociados con el comportamiento de empleados y con prácticas

de preparación utilizadas en establecimientos de venta al por menor y de servicio de alimentos que contribuyen a la proliferación de las ETA's. El *Codex Alimentarius* aborda el uso de controles para detectar factores de riesgo y establece 5 medidas: 1) temperaturas de mantenimiento incorrectas 2) cocción inadecuada. 3) equipos y utensilios contaminados 4) alimentos provenientes de fuentes inseguras. 5) higiene personal deficiente.

Específicamente, estas medidas son: demostración de conocimiento, controles de salud para los empleados, control de las manos como medio de contaminación, parámetros de tiempo y de temperatura para el control de patógenos y el servicio de información al consumidor. Enmarcando como objetivo de seguridad alimentaria: mejorar la conducta de los empleados que manipulan los alimentos y las prácticas de preparación de estos, que están directamente relacionados con las ETA's.

2.3.2 Deterioro de los alimentos.

El deterioro de los alimentos va relacionado directamente con aspectos bióticos y abióticos, en el primer caso se refiere al deterioro por microorganismos cuyo desarrollo en la matriz puede generar la producción de toxinas o alteración de las características organolépticas del alimento. Esto sucede por los siguientes factores: factores intrínsecos (características propias del alimento), factores extrínsecos (condiciones de almacenamiento) y factores implícitos (capacidad de desarrollo por el microorganismo en la matriz). Y en el segundo caso los factores abióticos se ven influenciados también por los dos primeros factores citados anteriormente (factores intrínsecos y factores extrínsecos). Porque los alimentos por su composición química y condiciones no apropiadas de almacenamiento pueden dar inicio a reacciones químicas no deseadas generando cambios en las características organolépticas del alimentos, por ejemplo, pardeamiento enzimático.

Por lo citado anteriormente, los alimentos necesitan ciertas condiciones de tratamiento, conservación y manipulación. Su principal causa de deterioro es el ataque por diferentes tipos de microorganismos (bacterias, levaduras y mohos). Esto tiene implicaciones económicas evidentes, tanto para los fabricantes (deterioro de materias primas y productos elaborados antes de su comercialización, pérdida de la imagen de marca, etc.) como para distribuidores y consumidores (deterioro de productos después de su adquisición y antes de su consumo, repercusiones sobre la salud del consumidor).

Los alimentos de alta calidad para el hombre, más demandados, son también los más altamente perecederos (carne y leche). Afortunadamente, se puede desarrollar procedimiento los alimentos más perecederos se pueden hacer estables y aceptables mediante la aplicación juiciosa de la tecnología actual. Con la aplicación apropiada de las tecnologías comerciales para la conservación de alimentos, la vida útil de los alimentos perecederos puede ser mejorada.

Como se mencionó anteriormente el deterioro de los alimentos puede ser por interacción de microorganismos o condiciones de almacenamiento. Sin embargo, tenemos que tener presente que los tratamiento de conservación a los que son expuestos también pueden ocasionar un deterioro.

2.4 Tecnologías de conservación de los alimentos.

Los alimentos pierden calidad desde el momento que son cosechados u obtenidos a través de cambios que son consecuencia de las reacciones físicas, químicas o microbiológicas. La conservación de alimentos es una continua lucha contra los microorganismos y elementos que deterioran o los hacen inseguros. Los microorganismos y las enzimas son los principales

agentes responsables del deterioro y deben por tanto ser los objetivos de las técnicas de conservación.

2.4.1 Condiciones básicas que debe tener un método de conservación.

Para poder ser considerado un método de conservación en el área de los alimentos se debe de cumplir los siguientes requisitos: eficacia, ausencia de toxicidad y no modificación de las características organolépticas o sensoriales, esto dependiendo de cada técnica de conservación.

- Incrementar la seguridad y durabilidad del producto inactivando microorganismos patógenos y alterantes.
- No debe de modificar los atributos organolépticos y nutricionales del alimento.
- No debe de dejar residuos
- Debe ser accesible y de fácil aplicación.
- No debe de tener nada objetable por consumidores y legisladores

La mayoría de los procedimientos de conservación inhiben agentes o procesos de deterioro. Algunas tecnologías (refrigeración) mantiene la frescura del producto, sin embargo, otras como la reducción de A_w (dsecación) o la modificación del pH, la cual la cambian notablemente. Ninguna técnica es capaz de garantizar la completa seguridad del alimento, ya que variaciones en las condiciones de preservación (ruptura de cadena de frio, rehidratación, entre otros) puede suponer el desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes.

Actualmente los tratamiento térmicos por calor (pasteurización, esterilización, etc.) son los únicos que operan por inactivación y que se usan de forma mayoritaria en la industria alimentaria. La inactivación de microorganismos y de enzimas permite la obtención de alimentos estables y seguros. Los tratamientos térmicos poseen la mayoría de las

características de un método ideal. Sin embargo, en algunos alimentos la gran termotolerancia de enzimas y microorganismos (especialmente esporas microbianas) hace necesaria la aplicación de tratamientos térmicos extremos, que afectan a las propiedades organolépticas y nutricionales del alimento.

2.4.2 Pasteurización.

Como se verá más adelante uno de los tratamientos de conservación convencional es la *pasteurización*, donde se busca la destrucción de microorganismos o esporas y la inactivación de enzimas con la finalidad de incrementar la vida comercial de la leche. Entre los indeseables, cambios en los componentes de la leche (proteínas, lípidos, carbohidratos y minerales) que alteran el aroma, color, la consistencia y reducen el valor nutritivo del producto. Por eso optimizar el tratamiento térmico sería maximizar los efectos deseables y minimizar los indeseables (Reuter., 1985). El principio general del proceso consiste en el empleo de la temperatura más alta posible en el tiempo más corto viable. Los avances experimentados en tecnología láctea, facilitan la obtención de estos objetivos.

Por ello Pellegrino (1995), describe dos grupos de parámetros de calentamiento en función de las principales reacciones y modificaciones que experimenta la leche tratada. El Tipo I, incluye desnaturalización, degradación e inactivación de compuestos termolábiles, entre ellos están proteínas del suero, enzimas y vitaminas. En las reacciones del Tipo II, incluye la formación de compuestos que no estaban presentes en la leche no procesada o que sólo estaban a nivel de trazas como lactulosa, hidroximetilfurfural, furosina, etc.

En el primer grupo además de efectuar un control según la carga de microorganismos inicial, se actuaría sobre la fosfatasa alcalina, la lactoperoxidasa y la gamma glutamil-transpeptidasa. Según el tratamiento térmico podríamos clasificar los procesos en: termización

que no tendría actividad sobre ninguna de las enzimas y la pasteurización LTST (del inglés low temperatura, long time), que mantendría activas la lactoperoxida y la gamma-glutamyl-transpeptidasa, el resto de los tratamientos inactivarían todas las enzimas.

En cuanto al Tipo II, los procesos pueden alterar cualquiera de los componentes de la leche y en especial uno de los componentes más importantes, las proteínas. La alteración de la calidad proteica tiene mucha importancia para la alimentación de sus consumidores y en especial si este producto se emplea en fórmulas infantiles en la alimentación de lactantes, pues a menudo constituye su única fuente proteica en una época en que el requerimiento de aminoácidos esenciales es muy alto. Dietas deficitarias en este tipo de aminoácidos no permiten un crecimiento adecuado y pueden ser responsables de un aumento de la morbilidad y la mortalidad, así como alteraciones cerebrales con dificultades en el lenguaje (Cheftel 1993).

2.4.2.1 Efecto del tratamiento térmico sobre la leche.

Podemos clasificar las alteraciones de los componentes de la leche por los tratamientos térmicos en:

- Interacciones entre los grupos laterales de los aminoácidos (AA) que dan lugar a la formación de enlaces pseudopeptídicos y de lisino-alanina. Las reacciones de este tipo favorecidas por un pH alcalino, origina AA no naturales como lantionina, aminoalanina, ornitina, ornitinoalanina, ácido diaminopropiónico y lisinoalanina. Estas reacciones disminuyen el valor nutritivo a causa de la baja biodisponibilidad de los aminoácidos lisina y arginina y pueden originar compuestos tóxicos.
- Reacciones de degradación de las cadenas laterales.

- Reestructuración de grupos sulfhidrilo (-SH), y disulfuro (S-S), estas reacciones son de especial interés en fórmulas para lactantes, con un elevado contenido en proteínas séricas, más ricas en grupos S-H que la caseína.
- Insolubilización de proteínas del suero por desnaturalización: las interacciones dan lugar a agregados poco solubles. La medida de la desnaturalización puede utilizarse para evaluar la intensidad del tratamiento térmico (Resmini 1989).
- Interacciones entre la Kappa-caseína y la Beta-lactoglobulina: se forman puentes disulfuro que al mantener unidas dichas proteínas, y pueden afectar a su digestibilidad.
- Interacciones con lípidos: pueden provocar el bloqueo de algún aminoácido y reducir la disponibilidad de los AA azufrados.
- Interacciones de carbohidratos con proteínas: reacción de *Maillard*, que se inicia con la reacción entre un grupo amino y un compuesto carbonilo. La lisina (AA esencial) es el más afectado por su doble grupo amino.

2.4.3 Tecnologías emergentes.

Los nuevos tratamientos de conservación, o mejor tratamientos emergentes, ya que muchos se conocen desde hace mucho tiempo atrás pero no se han optimizado la forma de aplicación en la preservación de los alimentos para que resulten suficientemente efectivos.

La radiación ultravioleta (UV) es una radiación no ionizante que posee propiedades germicidas especialmente en el rango 200-280 nm (Kuo et al., 1997) puede ser aplicada en alimentos líquidos. Favorece la oxidación de componentes del alimento como la fracción lipídica.

El ultrasonido son ondas sonoras con frecuencias superiores a las que puede percibir el oído humano (normalmente mayores de 16 kHz), la aplicación de ultrasonidos a medios líquidos se conoce como *sonicación*, durante su aplicación se producen zonas alternadas de compresión del medio y si el ultrasonido tiene suficiente energía, puede producirse *cavitación*,

fenómeno que afecta y daña las estructuras celulares de los microorganismos (Raso et al., 1998)

2.4.3.1 Irradiación de alimentos.

La irradiación de alimentos es un tema atractivo de mucho interés y comentarios “desafortunadamente muchos de ellos informados de modo inadecuado”. Por lo tanto, uno de los mayores retos en el amplio intervalo de intereses individuales en el mundo alimentario es informar bien sobre este proceso de conservación.

La irradiación de alimentos es un proceso “frio” de conservación de alimentos que han sido estudiados extensamente por más de 45 años. Los resultados beneficiosos, incluyendo la ampliación de la vida de almacenamiento de cultivos de raíces, desinfección de especias, frutas y cereales, reducción de la población de muchos microorganismos responsables del deterioro; retraso en la maduración de frutas; mejora en las propiedades de algunos alimentos; y la destrucción o reducción de *patógenos altamente inevitables que contaminan los alimentos*, especialmente los *alimentos crudos de origen animal*, se pueden conseguir sin la producción de radioactividad o compuestos tóxicos y sin pérdidas vitales en la calidad nutricional del producto alimentario. Los aspectos beneficiosos de este proceso están asociados con los temas de seguridad que están sujetos a muchos debates políticos y de seguridad pública, estimulados en una amplia extensión por individuos que a menudo están desinformados, y siembran confusión, así como por ciertos grupos de defensa del consumidor con experiencia y respetados.

Sobre las bases de un consenso internacional, en 1983 el Comité de la FAO/Comisión del Código Alimentario de la Organización Mundial de la Salud aceptaron la irradiación de alimentos como una tecnología segura y eficaz para el tratamiento de alimentos y adoptada por

el Código Estándar General para alimentos irradiados con un Código de Practicas asociado. Aunque la utilización de la irradiación continúa creciendo a lo largo de todo el mundo, la reacción negativa en algunos países restringe su uso corriente (Barbosa *et al*, 1999).

2.4.3.2 Aspectos históricos.

La irradiación de alimentos no es, como a menudo describen los medios de información, como una *nueva tecnología*. De hecho, la irradiación de alimentos es mucho más vieja y fue estudiada más rigurosamente que otras innovaciones de procesado y conservación introducidas por la industria alimentaria en los últimos años. La irradiación se utiliza ampliamente alrededor de todo el mundo para esterilizar los artículos médicos (Diehl. J.F., 1993).

La radiación primero fue patentada para la conservación de alimentos en 1905 por dos científicos británicos. La irradiación de alimentos se utilizó por primera vez en los Estados Unidos en 1921 para inactivar el parásito humano *Trichinella spiralis*, que contamina el músculo de cerdo (Ghosh, P., 1989).

La investigación internacional se intensificó en la década del 1940, cuando la irradiación fue considerada un medio para proporcionar alimentos seguros a las tropas de áreas remotas (...) (Diehl, 1993). En los Estados Unidos, la irradiación de alimentos fue aprobada en 1963 para el control de insectos en trigo y harina de trigo. Los astronautas de los Estados Unidos han estado comiendo alimentos irradiados desde 1972, cuando la tripulación del Apolo 17 seleccionó jamón de primera comida irradiada en el vuelo. La gente con inmunodeficiencias también se beneficia de los alimentos irradiados debido a que ayuda a reducir riesgos infección bacteriana (Lee P. R., 1994).

Tabla 5. Países que han aprobado la irradiación de alimentos (Loaharanu, 1995)

Alemania	España	Noruega
Argelia	Estados Unidos	Pakistán
Argentina	Filipinas	Polonia
Bangladesh	Finlandia	Reino Unido
Bélgica	Francia	Republica Checa
Brasil	Holanda	Rusia
Bulgaria	Hungría	Suráfrica
Canadá	India	Tailandia
Chile	Indonesia	Ucrania
China	Irán	Uruguay
Corea	Israel	Vietnam
Costa de Marfil	Italia	Yugoslavia
Croacia	Japón	
Cuba	México	
Dinamarca	Nueva Zelanda	

Hoy en día más de 40 países (Tabla 5) han aprobado más de 100 artículos alimentarios irradiados para consumo, tanto de forma incondicional o restringida (Loaharanu, 1995)

2.4.3.3 Marco normativo de irradiación de alimentos.

La irradiación de alimentos está aceptada en más de 40 países y avalada por el Codex Alimentarios, la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de la

Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas (FAO), la Organización Internacional de Energía Atómica (OIEA), la Organización Mundial del Comercio (OMC) y otras múltiples entidades de vigencia internacional.

Las legislaciones nacionales de los países que aceptan la irradiación de alimentos incluyen los detalles a ser consignados en el rótulo de los envases de los productos tratados. Todas ellas coinciden en el empleo del logotipo internacionalmente reconocido como indicador del tratamiento (Ehlermann., 2009)



Figura 1. Logotipo para alimentos tratados con radiación (Ehlermann, 2009).

2.4.4 Tipos de radiación.

La radiación se puede definir como la emisión y propagación de energía a través del espacio o de un medio material. En los alimentos es un método físico de conservación que presenta beneficios para prolongar el tiempo de vida útil para la comercialización de productos y mejorar su calidad higiénico-sanitaria (Suárez, 2001).

La aplicación de la radiación suele darse en dos formas: *radiación mecánica* que corresponde a ondas que sólo se transmiten a través de la materia, como las ondas de sonido y la *radiación electromagnética* que es independiente de la materia para su propagación. Sin

embargo, la velocidad, intensidad y dirección de su flujo de energía se ven influenciados por la presencia de materia.

La radiación electromagnética se divide en dos grandes tipos de acuerdo al tipo de cambios que provocan sobre los átomos en los que actúa: *radiación ionizante* y *radiación no ionizante*.

2.4.4.1 Radiación ionizante.

Según Rubio *et al.*, (2017) es el proceso por el cual los electrones son desplazados de átomos y moléculas. Cuyo proceso puede generar cambios moleculares incluyendo la alteración del ADN y efectos potencialmente dañinos para los tejidos biológicos, siendo aquella radiación capaz de producir iones al quitar o agregar un electrón a un átomo donde irradia. Por un lado, existen dos formas: la radiación ionizante directa que consta de partículas cargadas, que son los electrones energéticos como los positrones, los protones, las partículas alfa, los mesones cargados, los muones y los iones pesados (átomos ionizados) y la radiación ionizante indirecta que es producida por partículas sin carga como los rayos X, rayos gamma y todos los neutrones (Laegreid *et al.*, 1999).

2.4.4.2 Radiación no ionizante.

Según Gonzales (2009) como la frecuencia es más baja no es suficiente para romper los enlaces químicos; esta radiación puede generar la excitación electrónica de las moléculas, aunque no su ionización, y la excitación puede favorecer algún tipo de reacción química. Actualmente se está haciendo uso de la radiación en alimentos en los siguientes aspectos: prevención de ETA's, conservación de alimentos, control de insectos, retraso de la germinación, la maduración y esterilización.

Las radiaciones no ionizantes, son aquellas que no poseen la suficiente energía para ionizar. La gama de radiaciones no ionizantes es muy amplia, siendo las de mayor importancia la radiación ultravioleta (UV), los rayos láser, infrarrojos, visibles y campos electromagnéticos (Gutteridge et al., 1993).

2.4.5 Radiación ultravioleta.

La radiación ultravioleta (UV-C) (rango de longitud de onda de 200–280 nm) es una forma de radiación no ionizada que no penetra más allá de las superficies y es generalmente conocida como germicida (particularmente a longitudes de onda cercanas a 254 nm). El mecanismo de desinfección se basa en un fenómeno físico por el cual las ondas cortas de la radiación ultravioleta inciden sobre el material genético (ADN) de los microorganismos, y los destruye en corto tiempo, sin producir cambios físicos o químicos sobre la matriz tratada (Suárez, 2013).

En el espectro electromagnético la radiación UV se sitúa desde el violeta en el visible prolongándose hasta la región de los rayos X. Esto corresponde a las longitudes de onda en el rango 100-400 nm. Como podemos observar en la Figura 2, la región UV se puede dividir en cuatro secciones: UV-A, UV-B, UV-C y UV de vacío. La radiación UV-A (315-400 nm) es la responsable de los cambios de color en la piel por favorecer la síntesis de melanina cuando estamos expuestos al sol; la UV-B (280-313 nm) corresponde a la radiación solar que causa quemaduras y puede llegar a producir cáncer de piel; La UV-C (100-280 nm) es la más efectiva en la inactivación de enzimas, virus, y bacterias. El rango 100-200 nm se denomina vacío ya que la radiación UV de esta longitud de onda solo se puede transmitir en el vacío.

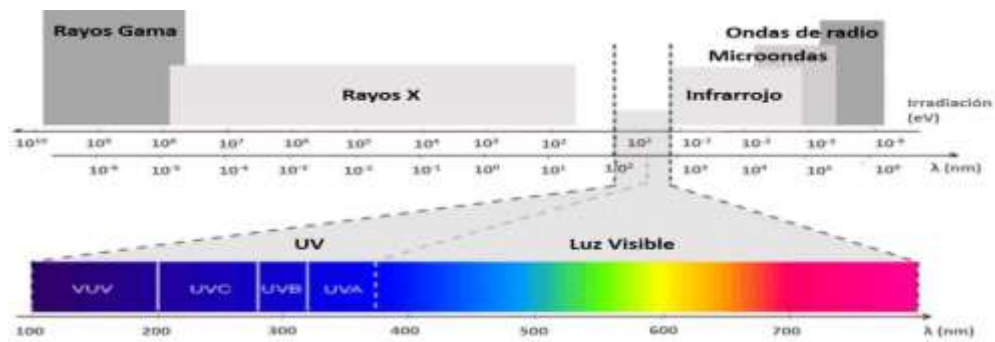


Figura 2. Espectro de radiación electromagnética (Fernández, 2016).

La radiación más efectiva en preservación de alimentos es la de 200-280 nm (Begum, 2009), este rango de radiaciones son UV-C o de radiación UV de alta energía. La irradiación ultravioleta (UV-C) es una tecnología alternativa a la esterilización química utilizada para reducir el crecimiento de microorganismos en alimentos. De igual forma se ha observado que el tratamiento con UV-C induce la acumulación de poliaminas, las cuales pueden actuar como antioxidantes en frutos causando una reducción de los síntomas de deterioro por microorganismos. En la figura 3, se observa el rango germicida por radiación UV.

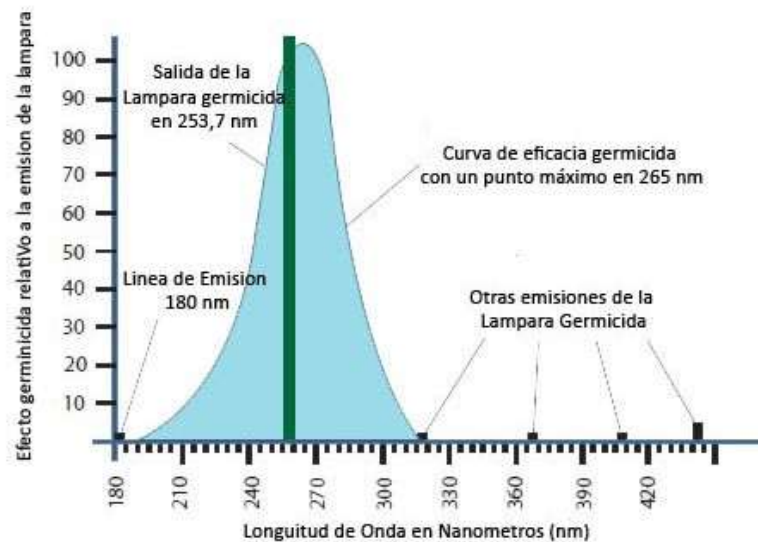


Figura 3. Rango germicida (Sozer, 2009).

2.4.5.1 Mecanismo de acción de la técnica considerada.

El método consiste en aplicar la radiación UV (200-280 nm) sobre la superficie de alimentos a tratar con el fin de reducir la población de microorganismos alterantes o patógenos. Este tipo de radiación no tiene una gran capacidad de penetración por lo que debe utilizarse en la esterilización superficial de alimentos. *En el caso de alimentos líquidos el fluido debe ser conducido a una celda de tratamiento de pequeño espesor para poder aplicar una dosis de radiación adecuada en todo el volumen.*

La radiación UV produce daños en el ADN microbiano y en menor medida desnaturalización de proteínas (Lucht *et al*, 1998). Durante la aplicación de radiación UV se producen lesiones en el ADN distribuidas aleatoriamente entre la población microbiana tratada. Las células que son incapaces de reparar el ADN dañado y mueren otras células dañadas subletalmente sufren mutaciones que reducen su viabilidad o su capacidad de producción. *La radiación UV de 254 nm induce la formación de dímeros de pirimidina* lo que distorsiona la estructura de la hélice de y bloquea la replicación celular (Lado y Yousef, 2002).

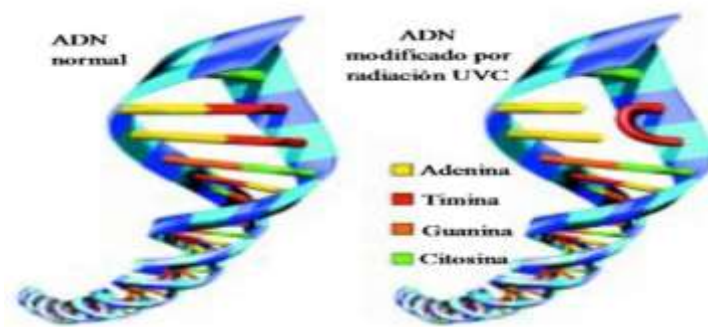


Figura 4. Modificaciones en el ADN debido a tratamiento con radiación UV (Lado y Yousef, 2002)

La utilización de UV-C se recomienda en asociación con otras técnicas de preservación, debido a que el daño acumulativo sobre el ADN es efectivo en la reducción de la población microbiana total, *pero no produce una esterilización completa*. Aunque la radiación más efectiva es la que se encuentra en el rango 200-280 nm, la radiación con UV de longitud de onda en el rango 320-280 nm produce radicales hidroxiperóxido que reaccionan con los ácidos grasos insaturados de la membrana lo que induce cambios en su permeabilidad, por lo que también tiene un cierto efecto favorable sobre la viabilidad celular. (Bintsis *et al*, 2000).

Indirectamente la radiación UV se puede utilizar también para proteger tejidos vegetales por la inducción de mecanismos de resistencia en frutas y vegetales contra patógenos. La exposición a UV-C induce la síntesis de compuestos como antocianinas y estebenoides con repercusiones positivas para la salud y algunas con efecto bacteriostático o antifúngico.

2.4.5.2 Microorganismos alterantes y/o patógenos susceptibles/sensibles.

Los factores más importantes son el estado fisiológico del microorganismo (fase de latencia, crecimiento, fase estacionaria, ...), la variabilidad de cepas, los mecanismos de reparación y la asociación a partículas (Hijnen *et al*, 2006).

Como en otros casos las esporas y formas de resistencia en general presentan una menor sensibilidad debido a la composición de composición estructural de la forma no vegetativa del microorganismo impidiendo el paso de la radiación UV al interior y el daño de ADN, y de otras estructuras celulares.

2.4.5.3 Factores relacionados con las condiciones de tratamiento.

En el tratamiento continuo de alimentos líquidos es fundamental el tiempo de residencia de fluido a tratar en la celda de tratamiento en la que va estar en contacto con la radiación ultravioleta. La dosis de radiación recibida será función del tiempo de permanencia en esta celda (Hijnen et al, 2006). También influyen los fenómenos de adsorción, reflexión y refracción de la radiación UV-C que puedan reducir la dosis de radiación que reciban los microorganismos presentes en un alimento y por tanto afecten a la efectividad del método. En el caso de sólidos la preservación con UV-C es solo válida para superficies.

Finalmente deben ser considerados los factores que afecten a la intensidad emitida por la lámpara UV debiendo considerarse la vida útil de la lámpara y si la intensidad es constante con el tiempo. Además, algunos tipos de microorganismos pueden ser más sensibles a la radiación UV-C policromática que monocromática (Malley *et al.*, 2004).

2.4.5.4 Sensibilidad de microorganismos a UV-C.

Para una desinfección eficaz es importante conocer la dosis de radiación ultravioleta necesaria para reducir la carga microbiana (Gonzalez, 2009). La dosis de radiación UV-C se obtiene del producto entre la intensidad y el tiempo de reacción esta relación se muestra en la *Ec. 1*. La intensidad (I) es la cantidad de energía de radiación UV-C por unidad de área, medida en watts por metro cuadrado. El tiempo de reacción o de contacto (t) es el tiempo que el fluido es expuesto a la radiación UV-C en el fotoreactor (medido en segundos).

La dosis de radiación UV-C (D) es expresada en J/m^2 (1 Joule = 1 Watt * segundo); aunque también suele expresarse en J/cm^2 .

$$D = I * t \quad (\text{Ec. 1})$$

Cuando se ha estudiado el efecto del UV-C sobre poblaciones de virus y bacteriófagos la máxima reducción de población se ha situado en 5,4 log₁₀ utilizando intensidades de 50 mJ/m⁻² (Maier et al, 1995).

Tabla 6. Sensibilidad al UV de distintos tipos de virus (Hijnen *et al*, 2006)

Virus	Intensidad UV mJ/cm ²	Tipo	Reducción de población Log ₁₀
Polivirus tipo 1	5-50	Monocromática	5,4
Adenovirus ST2, 15, 40, 41	10-300	Monocromática	6,4
Rotavirus SA-11	5-50	Monocromática	4,1
Calicivirus felino, canino	4-50	Monocromática	5,5
Calicivirus bovino	4-30	Monocromática	5,7
Hepatitis A	5-30	Monocromática	5,4
Coxsackie virus B5	5-40	Monocromática	4,8

En la Tabla 6, podemos notar que los *Adenovirus* se encuentran entre los más resistentes a radiación UV, esto se ha corroborado por otros autores (Nwachuku et al, 2005). La utilización de radiación UV en el rango 220-280 nm es la más efectiva en la eliminación de *Adenovirus* que la radiación de 254 nm.

También se ha demostrado que la radiación UV monocromática es menos efectiva en el tratamiento de *Rotavirus* SA-11 (Malley et al, 2004).

Las células vegetativas de bacterias son significativamente más susceptibles a la radiación UV que los virus. En la Tabla 6 resume la sensibilidad de distintos patógenos alimentarios y/o contaminantes de aguas a la radiación UV-C monocromática o policromática es similar (Oguma et al, 2002; Oguma et al, 2004).

Tabla 7. Sensibilidad al UV de distintas bacterias (Hijnen et al, 2006)

Bacterias	Intensidad UV mJ/cm²	Tipo	Reducción de población Log₁₀
<i>Salmonella typhi</i>	2-10	Monocromática	5,6
<i>Campylobacter jejuni</i>	0.5-6	Monocromática	5,3
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,6-5	Monocromática	5,0
<i>Shigella dysenteriae</i>	1-5	Monocromática	5,9
<i>Shigella sonnei</i>	3-8	Monocromática	4,7
<i>Vibrio cholerae</i>	0,6-4	Monocromática	5,8
<i>Legionella pneumophila</i>	1-12	Monocromática	4,4
<i>Escherichia coli O157:H7</i>	1-7	Monocromática	5,5
<i>Escherichia coli</i>	1-15	Monocromática	6,0
<i>Enterococcus faecalis</i>	2,5-16	Monocromática	4,6
<i>Bacillus subtilis</i>	5-78	Monocromática	4,0
<i>Clostridium perfringens</i>	48-64	Policromática	3,0

Las esporas aeróbicas de *Bacillus subtilis* y las esporas anaeróbicas de *Clostridium perfringens* son menos sensibles a UV-C que las formas vegetativas bacterianas (Tabla 7) y también más que la mayoría de virus y bacteriófagos (Tabla 6).

2.4.5.5 Mecanismos de resistencia microbiana.

La resistencia a los tratamientos de preservación con UV-C es muy variable dependiendo del tipo de microorganismo, estado fisiológico y mecanismo de reparación de la

célula. Se ha observado una baja resistencia a la radiación UV por bacterias ambientales en estudios con coliformes termotolerantes (Watecare, 2002). La aparición de fenómenos de resistencia a la radiación UV sobre microorganismos ambientales es más explícita en esporas bacterianas; y formas vegetativas que en virus y bacteriófagos (Hijnen et al, 2006). Se ha demostrado, que en general existe una mayor resistencia a UV-C en microorganismos procedentes del medio ambiente que en aquellos cultivados en laboratorio.

El estado fisiológico afecta de forma muy importante a la resistencia a UV-C (Martiny et al, 1990, Mofidi et al, 2002) *demonstraron que la menor resistencia* de las bacterias a tratamiento por radiación UV se produce en la fase de *crecimiento bacteriano*, con la mayor sensibilidad en la fase de crecimiento activo y la mayor resistencia a UV en la fase estacionaria de crecimiento.

Se ha demostrado también que cepas diferentes de *Escherichia Coli* poseen distinta sensibilidad a la radiación UV (Sommer et al, 1998; Sommer et al, 2000). Se ha observado que la distinta resistencia entre las cepas estudiadas permite que las reducciones de población oscilen 5,8 y 3,7 log (Malley *et al*, 2004)

2.4.5.6 Efectos sobre las propiedades sensoriales de los alimentos.

El principal problema en cuanto a propiedades sensoriales es que la radiación UV puede generar hidroperóxidos que pueden afectar a la fracción grasa o iniciar reacciones de oxidación en moléculas susceptibles.

2.4.5.7 Efectos sobre la estructura

No se han encontrado datos que respalden una modificación de la estructura de los alimentos al aplicar dosis normales de radiación UV-C, aunque los alimentos más problemáticos pueden ser aquellos con un alto contenido en grasas insaturadas por la reacción de oxidación que fue mencionado en el apartado anteriormente mencionado.

2.4.6 Aplicaciones industriales

La radiación UV-C generada artificialmente se utiliza ampliamente en industria alimentaria en distintas aplicaciones antimicrobianas como desinfección de agua, aire, preparación de superficies alimentarias, desinfección de contenedores (Wang *et al*, 2005) y desinfección de superficies de productos vegetales (Marquenie *et al*, 2002).

Se ha utilizado radiación UV con intensidades en el rango $0,5-20 \text{ J/m}^2$ para el tratamiento de productos sólidos como la superficie de productos cárnicos o la cascara del huevo y líquidos como zumo de naranja (Kuo *et al*, 1997; Bintsis *et al*, 2000).

2.4.6.1 Frutas y verduras

Se ha verificado la eficacia de la utilización del UV-C asociada a tratamientos térmicos suaves para controlar el deterioro pos cosecha de fresas y cerezas. En la mayoría de los casos se puede conseguir una inactivación fúngica y bacteriana asociada a dosis de UV-C de 10 kJ/m^2 con tratamientos térmicos suaves de larga duración ($45 \text{ °C}/15 \text{ min}$) (Marquenie *et al*, 2002). Se ha observado una mayor efectividad cuando la irradiación UV precede al tratamiento térmico.

Una aplicación muy atractiva fue hecha en lechuga (*Lactuca sativa*) fresca o pre cortada y otros vegetales se comercializan mínimamente procesados para la elaboración de

ensaladas. La utilización de dosis de UV-C 0,4 a 8,14 kJ/m² y posterior almacenamiento durante 10 días a 5 °C permite reducir la población de bacterias psicotrofas, coliformes, levaduras y estimular respiración mejorando su conservación (Allende y Artes, 2003a). También se ha observado que la radiación UV-C que permite el crecimiento selectivo de bacterias lácticas posiblemente por reducción de la microbiota competitiva (Allende y Artes, 2003b). Las dosis más elevadas (2,44-8,14 kJ/m²) permiten incrementar el brillo de los tejidos y reducir el pardeamiento.

2.4.6.2 Zumos

La aplicación más versátil de la radiación UV es el tratamiento *continuo de alimentos líquidos*. Se trabajaron con zumos de frutas (naranja, manzana y multifrutas) con diferente capacidad de absorción e inoculados con la cepa patógena de *E. coli* O157:H7EDL 933 y bajo diferentes condiciones de operación (capa fina y agitación). Estos autores observaron que cuando trataban zumos inoculados con poblaciones de 10⁵ – 10⁷UFC/mL y les aplicaban dosis de UV-C (254 nm) de 0 – 6 J/cm² reduce la población inicial de forma significativa (Oteiza *et al.*, 2005).

2.4.6.3 Lácteos.

Las primeras aplicaciones de radiación UV en lácteos se dirigieron a favorecer la fotoactivación de vitamina D en la leche (Steenbock, 1928) y se sugieren ya la posible aplicación en la esterilización de la leche sin embargo los resultados obtenidos no son lo suficientemente buenos. En 1949, Lembke desarrolló el primer diseño con tecnología UV-C capaz de reducir drásticamente la carga microbiana de la leche fresca (Burton, 1951). El método restringía a

1mm la profundidad de penetración de la radiación de 254 nm por la opacidad de la leche y aplicaba flujo turbulento para favorecer la exposición homogénea de todo el volumen a la radiación maximizando a si la destrucción de microorganismos.

2.4.6.4 Agua.

Una de las principales aplicaciones de la tecnología UV es la desinfección de aguas de consumo por ser una tecnología barata continua y por qué se ha demostrado que la radiación UV tiene una alta efectividad contra bacterias patógenas y especialmente contra protozoos, patógenos del agua como *Cryptosporidium parvum* y *Giardia muris* (Clancy et al, 1998).

2.4.6.5 Envases para alimentos y films.

Dada la capacidad del UV-C para reducir la población microbiana en condiciones de baja temperatura, sin producir emisiones contaminantes, en tiempos de tratamientos cortos, aunque, con el inconveniente de una baja penetración estas características convierten a la radiación UV en una técnica ideal para la esterilización de superficies y por tanto es ampliamente utilizada en industria alimentaria para la esterilización y sanitización de superficies de trabajo, recipientes, contenedores y todo tipo de envases. Una de las ventajas importantes de esterilización de envases es que al ser una tecnología fría se puede utilizar para esterilizar envases y films termolábiles sin riesgos de formaciones.

2.4.7 Aspectos legislativos y regulación de aplicación de radiación UV.

La utilización de la radiación UV en la preservación de alimentos está pendiente de aprobación en EEUU (Lado y Yousef, 2002).

En el año 2000, la agencia de administración de alimentos y medicamento (FDA) aprobó el uso de la irradiación UV para reducir patógenos y otros microorganismos en jugos claros, a petición de la empresa *California Day - Fresh Fruits, Inc.* Mientras que este proceso no puede asegurar la eliminación de todos los microorganismos, sin embargo, puede lograr una reducción considerable. El consumo de alimentos no pasteurizados ha sido responsable en la última década de enfermedades causadas por infección de *Escherichia coli O157:H7*, *cryptosporidiosis* y *salmonelosis* en América. (Almenar, E., 2005).

2.4.7.1 Ventajas de productos irradiados con radiación UV.

Las ventajas que podemos citar con respecto al tratamiento con radiación UV sobre los alimentos son las siguientes:

- No afecta significativamente la temperatura del alimento, ni su contenido de humedad, y por lo tanto no causa daño térmico al producto.
- Tiene bajo consumo de energía
- No deja residuos químicos ni radioactividad residual en el producto (tal como ocurre con radiación gama)
- No tiene restricciones legales
- No requiere equipamiento de seguridad adicional y es bastante seguro para el personal que maneja el equipo
- Es de fácil aplicación y no requiere el seguimiento de procedimientos complejos para su aplicación
- Tiene bajo costo de inversión, funcionamiento y mantenimiento
- Es eficiente para bacterias, virus, hongos, levaduras y parásitos

2.4.7.2 Desventajas de productos tratados con radiación UV.

Como se llegó a citar anteriormente las ventajas que presenta este tipo de tratamiento son varias, sin embargo, la mayor desventaja del uso de la luz ultravioleta con fines de

desinfección es el poco poder de penetración que tiene la misma. Así, por ejemplo, en agua destilada, a 40 cm debajo de la superficie, la luz ultravioleta pierde 30% de su intensidad (Bintsis y col., 2000).

La penetración en un líquido depende de la naturaleza del mismo: los sólidos solubles disminuyen la intensidad de la radiación que penetra en el líquido mientras que las partículas suspendidas pueden bloquear la incidencia de la luz en la carga microbiana (Miranda *et al.*, 2017). Además, las moléculas de ADN, las proteínas y las bases también absorben la luz ultravioleta.

2.4.8 Termoultrasonificación

Como se señaló precedentemente la inactivación de microorganismos y enzimas es indispensable para garantizar la seguridad y estabilidad de un producto alimenticio. Los procesos térmicos han sido muy útiles para este propósito. Sin embargo, como se pudo describir en el apartado (2.4.2) un calentamiento excesivo induce reacciones físicas y químicas indeseables que afectan negativamente las propiedades sensoriales y nutricionales del alimento a ser tratado. La ocurrencia de este efecto adverso motiva a seguir buscando más alternativas de procesos de conservación de alimentos, entre estos el ultrasonido definido por Hoover (2000) como la energía generada por ondas sónicas de 20 KHz (Gomez, Lopez, 2009, p. 60).

Mason (1988) distingue dos rangos de ultrasonido según la frecuencia, el primero denominado como ultrasonido de diagnóstico o de alta frecuencia comprendido entre 2 y 10 MHz, y el segundo rango denominado ultrasonido de poder o de baja frecuencia comprendido, según Torley y Bhandari citados por Gómez y López y (2009), entre 250 KHz y 1 MHz, o superiores.

El mecanismo de acción del ultrasonido radica en el fenómeno de la cavitación ultrasónica al formarse ciclos de compresión formando microburbujas que colapsan casi inmediatamente disipando una alta cantidad de energía llegando a alcanzar temperaturas de hasta 5000 K y presiones de 1000 atm. Este fenómeno es el que produce la inactivación de microorganismos, otros efectos físicos e incluso químicos. A su vez Mason, Paniwnyk y Lorimer (1996) señalan que el ultrasonido de alto poder (baja frecuencia) rompe las paredes biológicas de las células y por tal motivo las células son destruibles, consecuentemente, para lograr una esterilización se necesita alta intensidad. Gomez y Lopez (2009) indican que los reportes de aplicación de ultrasonido previo a otros tratamientos de inactivación bacteriana no son del todo satisfactorios, pero el uso de otros tratamientos combinados facilita la acción de las ondas sobre la pared celular, de igual manera la combinación simultánea de tratamientos puede lograr la inactivación bacteriana.

Existen diversas investigaciones de tratamientos ultrasónicos a alimentos ya sea como método de conservación o como método para modificar características de calidad de diferentes productos, uno de ellos es el trabajo realizado por Illanes (2018) en el que se evaluaron las propiedades físicas y la estabilidad del zumo de zanahoria, concluyendo que el ultrasonido mejoraba las propiedades físicas como la estabilidad, la sedimentación y la aceptación sensorial con un ligero cambio de color.

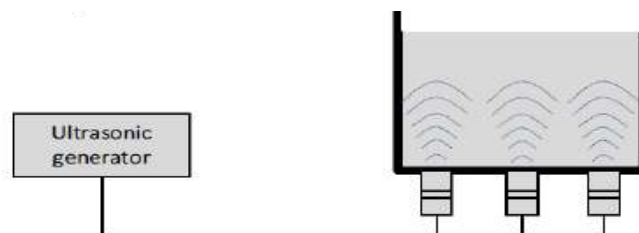


Figura 5. Equipo de ultrasonido (Illanes 2018)

2.4.9 Recuento de aerobios mesófilos totales en leche.

La industria alimentaria se rige bajo criterios de *inocuidad* donde en nuestro medio existen entidades como: El Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria e Inocuidad Alimentaria (SENASAG), El Instituto Boliviano de Metrología (IBMETRO) y El Instituto Boliviano de Normalización y Calidad (IBNORCA) buscan regular el cumplimiento de las mismas. La NB 330013:2013 dentro de los requisitos indica la cuantificación de los parámetros microbiológicos donde solicita realizar el recuento de bacterias aerobias mesófilos con un límite microbiológico de $< 4 \times 10^6$ UFC/mL.

Según la norma boliviana NB 32003-2003 recuento total de bacterias mesófilos aerobias viables, define por “bacterias mesófilas” a las bacterias cuya temperatura de desarrollo está comprendida entre 20°C a 40 °C, llegando a indicar la presencia de la microbiota total sin especificar los tipos de bacterias, también determina la calidad sanitaria y la vida útil de los productos, indicando las condiciones de higiene de la materia prima, la forma como fueron procesados y la manipulación durante su elaboración y comercialización.

Por lo mencionado anteriormente para poder realizar la evaluación del efecto sobre la carga microbiana sobre la matriz de la leche cruda con los dos representantes de los aerobios mesófilos (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) por las siguientes razones: en primer lugar, ambos son indicadores sanitarios en los alimentos, segundo, ambos representan a la diferenciación estructural (bacteria Gram negativa y bacteria Gram positiva).

2.4.9.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E.coli*) es una bacteria que se encuentra en el sistema digestivo de los animales y los seres humanos. Aunque generalmente son inofensivas, algunas *E. coli* son

patógenas y pueden contaminar los alimentos, el agua y el medioambiente. Cientos de miles de personas se enferman cada año a causa de la *E. coli* y se producen cientos de muertes. En los últimos años, ha habido un aumento de los brotes, con un impacto significativo en los sistemas de salud y la producción agrícola.

Entre las fuentes más comunes de infecciones transmitidas por los alimentos se incluyen productos *lácteos y jugos no pasteurizados*, carne elaborada y cocida de manera insuficiente, frutas y hortalizas crudas, además de un manejo y almacenamiento insalubre de los alimentos preparados. El almacenamiento y la cocción adecuados ayudarán a prevenir las enfermedades transmitidas por los alimentos, incluidas aquellas causadas por cepas de *E. coli* patógenas. Las cepas de *E. coli* patógenas para el ser humano se caracterizan de acuerdo con el tipo de síntomas clínicos que producen. La patogenicidad es determinada por su genoma y serotipos. *E. coli* fácilmente pueden intercambiar genes y generar variaciones de enfermedades. La fuente de contaminación de los alimentos son las heces humanas y de animales.

La vía de contaminación puede ser muy compleja e implicar todos los aspectos de las interacciones entre humanos, animales y plantas y su relación con el ecosistema. La epidemiología de cada variedad es diferente según el reservorio de la infección, niveles de sanidad e higiene en la comunidad y sistemas de producción agrícola y de los alimentos. La prevención y control requieren un enfoque interdisciplinario en la producción animal y vegetal, así como enfoques basados en riesgos a lo largo de toda la cadena de abastecimiento de alimentos. Éstos incluyen la aplicación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), Buenas Prácticas de Higiene (BPH) y Análisis de Peligros y

de Puntos Críticos de Control (HACCP), desde la granja hasta llegar al consumidor. Para mejorar la cantidad y la calidad de los alimentos, la FAO promueve buenas prácticas en el sector lechero, hortícola y de producción de carne de vacuno, con frecuencia en colaboración con el sector privado. La publicación conjunta FAO/FIL “Guía de Buenas Prácticas en Explotaciones Lecheras” y el manual FAO “Buenas Prácticas para la Industria de la Carne”, así como la elaboración de material de capacitación y programas de intervención para la creación de capacidades en cuanto a la manipulación higiénica y la producción de la leche, además de pruebas y controles de calidad, son algunos ejemplos de las iniciativas de la FAO para ayudar a evitar las infecciones por *E. coli*. La FAO apoya los sistemas y servicios de salud pública veterinaria para fortalecer la supervisión veterinaria, así como también la inspección de las carnes, faenado de animales e higiene en los mataderos.

La intensificación sostenible de la producción agrícola (“Ahorrar para Crecer”, FAO 2011) aumenta el rendimiento de los cultivos y reduce el riesgo de infección por *E. coli*. En esta publicación se enfatiza la importancia de supervisar cuidadosamente los niveles de nitrógeno para reducir al mínimo las aplicaciones innecesarias de plaguicidas y reducir el riesgo de brotes de agentes patógenos en plantas, mientras se reduce el impacto en el medioambiente.

Una amplia gama de alimentos pueden actuar como vehículo para *E. coli* patógena en conjunto con sus respectivas ecologías. Los alimentos pueden contaminarse de manera directa o por contaminación cruzada durante el crecimiento y cultivo (hortalizas), recolección (*leche*) o faenado (carne). Se puede producir una contaminación adicional durante la manipulación poscosecha, transporte, elaboración y manipulación no higiénica de alimentos durante su

preparación. Los factores que contribuyen a la persistencia de *E. coli* en los sistemas alimentarios incluyen el control inadecuado de los parámetros de procesamiento (p. ej., temperatura de cocción, valor del pH, actividad del agua y almacenamiento a altas temperaturas que permiten el crecimiento de estas bacterias). Entre los ejemplos de alimentos contaminados se encuentran: carne cruda/mal elaborada (carne fermentada, carne molida mal cocida, etc.), productos lácteos no pasteurizados (queso, leche, etc.), jugos de frutas no pasteurizados y hortalizas crudas (semillas germinadas, lechuga, espinaca, melones, hongos, etc.)

2.4.9.2 *Staphylococcus aureus*.

Los *Staphylococcus* son un amplio grupo de bacterias Gram-positivas, cuyo diámetro oscila entre 0.5 y 1.5 micras. Se caracterizan porque se dividen en agrupaciones que asemejan racimos de uva (Zendejas *et al.*, 2014). Presentan una gran capacidad de adaptación, por lo cual afectan a todas las especies conocidas de mamíferos, incluyendo a los roedores comunes de laboratorio. Es por ello que, gracias a su fácil propagación, pueden transmitirse de una especie a otra, siendo frecuentes los casos humano-animales y viceversa.

De aquí surge la importancia de conocer más acerca de este patógeno, ya que, además de los animales, los mecanismos de invasión abarcan también fómites y el contacto de persona a persona. En los últimos años, la incidencia de bacteriemia por estafilococos ha aumentado significativamente, ya que una especie de esta familia bacteriana ha aumentado su frecuencia de aparición; se trata de la especie *Staphylococcus aureus*, que se ha convertido en la principal causa de infecciones en el torrente circulatorio e *intoxicaciones ocasionadas por alimentos*. Estos brotes están surgiendo de manera alarmante en la mayoría de los países industrializados

(Rasmussen *et al.*, 2014). De esta manera, al ser una especie bacteriana relativamente común, es natural que surjan investigaciones para mantenerse al tanto de la evolución de este patógeno. Una de las interrogantes, que consternaba mucho a los científicos, era cómo podía ser tan fácil la diseminación de esta bacteria siendo la respuesta el grado de su virulencia.

La patogenicidad de las infecciones por *Staphylococcus aureus* se relaciona con diversos componentes de la superficie bacteriana (Lina *et al.*, 1999); de manera general, los componentes del microorganismo son peptidoglicanos y ácidos teicoicos, además de la proteína A. Así pues, la patogenia provocada por este microorganismo surge cuando se produce la combinación de los factores de virulencia con la disminución de las defensas del huésped; estas condiciones propician que *Staphylococcus aureus* posea características de virulencia y daño bastante particulares; la situación se ve agravada debido a que el patógeno ha ido desarrollando múltiple resistencia contra los antibióticos, propiciando que cada vez sea mucho más difícil el tratamiento y la curación de las enfermedades ocasionadas por esta bacteria (Jacó *et al.*, 2015).

Staphylococcus aureus es importante no solo porque ocasiona infecciones en diversas partes del organismo humano, sino porque es una de las principales bacterias implicadas en *enfermedades transmitidas por alimentos* (ETA's). Tales enfermedades son causadas por diversas acciones, incluyendo la capacidad del patógeno de producir toxinas, siendo esto relativamente común en determinados sectores de la población y en algunas regiones geográficas desfavorecidas por la falta de sistemas de salud y de control de infecciones adecuados. Así, las infecciones ocurren por la ingesta de alimentos contaminados con las toxinas. Lo preocupante del caso es que esta bacteria puede encontrarse en el aire, la leche, el

agua potable, aguas residuales y, desde luego, la comida o en el equipo donde los alimentos han sido elaborados.

2.4.9.3 Cinética de la destrucción de los microorganismos

Casp (2003), soportan la teoría de evaluación del procesado térmico con respecto a la muerte o a la inactivación de los microorganismos, desarrollado por Bigelow y Ball, que señala que los microorganismos y sus esporas mueren a cualquier temperatura, pero mientras más alta sea, mayor será la probabilidad de que tenga lugar la muerte; esta probabilidad define la resistencia térmica de un determinado microorganismo a una temperatura concreta.

La velocidad con la que muere la población microbiana, según Diaz (2009), es denominada cinética de la muerte térmica y sigue una reacción de primer orden que al resolverse genera una recta en una representación semi- logarítmica, y que posee una constante “ k ”, como indica Ibarz (2005).

2.5 Vida útil

La vida útil se define como el $\overline{\text{período}}$ de tiempo durante el cual un producto alimenticio:

- Permanece inocuo.
- Conserva las características sensoriales, físico-químicas, microbiológicas y funcionales deseadas.

- Cuando corresponda, cumple cualquier declaración nutricional o de propiedades saludables que haga referencia al mismo, siempre que se cumplan las condiciones de conservación recomendadas.

Por ello, para estimar la vida útil de un producto alimenticio es determinante conocer los diferentes mecanismos de alteración que conllevarán a su deterioro, incluyendo la pérdida de las características organolépticas que afectan a la calidad sensorial del alimento, la pérdida de las propiedades nutricionales y saludables declaradas y la pérdida de inocuidad del alimento. Los estudios de vida útil deben llevarse a cabo en las siguientes circunstancias:

- Desarrollo de nuevos productos/procesos o modificación de los existentes.
- Uso de nuevos envases y procedimientos de envasado.
- Cualquier cambio significativo en los ingredientes, lugar de producción o equipo de producción.
- Cuando no hay estudios previos de vida útil. Los estudios de validación de la vida útil de un producto alimenticio deben consistir en obtener y documentar evidencias que demuestren que durante dicho periodo el producto es seguro y mantiene las características de calidad que le son propias, teniendo en cuenta las condiciones previsibles de almacenamiento, distribución y uso.

Para determinar la vida útil de un alimento, es indispensable partir de un sistema de gestión de la seguridad alimentaria eficaz, que implemente medidas de control adecuadas para prevenir, eliminar o reducir a un nivel aceptable los peligros que pueden darse durante la elaboración del producto. Para ello, el operador alimentario deberá implantar un sistema

basado en los principios del APPCC. La determinación de la vida útil deberá estar integrada en los procedimientos basados en el APPCC y en las buenas prácticas de higiene. Por lo que la documentación relacionada con la determinación y validación de la vida útil deberá ser archivada y mantenida por los operadores económicos como una parte de los procedimientos basados en el APPCC.

2.5.1 Factores que afectan a la vida útil

Existen múltiples factores que pueden afectar a la vida útil de un alimento. De forma general, estos factores pueden clasificarse como intrínsecos y extrínsecos. Los factores intrínsecos son los factores propios del alimento, es decir, aquellas características inherentes a la composición de los mismos, como por ejemplo ingredientes (concentración de conservantes, contenido en sal), pH, actividad de agua (a_w), microbiota asociada y barreras estructurales. Los factores extrínsecos son los que no dependen del propio alimento, como por ejemplo la temperatura de conservación (T^a), la humedad relativa (HR), condiciones de envasado y el procesado del producto (incluida la posibilidad de recontaminación). Las características del producto final van a condicionar el que se puedan desarrollar o no los mecanismos de deterioro o pérdida de seguridad a lo largo de la vida útil. Así, por ejemplo, en el deterioro microbiológico podremos observar que, para cada microorganismo, bajo una serie de condiciones de crecimiento, existe un valor máximo y mínimo de cada parámetro en el que éste puede crecer (T^a , pH, actividad de agua, etc.). Al factor que ejerce un efecto adverso directamente sobre el crecimiento microbiano, impidiendo por sí solo su crecimiento, se le conoce como factor limitante. En otros casos, será la acción sinérgica de dos o más factores la que conseguirá limitar el crecimiento del microorganismo. Estos factores pueden ser, en

ocasiones, puntos críticos de control o prerrequisitos operativos que requieren ser vigilados y verificados en el contexto del sistema APPCC.

2.5.2 Etapas para la determinación de la vida útil.

Debido a las múltiples causas de alteración de los alimentos, la interacción entre ellas y la enorme variedad de alimentos, no se puede dar una única respuesta en cuanto a la metodología a seguir para estimar, establecer y validar la vida útil de cada alimento. La propuesta de esta guía puede ser usada por el operador alimentario para justificar el marcado de fechas y la vida útil estimada. Sin embargo, pueden ser igualmente válidos otros enfoques y metodologías siempre que se ajusten a la legislación vigente y justifiquen la vida útil establecida. Para garantizar la viabilidad del estudio, todos los procesos deben estar estandarizados con el fin de reducir al máximo las posibles variaciones de dichas características entre diferentes lotes. En cualquier caso, siempre debe considerarse en el estudio la variabilidad de los productos y tener en cuenta las características más desfavorables que representen al lote. La figura 4 representa una propuesta de las principales etapas a seguir para establecer y validar la vida útil de los alimentos.

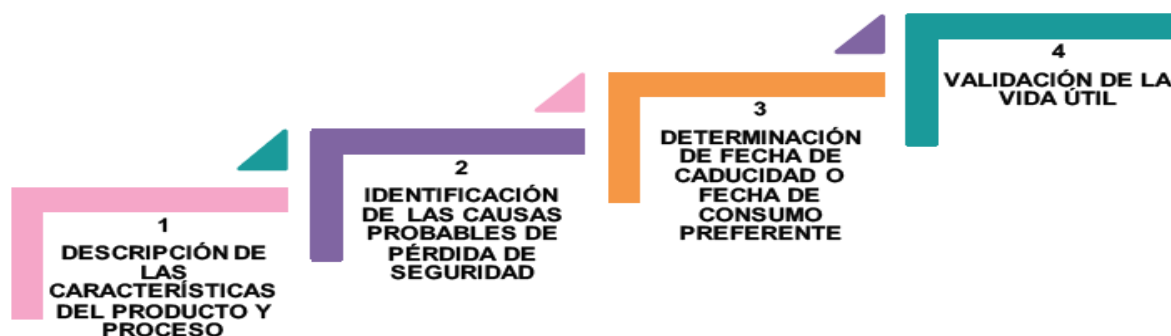


Figura 7. Descripción de las etapas a seguir para establecer y validar la vida útil de los alimentos (Alapont, 2020).

3. Planteamiento del problema

Uno de los mayores problemas en estos tiempos tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo son las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's) dentro de ello cuadros de Intoxicación alimentaria (IA) de origen microbiano, siendo la población más vulnerable niños menores de 5 años y personas de la tercera edad, los primeros por tener el sistema inmunológico en desarrollo y los segundos por tener un sistema ya deteriorado.

Por otro lado, el tiempo de vida útil de la leche se ve afectado por la carga microbiana desde el ordeño hasta llevar al centro de acopio, sí en el proceso tecnológico no se aplica la pasteurización se puede perder toda la materia prima, sin embargo, dicho tratamiento afecta la composición nutricional principalmente en los componentes termolábiles como las proteínas y vitaminas.

Otro factor a considerar es el tiempo que se requiere para poder tratar la materia prima, porque para el tratamiento térmico se debe esperar que la temperatura suba y este estable durante un determinado tiempo que oscila entre 15 a 30 minutos por 70 °C y descenderla rápidamente.

El desarrollo de métodos poco agresivos en alimentos muestra un gran interés porque los alimentos a ser tratados conservan su valor nutricional de referencia.

Por lo citado anteriormente se propone la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál de los dos métodos de conservación es apropiado en el proceso de la conservación de la leche cruda?

4. Justificación

Los productores de leche de la provincia Omasuyos del departamento de La Paz abastecen a las industrias lácteas de la ciudad, sin embargo, la sobre producción ocasiona que utilicen ese excedente y empiecen a producir derivados lácteos como yogurt y queso entre otros; con el pasar el tiempo se han formado pequeñas industrias que necesitan aplicar un método de conservación a su materia prima, la leche en este caso.

Desde el punto de vista de la industria, dos son las razones fundamentales para justificar el estudio de la comparación de dos métodos emergentes de conservación en leche cruda: (i) alargar el tiempo de vida útil del alimento al disminuir la carga bacteriana (ii) el valor nutricional no debería verse afectado por el tratamiento. Además que una deficiente calidad sanitaria de los alimentos se traduce en daños de variada naturaleza para las poblaciones implicadas. Los daños incluyen presentación de enfermedades, gastos de atención médica, pérdidas económicas por deterioro de los alimentos y causa de muerte.

En la industria lechera se debe de contar con otras estrategias que contribuyan a la disminución de la carga bacteriana, pero que no afecte al valor nutricional, estas alternativas buscan disminuir costos, tiempos de tratamiento y facilitar el proceso de grandes volúmenes de materia prima o producto terminado.

Los resultados obtenidos pretenden dar más opciones de tratamientos de conservación de la leche cruda, esto, en búsqueda de nuevas tecnologías que puedan ser utilizadas por microempresas, ya que la actual tecnología de UHT implica una inversión bastante elevada por el tamaño del equipo (a diferencia de la radiación UV y ultrasonido que posee un tamaño y costo menor). Además, el presente proyecto pretende dar un aporte a la

sociedad para la mejora de la alimentación mediante una alternativa de producto de características nutricionales importantes.

5. Antecedentes

Gómez (2005), estudio la composición nutricional de la leche de ganado vacuno, destacando que por su elevado valor nutricional es propenso a la contaminación microbiana que pone en riesgo a la población como consumidores por las ETA's y a la industria alimentaria por la contaminación de la materia prima y producto terminado. Donde sugiere dar más énfasis en los métodos aplicados para su conservación.

Rivera (2007), estudio el efecto bioquímico de la radiación ultravioleta al ser aplicado en frutas y vegetales, donde indica que la utilización a dosis bajas ha tenido éxito en la desinfección de frutas y hortalizas. Algunos efectos benéficos atribuidos a la irradiación UV-C son: inducción de mecanismos de defensa (síntesis de fitoalexinas).

Haro (2013), trabajo aplicando radiación ultravioleta para conservación sobre vegetales y frutas, concluye que la aplicación es eficaz a tiempos cortos de exposición a una longitud de 254 nm

Suarez (2013), trabajo con la determinación de los cambios físico-químicos, sensoriales y microbiológicos en la lechuga (*Lactuca sativa*), sometida a tratamiento con luz ultravioleta de onda corta (UV-C) obtuvo como resultado un producto inocuo con buenas características organolépticas y aptas para el consumo. Se determinó que el tiempo de vida útil usando radiación UV-C en lechugas es de 9 días, puntualizando que el tratamiento influye directamente en el tiempo de vida útil en forma positiva.

Vásquez (2015), realizó el estudio del efecto de la combinación de luz ultravioleta y temperatura en el procesamiento de leche y derivados, Se encontró que el yogurt elaborado por la tecnología propuesta presentó una notable disminución de la sinéresis, cambios mínimos en acidez, pH, color y sólidos solubles, y leves aumentos en la cohesividad,

elasticidad, masticabilidad y gomosidad respecto a las muestras de yogurt control y una aceptación global por parte de los consumidores satisfactoria. Estos resultados indican que la luz UV-C ofrecería una alternativa al procesamiento de leche destinada a la elaboración de yogurt.

Morales (2018), trabajo sobre el efecto de la irradiación ultravioleta sobre la calidad e inocuidad de la leche en la hacienda “El prado” tras haber realizado el estudio, mide parámetros nutricionales como proteína, grasa y parámetros fisicoquímicos, donde concluye que no existe diferencia estadísticamente significativa entre tratamiento ni grupos de estudio. Los tiempos de exposición fueron por tiempos muy cortos, porque el investigador argumenta que tiempos prolongados ocasionan la oxidación de las grasas.

Illanes (2018), Trabajo viendo el efecto de la aplicación de la termoultrasonificación sobre zumo de zanahoria (*Daucus carota*) sobre la carga microbiana y el valor nutricional, enfatiza que la aplicación de este método combinado no afecta las características nutricionales del zumo de zanahoria, logra el objetivo de disminuir la carga microbiana porque el investigador también trabajo con contaminación artificial con un numero de UFC conocido de *Escherichia coli* ATCC 25922.

La norma boliviana 33013:2013 regulada por el instituto boliviano de normalización y calidad (IBNORCA) en su contenido muestra los requisitos que deben ser cumplidos para poder la leche cruda y fresca donde hace conocer los requisitos, fisicoquímicos, microbiológico y composición.

Hasta la fecha no se publicaron estudios sobre tratamiento de matrices alimentarias con radiación ultravioleta en nuestro medio, si con termoultrasonificación como es el trabajo de Illanes 2018, pero el mencionado trabajo con zumo de zanahoria y no con leche.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Comparar el efecto de la aplicación de radiación ultravioleta y termoultrasonificación sobre la carga microbiana y el valor nutricional de la leche.

6.2 Objetivos específicos

- 1.- Construir un sistema de tratamiento a base de radiación ultravioleta.
- 2.-Evaluar el efecto de la aplicación de radiación ultravioleta y termoultrasonificación en leche contaminada artificialmente con *E.coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923.
- 3.-Distinguir el efecto sobre los macronutrientes (proteína, grasa, carbohidratos) y micronutrientes (vitaminas y minerales) de la leche después del tratamiento con radiación ultravioleta y termoultrasonificación.
- 4.- Analizar las propiedades fisicoquímicas (densidad, punto de congelación, extracto seco magro, punto seco de congelación) de la leche después del tratamiento con radiación ultravioleta y termoultrasonificación.
5. Determinar el tiempo de vida útil tras haber realizado los diferentes tratamientos de conservación.

7. Planteamiento de la Hipótesis

Ho: Los métodos de conservación por radiación ultravioleta y termoultrasonificación no presentan mejor rendimiento con respecto a la disminución de la carga bacteriana sin afectar el valor nutricional de la leche, frente a la pasteurización.

Hi: Los métodos de conservación por radiación ultravioleta y termoultrasonificación si presentan mejor rendimiento con respecto a la disminución de la carga bacteriana sin afectar el valor nutricional de la leche, frente a la pasteurización.

8. Diseño metodológico

8.1 Enfoque de la investigación.

El presente trabajo fue diseñado bajo un enfoque de tipo mixto.

8.2 Tipo de investigación

8.2.1 Descriptivo

La investigación de alcance o tipo descriptivo “busca especificar las propiedades, las características y los perfiles de las personas, grupos, comunidades, procesos, objetos, o cualquier otro fenómeno” (Hernández, Fernandez y Baptista, 2014, p. 92), hecho que se da a lugar al realizar la medición y análisis independiente de variables de composición, fisicoquímicas y microbiológicas como: proteína, grasa, carbohidratos, vitaminas y minerales densidad, punto de congelación, extracto seco magro, punto seco de congelación, recuento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* los cuales fueron estudiados en el proceso del análisis del efecto de la aplicación radiación ultravioleta y termoultrasonicación

8.2.2 Correlacional

Los estudios correlacionales, “tienen como finalidad conocer la relación o grado de asociación que existe entre dos o más conceptos, categorías o variables en una muestra o contexto en particular” (Hernández et al., 2014, p. 93), es decir que puede desarrollarse, a partir de los datos obtenidos, modelos matemáticos y/o estadísticos para analizar el grado en que una variable influye en otra, y es justamente la finalidad del estudio al analizar la aplicación de la radiación ultravioleta y la termoultrasonicación en las diferentes variables de composición, variables fisicoquímicas y microbiológicas de la leche.

8.3 Variables en estudio.

Tabla 7. Operación de las variables de estudio en la comparación del efecto de la radiación ultravioleta y termoultrasonificación.

Variable	Tipo de variable	Operacionalización	Categorización o dimensiones	Definición
Método de conservación de irradiación con luz ultravioleta	Cuantitativa de Tiempo de exposición, flujo de circulación a través del sistema	Comparación entre el recuento después del tratamiento de conservación. Medición del valor nutricional y vida útil	-Disminución en el tiempo de tratamiento. Disminución en el efecto sobre el valor nutricional del alimento	La radiación ultravioleta forma dímeros de pirimidina en el material genético del microorganismo
Método de conservación de termoultrasonificación	Cuantitativa de Tiempo de exposición y temperatura de exposición.	Comparación entre el recuento después del tratamiento de conservación. Medición del valor nutricional y vida útil	-Disminución en el tiempo de tratamiento. Disminución en el efecto sobre el valor nutricional del alimento.	El ultrasonido genera el fenómeno de cavitación en el interior de la célula bacteriana.

8.4 Sitio o contexto del estudio

El estudio se desarrolló en los laboratorios de Microbiología, Bromatología de la Carrera de Ingeniería en Industria de Alimentos de la Universidad Indígena Boliviana Aymara “Tupak Katari” ubicado en la localidad de Cuyahuani del Municipio de Huarina del Departamento de La Paz y en las instalaciones del laboratorio de Química de Alimentos de la Carrera de Ingeniería Zootecnia e Industria Pecuaria de la Universidad Pública de El Alto.

8.5 Materia prima

8.5.1 Población de estudio

La materia prima fue constituida por 50 L de leche recolectado de las comunidades (Utavi, Cuyahuani, Huarina, Achacachi, Warisata) de la cuenca lechera de provincia

Omasuyos del departamento de La Paz. La adquisición, transporte al laboratorio y su respectiva caracterización y procesamiento se realizó de inmediato conservando la cadena de frío, para minimizar la contaminación cruzada. La leche acopiada se mantuvo a 4 °C hasta ser sometida a los diferentes tratamientos de conservación. La matriz primeramente fue analizada microbiológicamente (recuento de aerobios mesófilos según NB 32003). Si la matriz cumplía con valores dentro de la norma se procedía a la contaminación artificial con cepas ATCC de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

8.6 Universo y población o muestra.

Las muestras para el estudio estarán constituidas por leche, debiendo cumplir con los siguientes criterios:

8.6.1 Criterios de inclusión.

- leche fresca.
- no haber sido sometida a ningún tratamiento.
- no refrigerados.
- presentación del producto mayor a 4 L

8.6.2 Criterios de exclusión.

- Leche pasteurizada.
- Sometidos a refrigeración.
- Presentación menor a 4 L

8.4 Procedimiento.

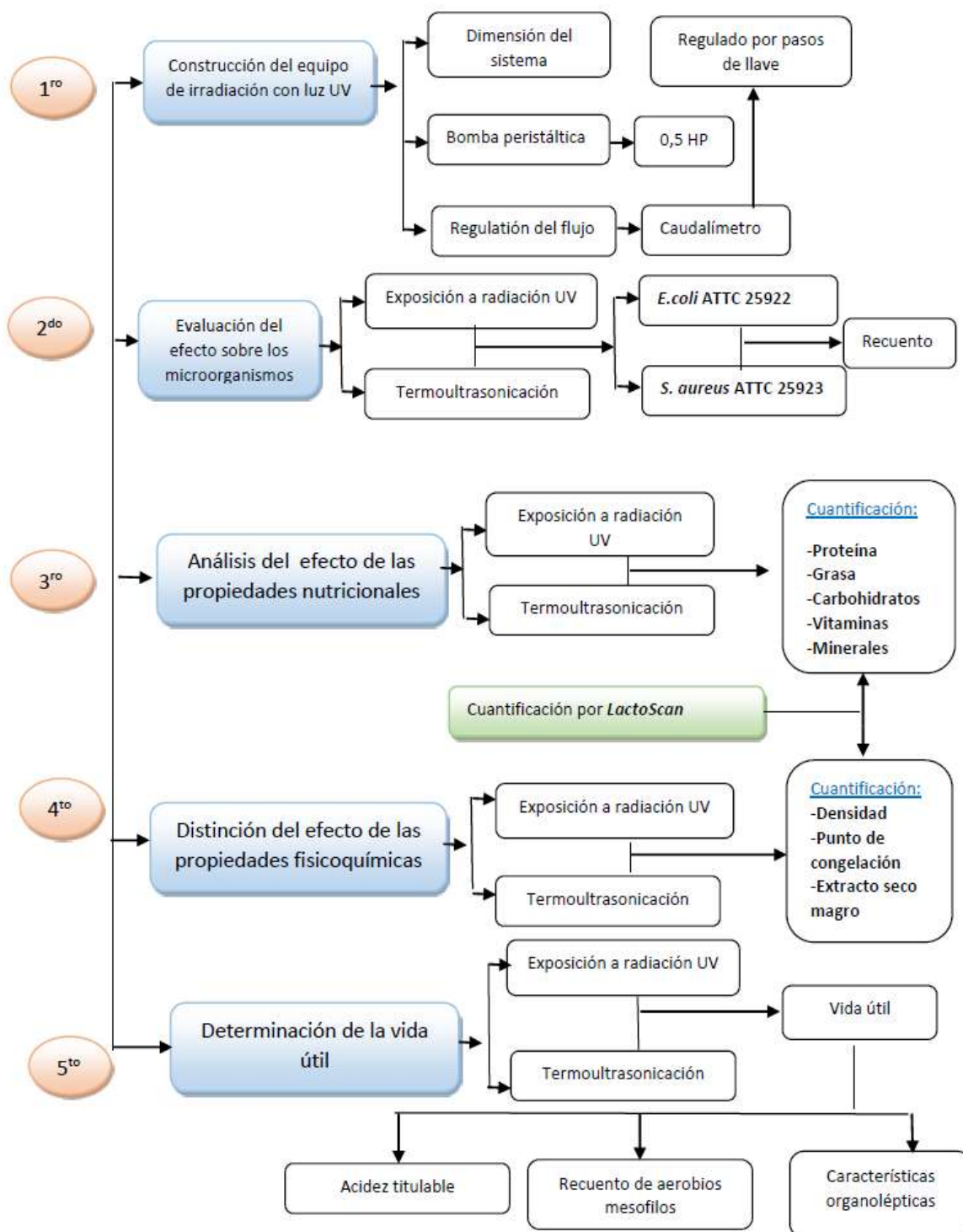


Figura 8. Descripción del proceso metodológico de la medición del efecto de la aplicación de radiación UV y termoultrasonificación sobre la leche.

8.5 Construcción del sistema de tratamiento por radiación ultravioleta (UV).

En la figura 9, podemos observar el prototipo del sistema de tratamiento por radiación ultravioleta (UV), el mismo fue diseñado en el programa AutoCAD, llegando a poseer una dimensión de 100 cm de altura, 80 cm de ancho y 60 cm de fondo; el sistema contaba con una bomba peristáltica (ZAFIRO KQB-60) con una de potencia de 0,5 caballo de fuerza (HP) para poder generar la circulación de la matriz a través del sistema, además, se incorporó un caudalimetro (80-800 L/h) para poder medir el caudal que era regulado por medio de los pasos de llave.

Con respecto a la radiación UV, la carcasa posee una cubierta de cuarzo que en su interior alberga la lámpara UV (Anexo 1) que emitía una longitud de onda de 254 nm. El sistema de tratamiento buscaba la recirculación de la matriz a ser tratada, por ello antes de ser liberado en el contenedor de salida se puso un paso de llave que cumplía dos funciones: i) purga de la solución desinfectante del sistema y ii) liberación de la matriz tratada; los ductos, codos y reductores eran de Policloruro de Vinilo (PVC) de una pulgada y pulga y media.

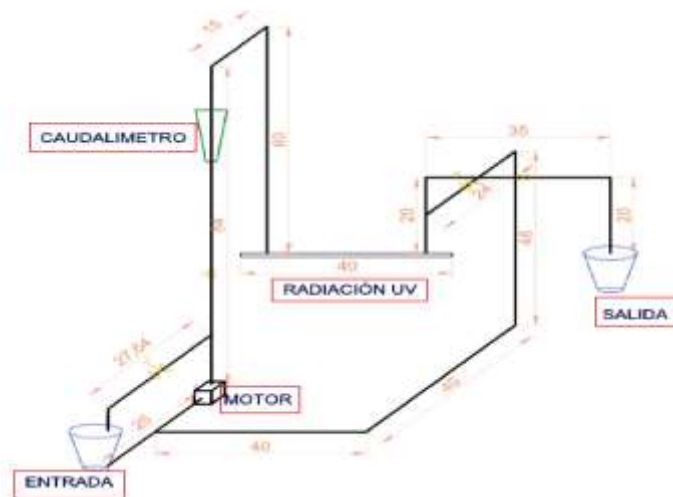


Figura 9. Prototipo del sistema de tratamiento por radiación ultravioleta (AutoCAD).

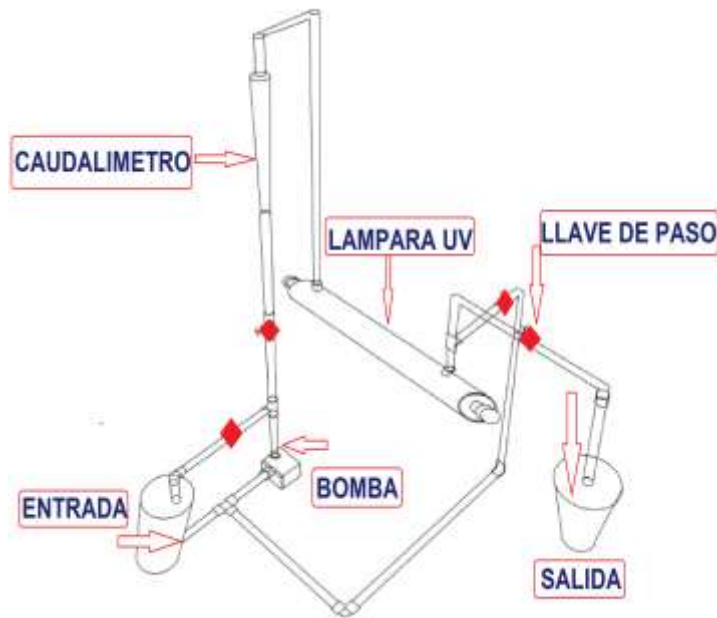


Figura 10.- Disposición en 3D de los componentes del sistema de tratamiento por radiación Ultravioleta (AutoCAD).

La figura 10, muestra el modelamiento en 3D del sistema, que fue construido en el laboratorio de Operaciones Unitarias de la Carrera de Ingeniería en Industria de Alimentos de la Universidad Indígena Boliviana Aymara Tupak Katari (UNIBOL A-TK), requiriendo para ello una sierra mecánica para hacer los cortes del PVC, teflón para asegurar las uniones y evitar fugas de la matriz a ser tratada.

8.6 Evaluación del efecto de la radiación ultravioleta y termoultrasonificación sobre leche contaminada artificialmente.

8.6.1 Selección de la matriz.

Para la selección de la matriz se ensayaron varias muestras de leche cruda provenientes de las comunidades de Cuyahuani, Utavi, Huarina y Achacachi que pertenecen a la provincia Omasuyos del Departamento de La Paz, se analizaron los parámetros microbiológicos

definidos por la norma boliviana (NB) 33013: 2013 (Tabla 2). Se midieron 25mL de muestra que fue diluida con un volumen de 225mL de agua peptonada (DIFCO) al 0.1%, se homogenizo la muestra, posteriormente se inocularon las diluciones en los medios respectivos para realizar el recuento de aerobios mesofilos totales en medio Agar Plate Count (PCA).

8.6.2 Contaminación artificial de la matriz con *Escherichia coli* ATCC 25922.

Se suplementó la matriz con un cultivo en fase estacionaria de *Escherichia coli* ATCC 25922 (Microbiologics®, USA; 1^{ra} generación), microorganismo presentado como pellets liofilizados, adquirido de la empresa Microbiologics y almacenado a 4 °C en forma de suspensión en el Laboratorio de Microbiología de la Carrera de Ingeniería en Industria de Alimentos de la Universidad Indígena Boliviana Aymara Tupak Katari.

La activación de *E. coli* se realizó inoculando dicha suspensión en medio Agar Rojo Neutro Cristal Violeta (RBCV) incubado a 35 °C por 24 h en una incubadora (Quimis; modelo Q316M, Brasil), de este cultivo se extrajo una colonia que fue inoculada en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) a 35 °C por 24 h con la finalidad de conseguir un cultivo saturado de aproximadamente 1×10^9 UFC/mL, la cual se comprobó mediante el recuento de las diluciones correspondientes a (10^{-7} y 10^{-8}) en PCA a 35 °C 24 h. Posteriormente, se realizaron diluciones del caldo BHI que contenía *E. coli* de un cultivo en fase estacionaria de 1×10^9 UFC/mL, hasta lograr una concentración de 1×10^5 UFC/mL, de esta dilución se extrajeron 1,5 mL que fueron inoculados en 500 mL de la matriz en un recipiente de vidrio previamente esterilizado.

8.6.3 Contaminación artificial de la matriz con *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

La contaminación artificial con *Staphylococcus aureus* subesp *aureus* ATCC 25923 (Microbiologics®, USA 1^{ra} generación), presentado como pellets liofilizados, adquirido de la empresa Microbiologics y almacenado a 4 °C en forma de suspensión en el Laboratorio de Microbiología de la Carrera de Ingeniería en Industria de Alimentos de la Universidad Indígena Boliviana Aymara Tupak Katari.

La activación de *S. aureus* se realizó inoculando dicha suspensión en medio Agar manito salado incubado a 35 °C por 24 h en una incubadora (Quimis; modelo Q316M, Brasil), de este cultivo se extrajo una colonia que fue inoculada en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) a 35 °C por 24 h con la finalidad de conseguir un cultivo saturado de aproximadamente 1×10^9 UFC/mL, la cual se comprobó mediante el recuento de las diluciones correspondientes a (10^{-7} y 10^{-8}) en PCA a 35 °C 24 h. Posteriormente, se realizaron diluciones del caldo BHI que contenía *S. aureus* en fase estacionaria de 1×10^9 UFC/mL, hasta lograr una concentración de 1×10^5 UFC/mL, de esta dilución se extrajeron 1,5 mL que fueron inoculados en 500 mL de la matriz en un recipiente de vidrio previamente esterilizado.

8.6.4 Limpieza y desinfección del sistema de tratamiento por radiación UV.

Se realizó la limpieza del sistema de tratamiento con agua destilada, seguidamente se realizó la circulación de NaOH al 0.01% a un caudal de 13 L/min con la finalidad de arrastrar todo tipo de contaminante que pueda influir al momento de la medición de las variables de respuesta de los diferentes ensayos. El enjuague del sistema fue realizado con agua destilada estéril, se seguía este proceso hasta que el pH del agua de purga se encuentre entre 5,5 a 7,0.

8.6.5 Tratamiento por radiación ultravioleta

Se realizó la carga de la matriz previamente contaminada al sistema de tratamiento por radiación UV, donde el tanque de recepción contaba con una capacidad para 3-5 L que alimenta al circuito mediante una bomba peristáltica (ZAFIRO KQB-60) con una potencia de 0,5 caballo de fuerza (HP) para poder generar la circulación de la matriz a través del sistema cumpliendo un determinado caudal, los mismos fueron medidos por un caudalímetro con un rango de 1-13 L/min.

Se trabajó con un diseño factorial 3^2 , diseño constituido por dos variables, el caudal y el tiempo con 3 niveles cada uno. Sin embargo, para poder definir los tres niveles en la variable del tiempo se realizó un previo screening con 7 niveles (1; 3; 5; 10; 15; 20; 30; 35; 40 min). Con respecto a la variable del caudal se evaluó a 3; 7 y 13 L/min.

La lámpara UV tenía una potencia total de 55 W y una irradiancia de 41 mW/cm² a una longitud de onda de 254 nm. El alimento circula por el sistema formado una capa de un espesor de 1 mm. El volumen que puede irradiar simultáneamente la lámpara del sistema es de aproximadamente 70 mL (Patente Europea EP2965766-A1). Se recolectaron muestras a diferentes intervalos de tiempo desde el tiempo cero hasta los 40 min, donde las muestras se recolectaron en tubos de plástico estériles de 15 mL y se mantuvieron a 4 °C hasta su análisis de las variables de respuesta, en este caso el recuento de *E. coli* en medio de cultivo RBCV y *S. aureus* en medio Agar manitol Salado.

8.6.6 Tratamiento por termoultrasonicación

Los ensayos de termoultrasonicación fueron realizados en un baño ultrasónico (RAYPA, modelo UCI-50, España) en el laboratorio de Bromatología de la Carrera de

Ingeniería en Industria de Alimentos de la UNIBOL A-TK con las siguientes características: control de temperatura y tiempo, 1,6 L de capacidad, dimensiones internas 110x180x100 (H x A x F en mm), dimensiones externas 320x255x175 (H x A x F en mm) y 250 W de potencia nominal (Illanes, 2018).

Por medio de un diseño factorial 3^2 , diseño constituido por dos variables, la temperatura y el tiempo con 3 niveles cada uno. Sin embargo, para poder definir los tres niveles en la variable del tiempo se realizó un screening previo con 7 niveles (1; 3; 5; 7; 10; 12 y 15 min). Con respecto a la variable de la temperatura se evaluó a 50; 60 y 70°C. Los valores mínimos y máximo de temperatura se definieron como 50 °C y 70 °C para lograr mayor cobertura de información. Se evitó usar valores mayores ya que se aproximaría a la temperatura de ebullición del agua, temperatura que se desea evitar para un tratamiento alternativo de termoultrasonicación.

Se midieron 25 mL de la matriz en tubos de vidrio tapa rosca con una carga microbiana de aproximadamente 300 UFC/mL (**8.6.2** y **8.6.3**) almacenado a 4°C hasta el momento de su tratamiento por termoultrasonicación. Se calentó el agua del baño ultrasónico a las temperaturas de 50; 60 y 70 °C para cada tratamiento para luego sumergir los tubos con la matriz en el baño de sonicación. Una vez que la temperatura de las muestras en el baño ultrasónico se estabilizó, inició el conteo del tiempo. Para los tratamientos se daba inicio al cronómetro donde se activaban los transductores de ultrasonido. Se iba retirando los tubos después de haber cumplido el tiempo de exposición al tratamiento de acuerdo al diseño experimental, posteriormente se procedió al recuento de *E. coli* en medio de cultivo RBCV y *S. aureus* en medio Agar manitol Salado.

8.6.7 Recuento de *Escherichia coli*.

Se Trabajó con un medio selectivo diferencial con es el RBCV (Anexo 2), se procedió a su disolución completa, no requiere esterilización por autoclave se lo mantuvo a 48°C en un baño de agua (Grant JBNova; USA) hasta ser utilizado. Tras haber sometido la matriz a tratamiento por radiación UV y termoultrasonificación se procedió a la inoculación de 1 mL por duplicado de cada nivel por siembra por profundidad, posteriormente se incubo las cajas en una incubadora (Quimis; modelo Q316M, Brasil) a 35°C por 48 h, cumplido este tiempo se procedido al recuento de las mismas.

Como procedimiento confirmatorio para determinar la identidad del analito de interés, se realizó las pruebas bioquímicas: Sulfuro indol movilidad (SIM), Rojo de metilo (RM), Voges Proskauer (VP) y citrato. Tomando en cuenta el criterio de recuento presuntivo descrito en la tabla 8

Tabla 8. Criterio de confirmación del recuento presuntivo (NB 32005: 2004).

N° de Colonias presuntivas en placa	Colonias a confirmar
< 50	3
51 a 100	5
101 a 200 ó más	7

8.6.8 Recuento de *Staphylococcus aureus*.

En esta etapa se preparó Agar Manitol Salado (Anexo 3) que fue esterilizado por autoclave (ALLAMERICAN modelo N° 25X; USA) a 121°C durante 15 minutos, el medio de cultivo se dejó en un baño de a gua (Grant JBNova;USA) a 48 °C hasta ser utilizado. Tras haber sometido la matriz a tratamiento por radiación UV y termoultrasonificación se procedió a la

inoculación de 1 mL por duplicado de cada nivel por siembra por profundidad, posteriormente se incubo las cajas en una incubadora (Quimis; modelo Q316M, Brasil) a 35°C por 48 h, cumplido este tiempo se procedido al recuento de las mismas.

Como procedimiento confirmatorio para determinar la identidad del analito de interés, se realizó la prueba de coagulasa y DNasa. Tomando en cuenta el criterio de recuento presuntivo descrito en la tabla 8.

8.6.9 Cálculo de la letalidad

La letalidad obtenida en cada tratamiento se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Log}_{10} \left[\frac{N_0}{N+1} \right]$$

Donde N_0 es el recuento inicial, expresadas en UFC/mL y N es el número de bacterias supervivientes después de los tratamientos por radiación UV y termoultrasonificación, expresadas en UFC/mL. La curva de supervivencia para los tratamientos se obtuvo trazando el logaritmo de las fracciones de supervivencia ($N_0 / N + 1$) frente al tiempo de exposición.

8.7 Estimación del efecto sobre el valor nutricional los macronutrientes (proteína, grasa, carbohidratos) y micronutrientes (vitaminas y minerales) de la leche después del tratamiento con radiación ultravioleta y termoultrasonificación.

Para conocer el efecto sobre el valor nutricional de la matriz después del tratamiento por radiación UV y termoultrasonificación se midieron la concentración de los macronutrientes (proteína, grasa y carbohidratos) y micronutrientes (vitaminas y minerales) por medio del LactoStar 3510 FUNKE GERBER perteneciente del laboratorio de Química de Alimentos de la Carrera de Ingeniería Zootecnia e Industria Pecuaria de la Universidad Pública de El Alto.

8.7.1 Calibración del equipo.

8.7.1.1 Limpieza del analizador.

El encendido del analizador se realiza con un interruptor en el panel posterior del equipo, el operador tiene acceso a todos los recursos del sistema. El equipo de LactoStar 3510 FUNKE GERBER (Anexo 4) cuenta con un sistema de limpieza automática, el recipiente con la solución de limpieza (agua bidestilada) tiene que estar conectado hacia el analizador, es importante realizar el proceso de limpieza porque los detectores suelen quedar con trazas y eso suele generar errores al momento de la medición.

8.7.1.2 Programación del LactoStar

Realizado el proceso de limpieza y purga del equipo, se inició con la medición de una muestra comercial con valores conocidos de *proteína, grasa y carbohidratos*. Seguidamente se midieron los parámetros de interés en una muestra que no recibió ningún tipo de tratamiento de conservación como blanco. Hecho esto, se analizaron las muestras de los tratamientos por radiación UV y termoultrasonificación con sus respectivos niveles según el diseño experimental propuesto, los resultados obtenidos por muestra fueron impresos (Anexo 5)

Cada muestra fue analizada por triplicado, para ello se requería un volumen mínimo de 60 a 100 mL por muestra porque el equipo inyectaba un volumen de 12 a 25 mL por medición (Anexo 6) las muestras fueron transportadas en frascos de polietileno de baja densidad del laboratorio de microbiología de la UNIBOL A-TK hasta el laboratorio de Química de Alimentos de la Carrera de Ingeniería Zootecnia e Industria Pecuaria de la Universidad Pública de El Alto.

8.8 Comparación de las propiedades fisicoquímicas (densidad, punto de congelación, extracto seco magro) de la leche después del tratamiento con radiación ultravioleta y termoultrasonificación.

8.8.1 Programación del LactoStar

Realizado el proceso de limpieza y purga del equipo, se inició con la medición de una muestra comercial con valores conocidos de la *densidad, punto de congelación, extracto seco magro*. Seguidamente se midieron los parámetros de interés en una muestra que no recibió ningún tipo de tratamiento de conservación como blanco. Hecho esto, se analizaron las muestras de los tratamientos por radiación UV y termoultrasonificación con sus respectivos niveles según el diseño experimental propuesto.

Cada muestra fue analizada por triplicado, para ello se requería un volumen mínimo de 60 a 100 mL por muestra porque el equipo inyectaba un volumen de 12 a 25 mL por medición (Anexo 7) las muestras fueron transportadas en frascos de polietileno de baja densidad del laboratorio de microbiología de la UNIBOL A-TK hasta el laboratorio de Química de Alimentos de la Carrera de Ingeniería Zootecnia e Industria Pecuaria de la Universidad Pública de El Alto.

8.9 Determinación de la vida útil de la matriz tras haber sido sometido a radiación UV y termoultrasonificación.

La evaluación de la vida útil de la matriz tratada por radiación UV y termoultrasonificación fue realizada por medio del estudio sensorial (color, aroma y textura), fisicoquímico (pH y acidez titulable) y microbiológico (recuento de aerobios mesofilos).

8.9.1 Evaluación sensorial

Las muestras tras haber cumplido el periodo de tratamiento fueron puestas en observación durante 7 días, donde se verificaba y se reportaba los cambios según los

parámetros a ser observados con una valoración de las características organolépticas como se observa en la tabla 9.

Tabla 9. Indicadores de la evaluación organoléptica.

CARACTERÍSTICA	INDICADOR
AROMA	CARACTERÍSTICO
	AGRIO
	FERMENTADO
COLOR	CARACTERÍSTICO
	BLANQUESINO
	AMARILLENTO
TEXTURA	CARACTERÍSTICO
	GRUMOSO (+)
	GRUMOSO (++)
	GRUMOSO (+++)
	GRUMOSO (++++)

8.9.2 Evaluación fisicoquímica

La evaluación fisicoquímica contemplo el seguimiento de la medición de la acidez titulable y el pH en las muestras que fueron tratadas. Al estar aplicando el método de punto de corte se dejó de hacer las mediciones cuando sobrepasaba el valor límite que determina la norma.

8.9.2.1 Acidez titulable

La acidez titulable se determinó mediante la valoración con una solución estandarizada de Hidróxido de Sodio (NaOH) (Sigma Aldrich) al 0,1 N. Se procedió a medir 10 mL de muestra, el volumen medido fue enrazado con 100 mL de agua destilada, donde se agregaron 3 gotas de fenoftaleina como indicador, la titulación procedía hasta el viraje. Posteriormente se registró el volumen gastado para proceder con el cálculo según la siguiente formula.

$$\% \text{Acidez} = \frac{Vg \times N \times Fc \times Fa}{CM} \times 100$$

Donde:

Vg=Volumen gastado de NaOH 0,1 N

N= Normalidad del NaOH

Fc= Factor de corrección del NaOH al 0,1 N

Fa= Factor de análisis del ácido (Fa del ácido láctico 0.009)

CM=cantidad de muestra

8.9.2.2 pH

Previamente se atempero el ambiente a 25 °C y se calibro el pHchimetro con sus respectivos tampones (4; 7; 10). Se tomaron muestras de la matriz tratada en un volumen de 20 mL en un vaso de precipitados y se introdujo el electrodo para poder con la medición. El valor obtenido se registraba en la pantalla del equipo.

8.9.3 Evaluación microbiológica

La evaluación microbiológica para la determinación de la vida útil de la matriz tratada se realizó por medio del recuento de los aerobios mesofilos durante un periodo de tiempo de 7 días por medio del método de placas secas rehidratables (Petrifilm).

8.9.3.1 Recuento de aerobios mesofilos

La placa seca rehidratable para recuento de *aerobios mesofilos* es una placa que ya contiene el medio de cultivo listo para ser utilizado (figura 11), el cual posee un agente gelificante en frio. Es un medio modificado cromogénico de donde se añadio 1 mL de la dilución de la muestra por placa, posterior incubación por 24 ± 2 horas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ o $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Las colonias que presentan una coloración rojiza en la placa.

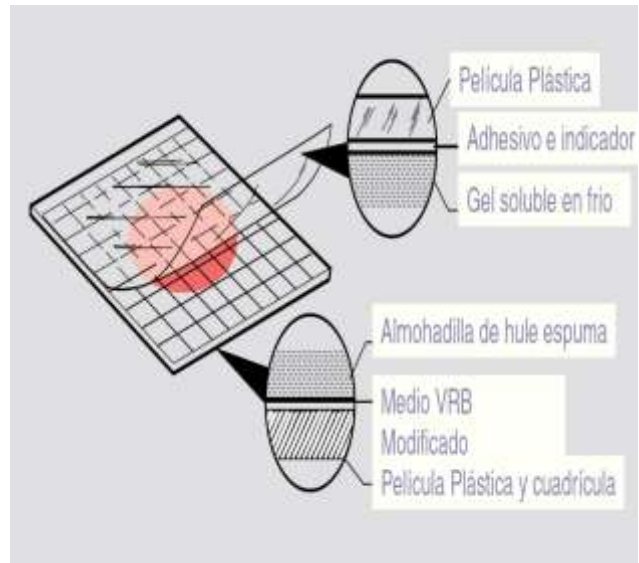


Figura 11. Partes de una placa seca rehidratable (www.3M.com/microbiology).

8.10 Análisis estadísticos

Los experimentos para evaluar el efecto de la aplicación de radiación UV y termoultrasonificación sobre la carga microbiana y el valor nutricional de la leche se realizaron de forma independiente tres veces, con un análisis por duplicado de las muestras en cada repetición. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el Análisis de la Varianza (ANOVA) utilizando el procedimiento GLM (Modelos Lineales Generales) mediante el software Minitab (sistema de software de análisis de datos), versión 16 (StatSoft, Inc., vs 2004).

9. Resultados y discusión

9.1 Construcción del sistema de tratamiento

La figura 12, muestra los componentes del sistema de tratamiento por radiación ultravioleta que fue construido en las instalaciones del laboratorio de Operaciones unitarias de la UNIBOL A-TK.

a)



b)



c)



Figura 12. Componentes del sistema de tratamiento radiación ultravioleta. **a)** Sistema completo realizando el tratamiento de la matriz. **b)** Caudalímetro del sistema y **c)** Lámpara UV en la carcasa.

Como fue mencionado en el apartado (8.5), el sistema fue construido con tubos de PVC, esto por el costo, sin embargo, el material a ser utilizado en la industria alimentaria debe de ser material certificado por el Instituto americano del hierro y el acero (AISI) 430 siendo un acero de propósito general por su ductilidad y buenas características de maleabilidad y resistencia a la corrosión, según la definición de la Asociación Española de Normalización y Certificación AENOR:10088-1, indica que los aceros inoxidable deben tener un contenido mínimo de cromo del 10,5% y un máximo del 1,2% de carbono.

Según Kleeberg (2007), menciona que la aceptabilidad de los alimentos por los consumidores está dada por los sentidos, como la vista, el tacto, el gusto, el olfato o por combinaciones de ellos; al no trabajar con acero inoxidable AISI se corre el riesgo de contaminación cruzada la cual puede cambiar los atributos organoléptico del alimento y así disminuir su aceptabilidad su aceptabilidad por el consumidor.

En otras regiones del mundo como el continente europeo cuenta con normativa que debe ser cumplida a su cabalidad, por ejemplo, según la definición de la Norma Europea EN: 10088-1, indica que los aceros inoxidable deben tener un contenido mínimo de cromo del 10,5% y un máximo del 1,2% de carbono. Aguirre (2019), construyó un equipo para procesar carne donde recomienda utilizar acero inoxidable AISI 304, por las siguientes razones: posee el mismo rango de aplicación que el AISI 430, pero por sus características químicas al incorporar Níquel, permite lograr productos más complejos (ya sea por procesos de formado o soldado) y posee un espectro de resistencia mayor al AISI 430 frente a ciertos agentes en determinadas condiciones de temperatura y pH.

El acero inoxidable tipo 304 es uno de los grados más comúnmente utilizados. Ambos aceros inoxidables 304 y 316 se utilizan en la industria de alimentos y bebidas. Los silos, las cubas, los tanques de queso y de frutas y los tanques de vino a menudo son hechos ya sea de acero inoxidable 304 o 316 (Casaburi *et al.*, 2019).

9.2 Evaluación del efecto de la radiación ultravioleta y termoultrasonificación sobre leche contaminada artificialmente.

Con respecto a los resultados obtenidos en la evaluación del efecto de la radiación UV y termoultrasonificación en matriz contaminada con *E.coli* y *S.aureus* se procederá a describirlos de manera independiente con la finalidad de realizar un análisis más minucioso. Previamente se iniciará el apartado mostrando los resultados obtenidos con el proceso de pasteurización como método de conservación estándar en la industria alimentaria, se pensó en ello porque el análisis del efecto por los métodos propuestos si bien son métodos emergentes estudiados hace bastante tiempo el método que se aplica a diario en las plantas de producción láctea es la pasteurización.

9.2.1 Efecto sobre *Escherichia coli* ATCC 25922

Para la evaluación del efecto sobre *E.coli* se aplicaron tres métodos de conservación, pasteurización, radiación UV y termoultrasonificación. Se aplicaron diferentes tiempos de exposición según el tratamiento sobre la matriz. Los resultados se muestran con graficas de dispersión y el análisis de la varianza (ANOVA) de una sola vía.

En las industrias alimentarias la incorporación de sistemas de gestión de inocuidad como la HACCP teniendo como base a las BPM, BPA, BPL apoyados por un método adecuado de conservación buscan el control de este microorganismo, considerado un indicador sanitario a nivel mundial.



Figura 13. Efecto del proceso de pasteurización sobre la cepa de *E.coli* ATCC 25922.

En la figura 13, podemos observar la aplicación de tres temperaturas de pasteurización sobre la matriz contaminada artificialmente, donde denota que a mayor temperatura se requiere un menor tiempo de exposición para la eliminación del microorganismo en estudio. A 60 °C por un lapso de tiempo de 20 min se logra una disminución considerable de la carga microbiana, a 70 °C se requieren 10 min y a 80°C por 3 minutos se logra un recuento $<1 \times 10^1$ UFC/mL en medio RBCV.

La aplicación de la pasteurización en la industria láctea maneja diferentes rangos de temperatura y tiempo, por ejemplo, para poder pasteurizar la materia prima para la elaboración de queso fresco se lo hace a 65 °C por 30 min, para la elaboración de yogurt se pasteuriza a 80 °C por 3 min. Villegas *et al.*, (2018) determino los parámetros óptimos del tratamiento térmico de leche a 63°C y 70 °C durante 15 a 30 min. Donde hace mención que la temperatura debe ser controlada constantemente porque este factor determina la formación de la cuajada del producto y su rendimiento. Los procesos térmicos si bien son una buena metodología de fácil aplicación para poder controlar la contaminación microbiana. Sin embargo, según Mejia *et al.*, (2017) hace alusión a que los resultados de laboratorio reflejaron que el incremento de

temperatura provocó mayor desnaturalización de las proteínas, un mayor rendimiento y un aumento de humedad en el queso en relación al obtenido con la leche cruda. Los resultados obtenidos en la investigación en fábrica revelaron que a temperatura de 65 y 72 °C el rendimiento disminuye con relación a la producción con leche cruda, pero estadísticamente no presenta diferencias significativas en el rendimiento para leche pasteurizada a 65 °C por 30 minutos y la leche cruda.

Tabla 10. Análisis de varianza para los tratamientos de pasteurización a 60; 70; 80 °C a diferentes tiempos.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1,932175279	2	0,966087639	0,358660776	0,702292469	3,402826105
Dentro de los grupos	64,64633134	24	2,693597139			
Total	66,57850662	26				

La tabla 10, muestra el ANOVA realizado a las mediciones de los grupos donde se obtiene una probabilidad $> 0,05$ indicando que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio. Este resultado muestra la aplicación de las tres temperaturas en el área de la industria alimentaria con respecto a la eliminación de *Escherichia coli*.

Como refiere Mejia *et al.*, (2017) manifiesta que los resultados obtenidos sobre la desnaturalización de las proteínas no se obtuvieron valores estadísticamente significativos al someter a diferentes temperaturas a la matriz de estudio. Sin embargo, se obtuvo el objetivo de disminuir al grado de eliminar rastro de microorganismos en las muestras. Sobre todo, Mariscal (2013) pone énfasis en que la búsqueda de alimentos libres de microorganismos pone en riesgo la calidad del alimento, si bien, estará libre de microorganismos pero también se ocasionara la disminución del valor nutricional.

El problema de la contaminación con *E.coli* se podría solucionar siguiendo las BPM, capacitando al personal y cumpliendo los POE's de limpieza y desinfección porque el microorganismo no es parte del alimento, sino que los procesos de la obtención y la transformación hacen que llegue a la matriz.

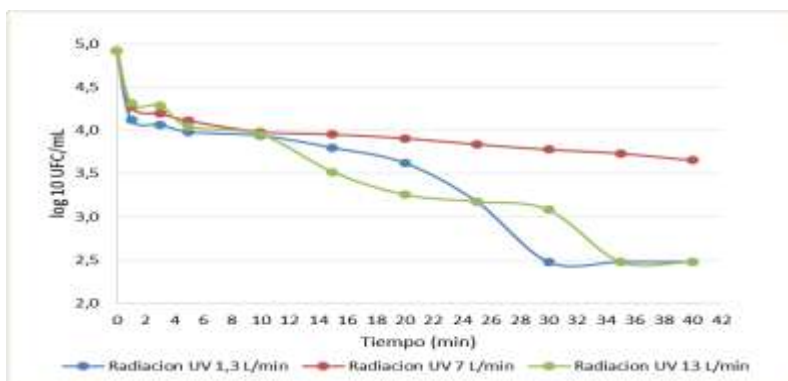


Figura 14. Efecto de la aplicación de radiación UV sobre la cepa de *E. coli* ATCC 25922.

En la figura 14, podemos observar el efecto de la exposición a la radiación UV con un tiempo de 1 a 40 min a tres niveles de caudal (1,3; 7 y 13 L/min). Donde se puede observar que sometiendo la matriz a un caudal de 1,3 L/min se llega a una disminución de tres unidades logarítmicas a un tiempo de 30 min de exposición, por otro lado con un caudal de 13 L/mL se llegó a un resultado similar pero con un tiempo más prolongado. Donde no se llegó a ver efecto sobre *E. coli* fue a un caudal de 7 L/min porque con un lapso de exposición de 40 min solo se logró la disminución de una unidad de logaritmo.

Del mismo modo, Vásquez (2015) trabajo con radiación UV combinada con temperatura, también realizaron la construcción de un sistema de tratamiento, donde incorporaron un baño termostático obteniendo la disminución de los Coliformes totales hasta el valor aceptado por la norma Argentina. Por otra parte, Ordas (2013), determina que *E. coli* es sensible a la radiación UV tras haber comparado varias especies del grupo de los

Coliformes totales, denotando que posee la capacidad de autorepararse por actividad enzimática por medio de una fotoliasa que se activaría a 560 nmλ y que se debe evitar la exposición a la luz después de un tratamiento con radiación UV. En otro sentido Christiani (2018), argumenta que además de la formación de dímeros de pirimidina en el material genético la exposición a radiación UV sobre *Escherichia coli* ocasiona una fotólisis en grupos sulfhidrilo de las proteínas del microorganismo ocasionando su inactivación.

Tabla 11. Análisis de varianza para los tratamientos por radiación UV a 1; 7; 13 L/min a diferentes tiempos.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1,45712325	2	0,728561625	1,91521706	0,164894154	3,315829501
Dentro de los grupos	11,41220451	30	0,380406817			
Total	12,86932776	32				

En la tabla 11, indica el análisis estadístico realizado a los grupos en estudio, por medio del ANOVA se obtuvo una probabilidad de 0,16 indicando que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio. Según Ordas (2013), al trabajar con diferentes caudales obtiene que los grupos tratados muestran una diferencia estadísticamente significativa, pero esto posiblemente se deba porque aplica un método combinado (radiación UV mas calor).

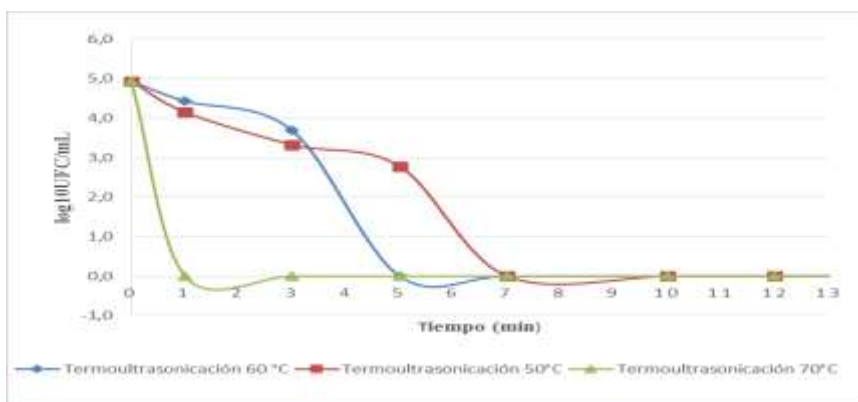


Figura 15. Efecto de la aplicación de termoultrasonificación sobre la cepa de *E.coli* ATCC 25922.

En la figura 15, podemos observar el efecto que ocasiona la termoultrasonificación sobre la cepa de *E.coli*, la frecuencia que se aplicó en los tratamientos fue a 34 KHz de manera constante a tres diferentes temperaturas por un lapso de tiempo de 1 a 15 min, a 50 °C se muestra una reducción de la carga microbiana a un tiempo de 7 min de exposición se logra un recuento de $< 1 \times 10^1$ UFC/mL en medio RBCV, a una temperatura de 60 °C llega al mismo resultado pero con un menor tiempo de exposición y sometiendo la matriz a 70 °C por 1 min se obtiene un recuento de $< 1 \times 10^1$ UFC/mL.

Agregando a lo anterior Céspedes (2019), utilizo el ultrasonido en la estabilización de la chicha de jora, donde obtuvo resultados similares sobre el efecto microbiano como los que se obtuvieron en el presente estudio. Resaltando que la temperatura ayuda en la formación del fenómeno de cavitación en el microorganismo, concluyendo además que se debe de trabajar con una mayor frecuencia de 40 y 42 KHz. Hacer notar que se tuvo la limitación en nuestro caso de poder aplicar estas frecuencias porque el equipo utilizado tiene una frecuencia máxima de 34 KHz.

Tabla 12. Análisis de varianza para los tratamientos por termoultrasonificación a temperaturas de 50; 60; 70 °C a diferentes tiempos.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,91830137	2	0,459150685	1,52063221	0,238897147	3,402826105
Dentro de los grupos	7,246733558	24	0,301947232			
Total	8,165034928	26				

En la tabla 12, se muestra el análisis estadístico entre los grupos de estudio, por medio del ANOVA se obtuvo una probabilidad de $> 0,05$ indicando que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio.

Al obtener resultado no indica que es indiferente la aplicación de los diferentes grupos, porque estadísticamente serían iguales.

Por otra parte, Illanes *et al.*, (2018), tras haber realizado el análisis estadístico concluye que el tratamiento por termoultrasonificación es recomendable para disminuir la contaminación con *E.coli*, denotando que es un contaminante recurrente por las aguas de riego en el cultivo de zanahoria, concluyendo que el tratamiento no afecta características organolépticas del alimento.

9.2.2 Efecto sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Se evaluó el efecto sobre *Staphylococcus aureus* en el que se aplicaron tres métodos de conservación: pasteurización, radiación UV y termoultrasonificación. Donde fue sometido a diferentes tiempos de exposición según el tratamiento sobre la matriz. Los resultados se muestran con graficas de dispersión y el análisis de la varianza (ANOVA) de una sola vía.

Se debe destacar que la NB 33013:2013 no tiene como requisito al parámetro de *S. aureus* en el análisis microbiológico de la leche cruda como tal, la norma pide el recuento de aerobios mesofilos. Dentro de la industria de los lácteos esta materia prima permite la elaboración de otros productos como yogurt, queso, flan entre otros, siendo *S. aureus* un requisito en los productos terminados por ser causante de una ETA's (intoxicación alimentaria).

En la industria alimentaria se procede al monitoreo de superficies, monitoreo ambientes y monitoreo microbiológico de manipuladores, en este último un parámetro que se controla es el recuento de *S. aureus* por ser un punto crítico de control en la obtención de la leche, porque el ordeño en la región es de forma manual.

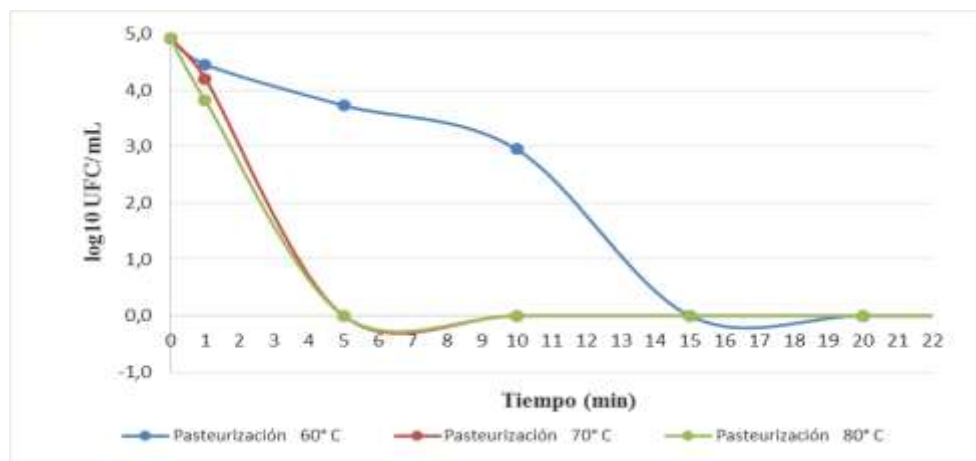


Figura 16. Efecto del proceso de pasteurización sobre la cepa de *S. aureus* ATCC 25923

En la figura 16, podemos observar la aplicación de tres temperaturas de pasteurización sobre la matriz contaminada artificialmente, donde denota que a mayor temperatura se requiere un menor tiempo de exposición para la eliminación del microorganismo en estudio. A 60 °C por un lapso de tiempo de 15 min se logra una disminución considerable de la carga microbiana, a 70 y 80 °C durante 5 minutos se logra un recuento $<1 \times 10^1$ UFC/mL en medio Agar Manitol Salado.

La aplicación de la radiación UV no solo se realiza en alimentos líquidos, por ejemplo Millan (2015), trabajo en el estudio el tratamiento de frutas con radiación UV, destaca que una exposición sobre la superficie por 5 min a 254 nm disminuye la carga microbiana, sin embargo, este tratamiento ocasiona la oxidación de los componentes de las frutas.

Tabla 13. Análisis de varianza para los tratamientos de pasteurización a 60; 70; 80 °C a diferentes tiempos.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,596586171	2	0,298293085	1,253800175	0,303451948	3,402826105
Dentro de los grupos	5,709868441	24	0,237911185			
Total	6,306454611	26				

En la tabla 13, se muestra el análisis estadístico entre los grupos tratados, por medio del ANOVA se obtuvo una probabilidad de $> 0,05$ indicando que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio.

Como fue mencionado anteriormente la pasteurización viene a ser el método estándar para disminuir o eliminar la posible contaminación microbiana en la leche cruda, podemos indicar que la temperatura que se aplique debe de ser inversamente proporcional al tiempo, a mayor temperatura menor tiempo y viceversa. Esto será determinado en base al producto que se quiere elaborar.

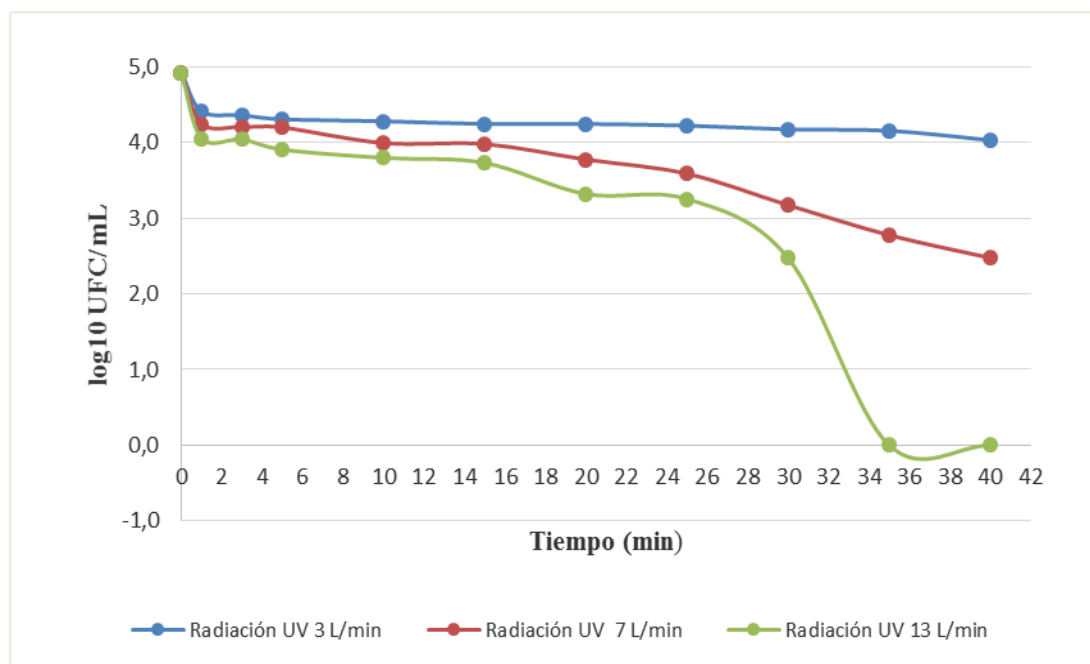


Figura 17. Efecto de la aplicación de radiación UV sobre la cepa de *S. aureus* ATCC 25923

En la figura 17, podemos observar el efecto de la exposición a la radiación UV, se utilizó la radiación por un lapso de tiempo que iba desde uno hasta los 40 min a tres niveles de caudal (1,3; 7 y 13 L/min). Donde se puede observar que sometiendo la matriz a un caudal

de 1,3 L/min no se observa disminución significativa sobre la carga microbiana a los 40 min de tratamiento, con respecto al caudal de 7 L/min con un tiempo de exposición de 40 min se logra una disminución de dos unidades logarítmicas, por otro lado con un caudal de 13 L/min se llegó a un resultado de tener un recuento de $<1 \times 10^1$ UFC/mL en medio Agar Manitol Salado a 35 min de exposición.

Tabla 14. Análisis de varianza para los tratamientos por radiación UV a 1,3; 7; 13 L/min a diferentes tiempos.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1,434417958	2	0,717208979	2,156747586	0,133304392	3,315829501
Dentro de los grupos	9,97625754	30	0,332541918			
Total	11,4106755	32				

En la tabla 14, se observa el análisis estadístico para conocer la diferencia de los grupos, por medio del ANOVA se obtuvo una probabilidad de $> 0,05$ indicando que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio.

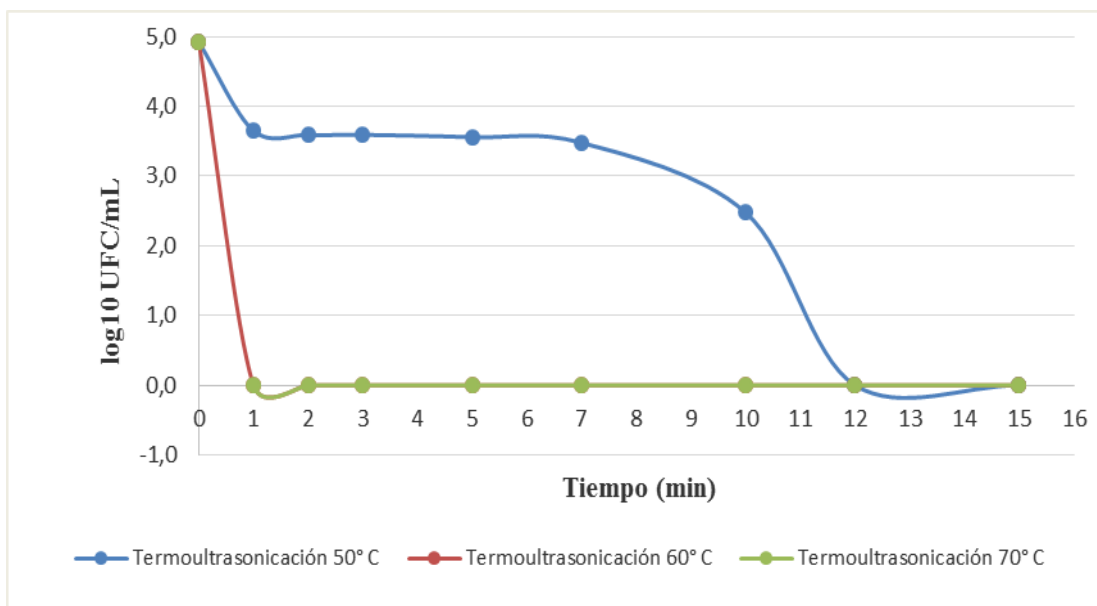


Figura 18. Efecto de la aplicación de termoutrasonicación sobre la cepa de *S. aureus* ATCC 25923.

En la figura 18, podemos observar el efecto que ocasiona la termoultrasonificación sobre la cepa de *S. aureus*, la frecuencia que se aplicó en los tratamientos fue a 34 KHz de manera constante a tres diferentes temperaturas por un lapso de tiempo de 1 a 15 min, donde a 50 °C a un tiempo de 12 min de exposición se logra un recuento de $< 1 \times 10^1$ UFC/mL en medio de cultivo Agar Manitol Salado, tanto a 60 y 70 °C llegan a un recuento de $< 1 \times 10^1$ UFC/mL con 1 min de exposición.

Según Pantoja *et al.*, (2015), sostiene que las bacterias Gram positivas como *S. aureus* a la termoultrasonificación por la estructura de su pared celular, al ser más rígida incrementa la fuerza de cavitación que ocasiona el ultrasonido.

Tabla 15. Análisis de varianza para los tratamientos por termoultrasonificación a temperaturas de 50; 60; 70 °C a diferentes tiempos.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	6,402375905	2	3,201187953	14,20897895	8,48738E-05	3,402826105
Dentro de los grupos	5,407039529	24	0,225293314			
Total	11,80941543	26				

En la tabla 15, se observa el análisis estadístico para conocer la diferencia de los grupos, por medio del ANOVA se obtuvo una probabilidad de $< 0,05$ indicando que si existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio.

9.3 Estimación del efecto sobre el valor nutricional los macronutrientes (proteína, grasa, carbohidratos) y micronutrientes (vitaminas y minerales) de la leche después del tratamiento con radiación ultravioleta y termoultrasonificación.

Para el análisis de esta etapa, así como en el apartado anterior se mostrará los resultados por separado; primero se mostrará el efecto de los tratamientos de la radiación UV y termoultrasonificación sobre el porcentaje de proteína, grasa y carbohidratos y

posteriormente el efecto sobre el porcentaje de vitaminas y minerales para un análisis más minucioso.

9.3.1 Estimación del efecto sobre el valor nutricional del porcentaje de los macronutrientes (proteína, grasa, carbohidratos).

La distribución de los alimentos en nuestro medio se regula por medio de la normativa boliviana mediada por el IBNORCA, en el apartado *4,5 requisitos de composición* de la NB 33013:2013 de la leche cruda y fresca da a conocer los valores límites que debe de cumplir para su comercialización y/o procesamiento tecnológico, aludiendo que el porcentaje mínimo de proteína debe ser al 3%, de materia grasa del 6,60 a 6,80% y de lactosa en un porcentaje de 4,5.

9.3.1.1 Tratamiento con radiación UV.

Para el análisis de esta etapa en las gráficas de dispersión y en el análisis de ANOVA se incluye el grupo de tratamiento por pasteurización a 70 °C por ser un rango intermedio y también ser aplicado por la industria como método de conservación, se lo empleo para poder comparar cuál de los tratamientos repercute más en la composición nutricional de la leche.

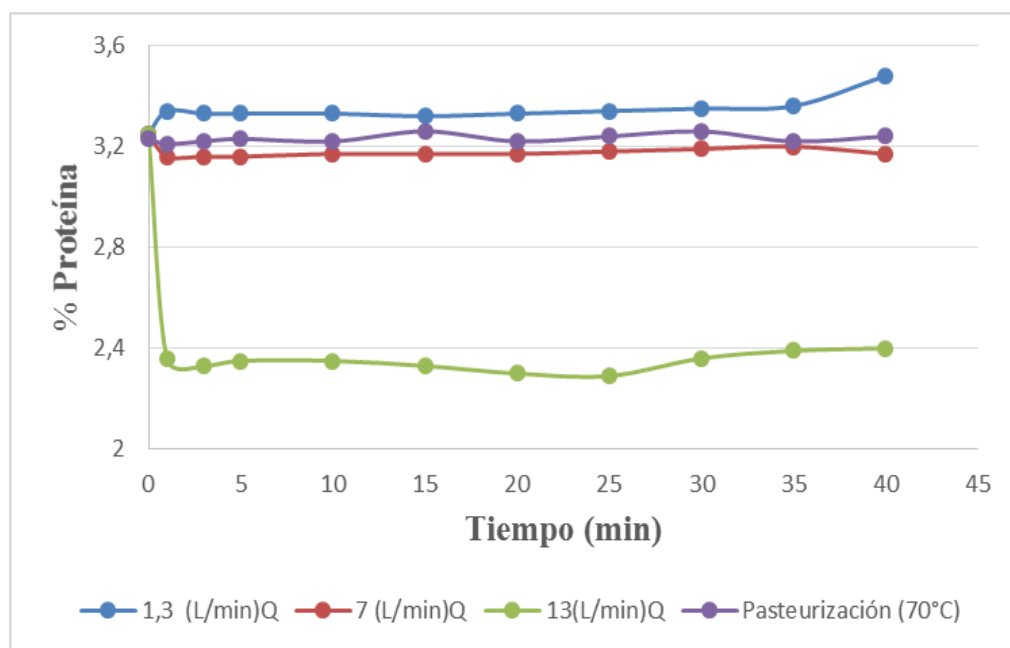


Figura 19. Efecto de la aplicación de radiación UV el porcentaje de proteína.

En la figura 19, podemos observar el efecto de la exposición a la radiación UV, desde un rango de tiempo que iba desde uno hasta los 40 min a tres niveles de caudal (1,3; 7 y 13 L/min). Donde se puede observar que sometiendo la matriz a un caudal de 1,3 L/min no se llega a afectar el porcentaje de proteína en la matriz, un resultado similar se obtiene con un caudal de 7 L/min y el tratamiento de pasteurización a 70°C donde los valores no llegan a variar en todas las mediciones hechas en el tiempo establecido de la prueba, mas al contrario, se observa que tratando la matriz con un caudal de 13 L/min el porcentaje de proteína baja hasta 2,4 al primer minuto de tratamiento manteniéndose en ese rango de medición hasta la conclusión de la prueba.

Según Djobo (2014), tras haber estudiado el efecto del calor, determina la sensibilidad de las proteínas tras los tratamiento térmicos a diferentes temperaturas, concluyendo que efecto es diferentes para proteínas de leche descremada y leche sin descremar. Se hace mención de este aspecto porque el caudal de 13 L/min ocasiona un incremento de la temperatura y la recirculación de la matriz ocasiona la separación de la materia grasa (Alayo 2017), de modo que es de esperarse que la cuantificación de proteínas a este caudal sea menor con respecto a los otros grupos de estudio.

Tabla 16. Análisis de varianza para los tratamientos por acción UV a 1; 7; 13 L/min a diferentes tiempos con respecto al porcentaje de proteína.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	5,7386	3	1,912866667	96,52522287	2,32489E-18	2,838745398
Dentro de los grupos	0,792690909	40	0,019817273			
Total	6,531290909	43				

En la tabla 16, se observa el análisis estadístico para conocer la diferencia de los grupos, por medio del ANOVA se obtuvo una probabilidad de $< 0,05$ indicando que si existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio.

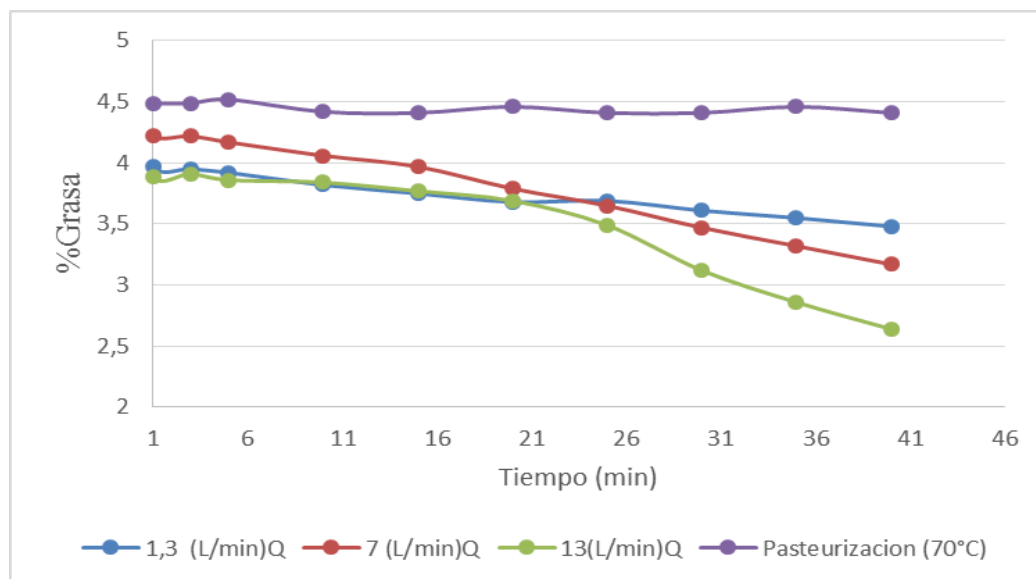


Figura 20. Efecto de la aplicación de radiación UV el porcentaje de grasa.

En la figura 20, podemos observar el efecto de la exposición a la radiación UV, las mediciones fueron realizadas desde el tiempo cero hasta los 40 min a tres niveles de caudal (1,3; 7 y 13 L/min). Donde se puede observar que el comportamiento es similar sobre el porcentaje de grasa a los tres caudales aplicados a lo largo de las mediciones de la prueba, a mayor tiempo de exposición y mayor caudal menor porcentaje de grasa. Podemos notar que con el tratamiento de la pasteurización a 70 °C el porcentaje de grasa no llega a varias a lo largo de la prueba de medición.

El porcentaje de grasa según NB 33013:2013 debe de ser del 3%, sin embargo, este parámetro definirá a que tratamiento tecnológico será sometido la materia prima, llegando incluso a catalogarla y por ende definir también su precio de adquisición. Para la elaboración de quesos se debe de contar con materia prima con un porcentaje de grasa superior al 6%, esto por aspectos de rendimiento. La materia prima que presente valores menores del 3% se adquiere a menor costo y es destinada a la elaboración de yogurt.

Es de conocimiento que los tratamiento de conservación conllevan a un descenso de la concentración de uno o varios componentes de la matriz, sin embargo, las propiedades nutricionales también van relacionados con otros factores como: la raza del animal (criollo, Holstein, Pardo Suizo), alimentación, si esta libre en el campo o se encuentra en su cabaña entre otros.

Tabla 17. Análisis de varianza para los tratamientos por acción UV a 1; 7; 13 L/min a diferentes tiempos con respecto al porcentaje de grasa.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4,422570455	3	1,474190152	10,72538943	2,63763E-05	2,838745398
Dentro de los grupos	5,497945455	40	0,137448636			
Total	9,920515909	43				

En la tabla 17, en la gráfica de dispersión se observa que existe diferencia entre los grupos tratados, por medio del ANOVA se obtuvo una probabilidad $<0,05$ indicando que si existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio con respecto al control.

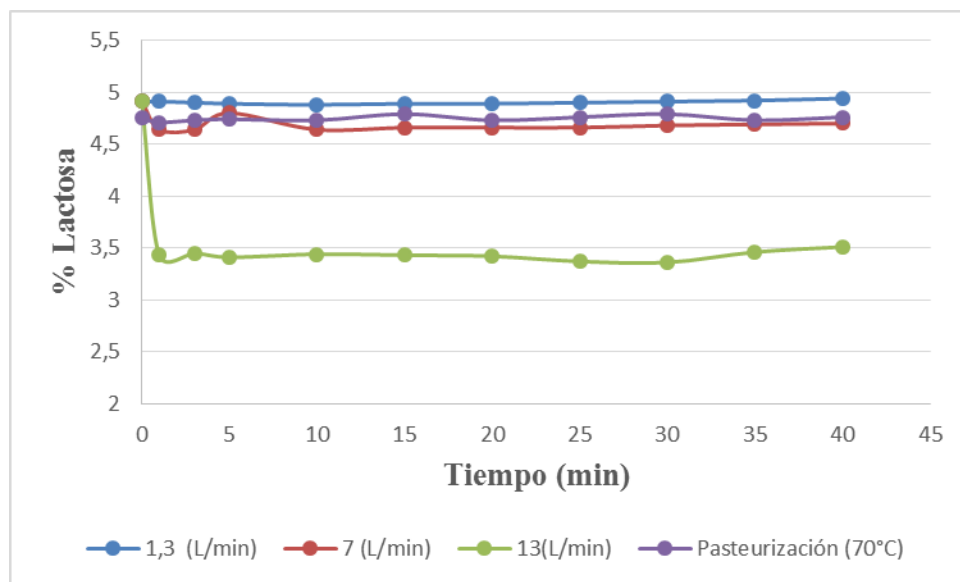


Figura 21. Efecto de la aplicación de radiación UV el porcentaje de lactosa.

En la figura 21, podemos observar el efecto de la exposición a la radiación UV, desde un rango de tiempo que iba desde cero hasta los 40 min a tres niveles de caudal (1,3; 7 y 13 L/min). Donde se muestra que sometiendo la matriz a un caudal de 1,3 y 7 L/min no se llega a afectar el porcentaje de grasa en la matriz con respecto al control que vendría a ser el tratamiento por pasteurización a 70°C a lo largo del periodo de tiempo de la prueba. No obstante, se ve un decremento del porcentaje si la matriz es tratada a un caudal de 13 L/min llegando por debajo del 3,5% desde el inicio de la prueba.

El porcentaje de lactosa según NB 33013:2013 debe de ser del 4,5%. Por otro lado Gómez (2005) tras haber trabajado con la composición de la leche, observa que este fenómeno del descenso de la concentración de lactosa, esto se debe al fenómeno del incremento de la temperatura, haciendo que la leche se descreme, ocasionando que la concentración de lactosa descienda y esta materia prima pueda ser utilizada para la elaboración de yogurt dietético.

Tabla 18. Análisis de varianza para los tratamientos por acción UV a 1; 7; 13 L/min a diferentes tiempos con respecto al porcentaje de lactosa.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	12,53866136	3	4,179553788	79,87472275	6,15007E-17	2,838745398
Dentro de los grupos	2,093054545	40	0,052326364			
Total	14,63171591	43				

En la tabla 18, en la gráfica de dispersión se observa que existe diferencia entre los grupos tratados, por medio del ANOVA se obtuvo una probabilidad <0,05 indicando que si existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio con respecto al control.

9.3.1.2 Termoultrasonificación

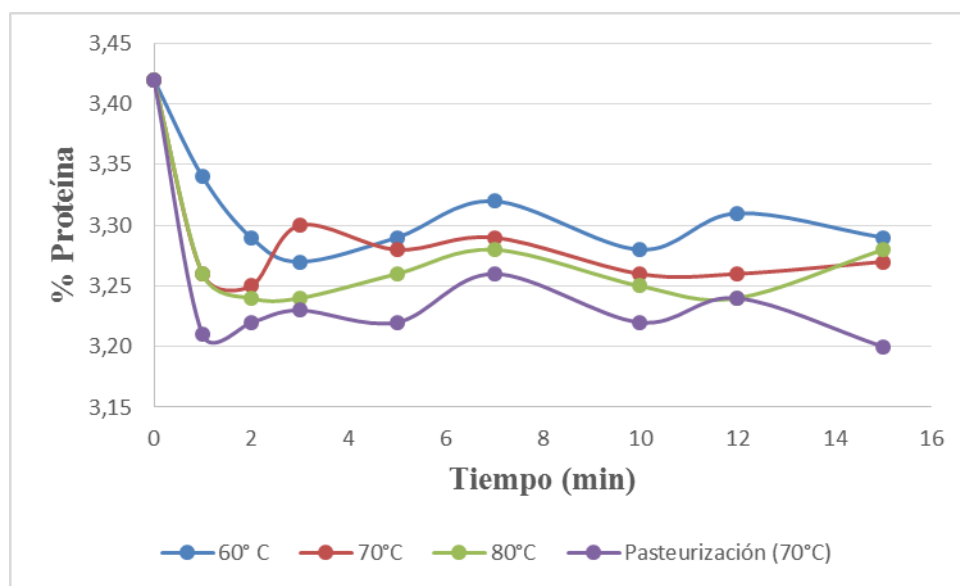


Figura 22. Efecto de la aplicación de termoultrasonificación sobre el porcentaje de proteína.

En la figura 22, podemos observar el efecto que ocasiona la termoultrasonificación sobre el porcentaje de proteína de la matriz tratada, la frecuencia que se aplicó en los tratamientos fue a 34 KHz de manera constante a tres diferentes temperaturas por un lapso de tiempo de 1 a 15 min, el porcentaje proteico de la matriz se mantuvo entre 3,2 a 3,4% hasta la conclusión de la prueba en todos los grupos de estudio incluyendo a la pasteurización a 70°C como método de control de conservación.

Al respecto Santisteban (2012), al estudiar estrategias sanitarias en la industria alimentaria observa que la aplicación de métodos individuales repercute de manera notable al contenido nutricional de las matrices tratadas, llegando a recomendar el uso de métodos combinados por tener condiciones no muy extremas.

A comparación del método de la radiación UV, por medio de la termoultrasonificación no se corre el riesgo de generar fotooxidación de la matriz (Scheidegger, 2013).

Tabla 19. Análisis de varianza para los tratamientos por termoultrasonificación a temperaturas de 50; 60; 70 °C a diferentes tiempos sobre el porcentaje de proteína.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,020163889	3	0,006721296	2,13940466	0,114650959	2,901119584
Dentro de los grupos	0,100533333	32	0,003141667			
Total	0,120697222	35				

En la tabla 19, observamos el análisis estadístico realizado para los grupos tratados, por medio del ANOVA se obtuvo una probabilidad de $> 0,05$ indicando que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio con respecto al control.

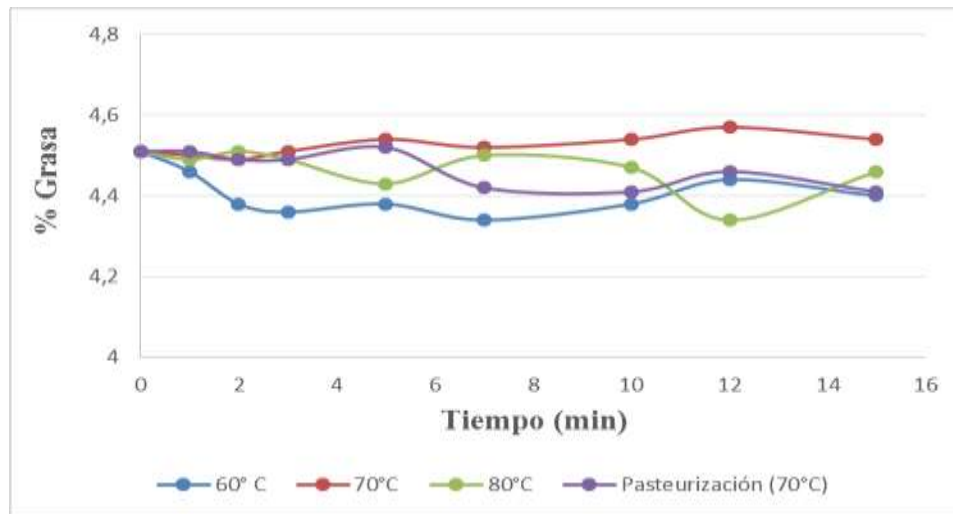


Figura 23. Efecto de la aplicación de termoultrasonificación sobre el porcentaje de grasa.

En la figura 23, podemos observar el efecto que ocasiona la termoultrasonificación sobre el porcentaje de grasa, la frecuencia que se aplicó en los tratamientos fue a 34 KHz de manera constante a tres diferentes temperaturas por un lapso de tiempo de 1 a 15 min, el porcentaje de grasa de la matriz se mantuvo entre 4,3 a 4,6% hasta la conclusión de la prueba en todos los grupos de estudio incluyendo a la pasteurización a 70°C como método control de conservación.

Un resultado así era de predecirse porque en el tratamiento por ultrasonido la matriz se queda estática, las ondas producidas por no generan el descremado de la leche.

Tabla 20. Análisis de varianza para los tratamientos por termoultrasonificación a temperaturas de 50; 60; 70 °C a diferentes tiempos sobre el porcentaje de grasa.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,063697222	3	0,021232407	9,97216786	8,57282E-05	2,901119584
Dentro de los grupos	0,068133333	32	0,002129167			
Total	0,131830556	35				

En la tabla 20, observamos el análisis estadístico realizado para los grupos tratados, por medio del ANOVA se obtuvo una probabilidad de $< 0,05$ indicando que si existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio con respecto al control.

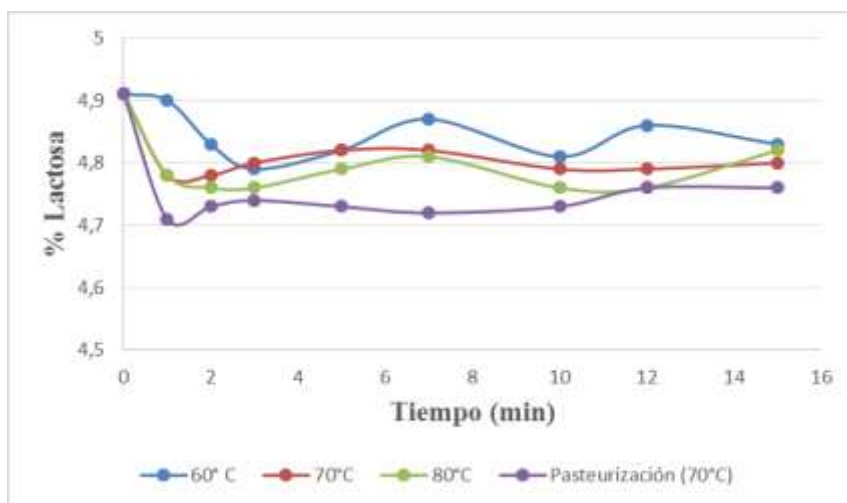


Figura 24. Efecto de la aplicación de termoultrasonificación sobre el porcentaje de lactosa.

En la figura 24, podemos observar el efecto que ocasiona la termoultrasonificación sobre el porcentaje de grasa, la frecuencia que se aplicó en los tratamientos fue a 34 KHz de manera constante a tres diferentes temperaturas por un lapso de tiempo de 1 a 15 min, el porcentaje de lactosa de la matriz se mantuvo entre 4,7 a 4,9% hasta la conclusión de la prueba en todos los grupos de estudio incluyendo a la pasteurización a 70°C como método control de conservación.

Desde otra perspectiva Illanes (2018), manifiesta que la concentración de carbohidratos incrementa tras haber sometido las muestras a ultrasonido en la conservación de zumo de zanahoria, este fenómeno se observa en esa matriz porque el ultrasonido ocasiona la lisis de la pared celular de las células de la zanahoria y por ende la liberación de los componentes intracelulares, sin embargo, en el caso de la leche la lactosa y los componentes nutricionales son parte de la secreción de la ubres de la vaca.

Tabla 21. Análisis de varianza para los tratamientos por termoultrasonificación a temperaturas de 50; 60; 70 °C a diferentes tiempos sobre el porcentaje de lactosa.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,039386111	3	0,013128704	5,59826276	0,003341342	2,901119584
Dentro de los grupos	0,075044444	32	0,002345139			
Total	0,114430556	35				

En la tabla 21, observamos el análisis estadístico realizado para los grupos tratados, por medio del ANOVA se obtuvo una probabilidad de $< 0,05$ indicando que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio con respecto al control.

9.3.2 Estimación del efecto sobre el valor nutricional sobre el porcentaje de los micronutrientes (vitaminas, minerales).

9.3.2.1 Radiación ultravioleta

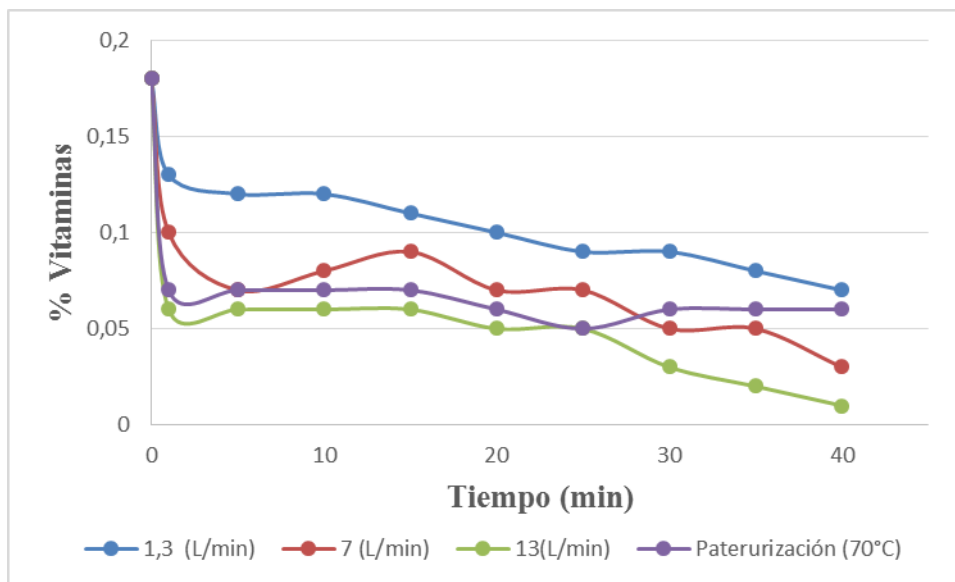


Figura 25. . Efecto de la aplicación de radiación UV sobre el porcentaje de vitaminas.

En la figura 25, podemos observar el efecto de la exposición a la radiación UV sobre el porcentaje de vitaminas, donde las mediciones fueron realizadas desde el tiempo cero hasta los 40 min a tres niveles de caudal (1,3; 7 y 13 L/min). Donde se puede ver que a un caudal de 13 L/min el porcentaje de vitaminas tiene un descenso a partir de los 25 min, por consiguiente el comportamiento es similar sobre el porcentaje a los caudales de 1,3 y 7 L/min con respecto a la pasteurización a 70°C como método de control, pero debemos denotar que hasta los 20 min de exposición el caudal a 1,3 L/min presenta un descenso menor con respecto a los otros grupos.

Con respecto a la concentración de vitaminas Cerón (2013), observa que las vitaminas y componentes termolábiles sufren un descenso con respecto al tratamiento por radiación UV; este fenómeno posiblemente se deba al incremento de la temperatura con respecto al caudal y al tiempo de exposición.

En el estudio realizado por Gomez (2005), indica que la leche contiene vitaminas como la A, D, E, K, B1, B2, B6, B12, C, carotenos, nicotinamida, biotina, ácido fólico, su concentración está sujeto a grandes oscilaciones. El calostro posee una extraordinaria riqueza vitamínica, contiene de 5 a 7 veces más vitamina C y de 3 a 5 veces más vitaminas B2, D y E que la leche normal. También influye la época del año, tiempo atmosférico, ambiente y la alimentación; este último factor repercute especialmente en los carotenos y en la vitamina A como consecuencia de la abundante ingestión de carotenos cuando la base de la alimentación son forrajes frescos. La vitamina E por su parte es 10% más abundante en épocas en que el ganado tiene acceso a forraje más toscos, lo cual posiblemente dependa del mayor contenido graso de la leche en verano. Por lo general, la concentración de las vitaminas hidrosolubles se conserva constantemente. En la vitamina C se observan fluctuaciones dependiendo de la

alimentación. Son variadas las influencias de la manipulación de la leche sobre su contenido vitamínico ya que en el simple almacenamiento se producen pérdidas de vitaminas, dependientes de la temperatura y de las radiaciones lumínicas.

Tabla 22. Análisis de varianza para los tratamientos por acción UV a 1; 7; 13 L/min a diferentes tiempos con respecto al porcentaje de vitaminas.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,0135075	3	0,0045025	2,884676989	0,0489982	2,866265551
Dentro de los grupos	0,05619	36	0,001560833			
Total	0,0696975	39				

En la tabla 22, observamos el análisis estadístico realizado para los grupos tratados, por medio del ANOVA se obtuvo una probabilidad de $< 0,05$ indicando que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio con respecto al control.

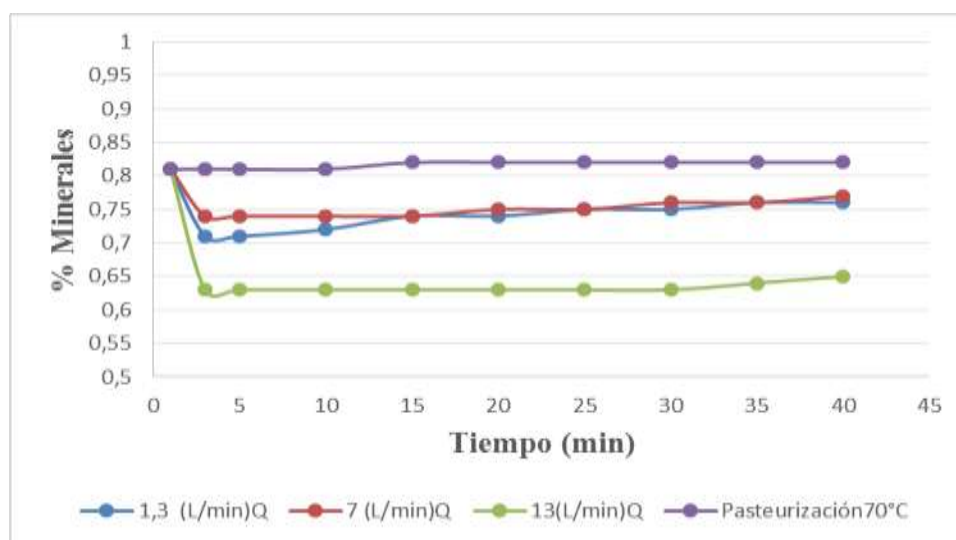


Figura 26. Efecto de la aplicación de radiación UV sobre el porcentaje de minerales.

En la figura 26, podemos observar el efecto de la exposición a la radiación UV, donde las mediciones fueron realizadas desde el tiempo cero hasta los 40 min a tres niveles de caudal (1,3; 7 y 13 L/min). En donde se puede observar que a una exposición aun caudal de 13 L/min el porcentaje de minerales presenta un descenso de 0,8 a 0,6% desde el minuto 3 y

se mantiene con ese valor hasta el final de la prueba. Los grupos que se trabajaron con un caudal de 1,3 y 7 L/min muestran también un descenso de 0,8 a 0,7% hasta la conclusión de la prueba. Con respecto a la pasteurización como método de control mantiene no muestra descenso del porcentaje de minerales a lo largo de toda prueba.

En el estudio realizado por Rivera *et al.*, (2007) donde evaluado los efectos bioquímicos que ocasiona la radiación UV observa que los minerales se encuentran sin afectación tras ser sometido a los diferentes tratamientos evaluados.

Tabla 23. Análisis de varianza para los tratamientos por acción UV a 1; 7; 13 L/min a diferentes tiempos con respecto al porcentaje de minerales.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,13962	3	0,04654	41,04458599	1,04306E-11	2,866265551
Dentro de los grupos	0,04082	36	0,001133889			
Total	0,18044	39				

En la tabla 23, observamos el análisis estadístico realizado para los grupos tratados, por medio del ANOVA se obtuvo una probabilidad de $< 0,05$ indicando que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio con respecto al control.

9.3.2.2 Termoultrasonificación

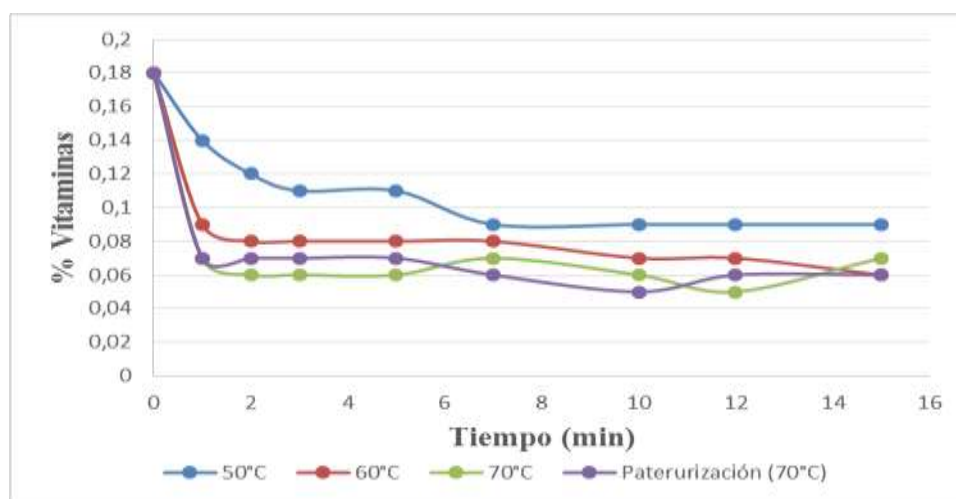


Figura 27. Efecto de la aplicación de termoultrasonificación sobre el porcentaje de vitaminas.

En la figura 27, podemos observar el efecto de la exposición a la termoultrasonificación, donde las mediciones fueron realizadas desde el tiempo cero hasta los 15 min a tres niveles de temperatura (50; 60 y 70°C). En donde se puede ver que a una exposición a 50°C presenta un menor descenso del porcentaje vitaminas a comparación de los otros grupos dentro ello la pasteurización a 70°C como método de control, pero debemos denotar en todos los grupos evaluados muestran un descenso a partir de los 7 min de tratamiento.

Por su parte Illanes (2018), al trabajar con la cuantificación de provitamina A en la conservación de zumo de zanahoria utilizando la termoultrasonificación como método combinado observa que existe una disminución de la concentración al elevar la temperatura y prolongar el tiempo más de 12 min. Describe que este fenómeno se potencia cuando existe una mayor concentración de solidos totales disueltos en el sumo, por lo que da a comprender que a mayor tiempo de maduración de la materia prima se debe aplicar menor tiempo y temperatura.

Tabla 24. Análisis de varianza para los tratamientos por termoultrasonificación a temperaturas de 50; 60; 70 °C a diferentes tiempos sobre el porcentaje de vitaminas.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor critico para F</i>
Entre grupos	0,008322222	3	0,002774074	2,084899095	0,121768844	2,901119584
Dentro de los grupos	0,042577778	32	0,001330556			
Total	0,0509	35				

En la tabla 24, observamos el análisis estadístico realizado para los grupos tratados, por medio del ANOVA donde se obtuvo una probabilidad de $> 0,05$ indicando que si existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio con respecto al control.

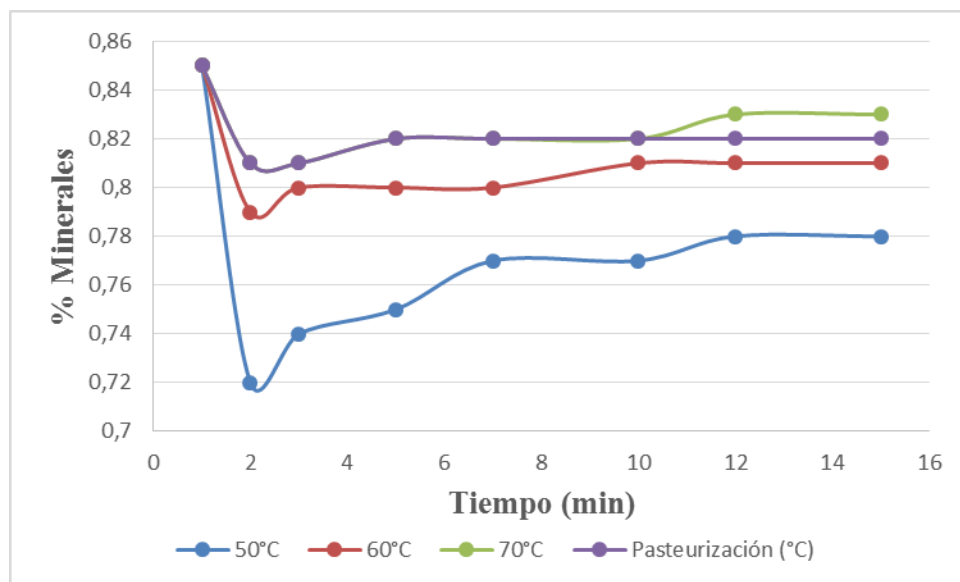


Figura 28. Efecto de la aplicación de termoultrasonificación sobre el porcentaje de minerales.

En la figura 28, podemos observar el efecto de la exposición a la termoultrasonificación sobre el porcentaje de minerales en la matriz tratada, las mediciones fueron realizadas desde el tiempo cero hasta los 15 min a tres niveles de temperatura (50; 60 y 70°C). En donde se puede ver que a una exposición a 50°C presenta un descenso que va de 0,85 a 0,72% de minerales a los 2 min, continuando el tratamiento se va estabilizando pero las mediciones reportan los valores más bajos con relación a los otros grupos. Por otra parte los otros grupos incluyendo la pasteurización a 70°C como método de control cuyo rango se encuentra entre 0,85 a 0,75 % de minerales en la matriz tratada.

Tabla 25. Análisis de varianza para los tratamientos por termoultrasonificación a temperaturas de 50; 60; 70 °C a diferentes tiempos sobre el porcentaje de minerales.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,014809375	3	0,004936458	9,23781676	0,000207011	2,946685266
Dentro de los grupos	0,0149625	28	0,000534375			
Total	0,029771875	31				

En la tabla 25, observamos el análisis estadístico realizado para los grupos tratados, por medio del ANOVA donde se obtuvo una probabilidad de $< 0,05$ indicando que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio con respecto al control.

9.4 Comparación de las propiedades fisicoquímicas (densidad, punto de congelación) de la leche después del tratamiento con radiación ultravioleta y termoultrasonicación.

9.4.1 Radiación ultravioleta

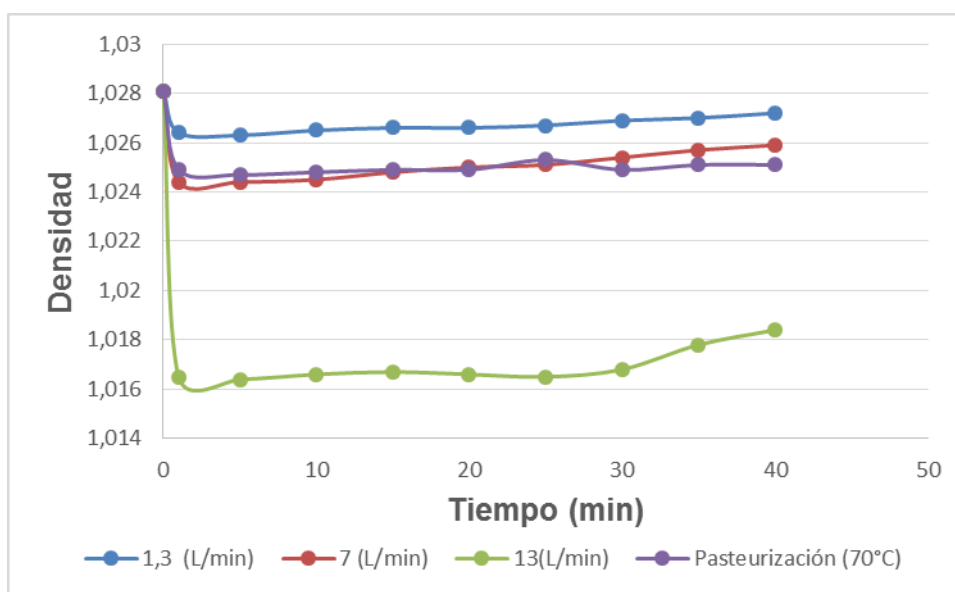


Figura 29. Efecto de la aplicación de radiación UV sobre la densidad.

En la figura 29, podemos observar el efecto de la exposición a la radiación UV, donde las mediciones fueron realizadas desde el tiempo cero hasta los 40 min a tres niveles de caudal (1,3; 7 y 13 L/min). En donde se puede observar que a una exposición aun caudal de 13 L/min ocasiona que la densidad baje 1,016 al primer minuto de tratamiento manteniendo ese valor hasta el final de la prueba. Simultáneamente se muestra que los tramientos a 1,3; 7 L/min y la pasteurización mantienen un valor de 1,024 a 1,026 hasta la conclusión de la prueba.

Tabla 26. Análisis de varianza para los tratamientos por acción UV a 1; 7; 13 L/min a diferentes tiempos con respecto a la densidad.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,000468421	3	0,00015614	93,8201893	4,43938E-17	2,866265551
Dentro de los grupos	5,9913E-05	36	1,66425E-06			
Total	0,000528334	39				

En la tabla 26, observamos el análisis estadístico realizado para los grupos tratados, por medio del ANOVA donde se obtuvo una probabilidad de $< 0,05$ indicando que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio con respecto al control.

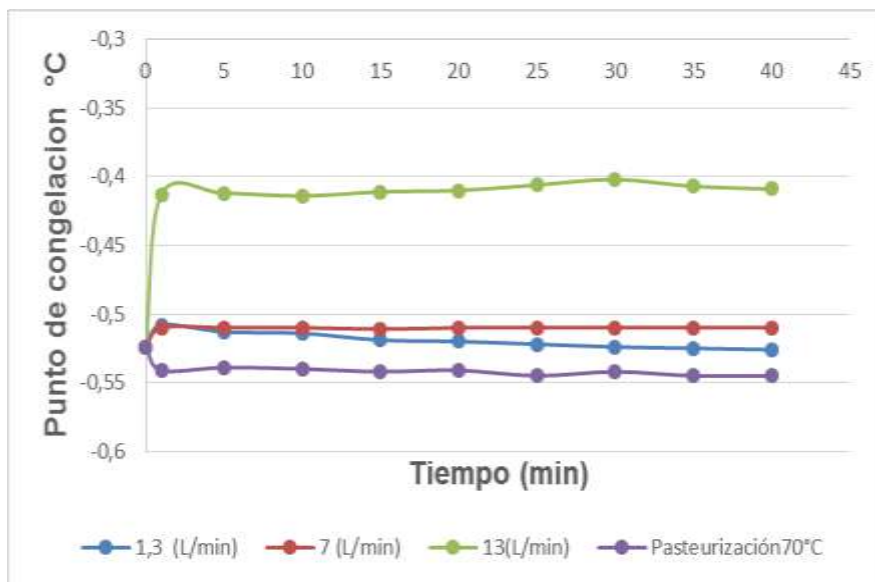


Figura 30. Efecto de la aplicación de radiación UV sobre el punto de congelación.

En la figura 30, podemos observar el efecto de la exposición a la radiación UV, donde las mediciones fueron realizadas desde el tiempo cero hasta los 40 min a tres niveles de caudal (1,3; 7 y 13 L/min). En donde se puede observar que a una exposición aun caudal de 13 L/min ocasiona que el punto de congelación suba de $-0,550$ a $-0,443$ °C, con respecto a los otros grupos evaluados se mantienen en un rango de $-0,550$ a $-0,550$ °C incluido la pasteurización a 70°C como método de control.

Tabla 27. Análisis de varianza para los tratamientos por acción UV a 1; 7; 13 L/min a diferentes tiempos con respecto Al punto de congelación.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,0840209	3	0,028006967	78,8373446	6,86185E-16	2,866265551
Dentro de los grupos	0,012789	36	0,00035525			
Total	0,0968099	39				

En la tabla 27, observamos el análisis estadístico realizado para los grupos tratados, por medio del ANOVA donde se obtuvo una probabilidad de $< 0,05$ indicando que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio con respecto al control.

9.4.2 Termoultrasonificación

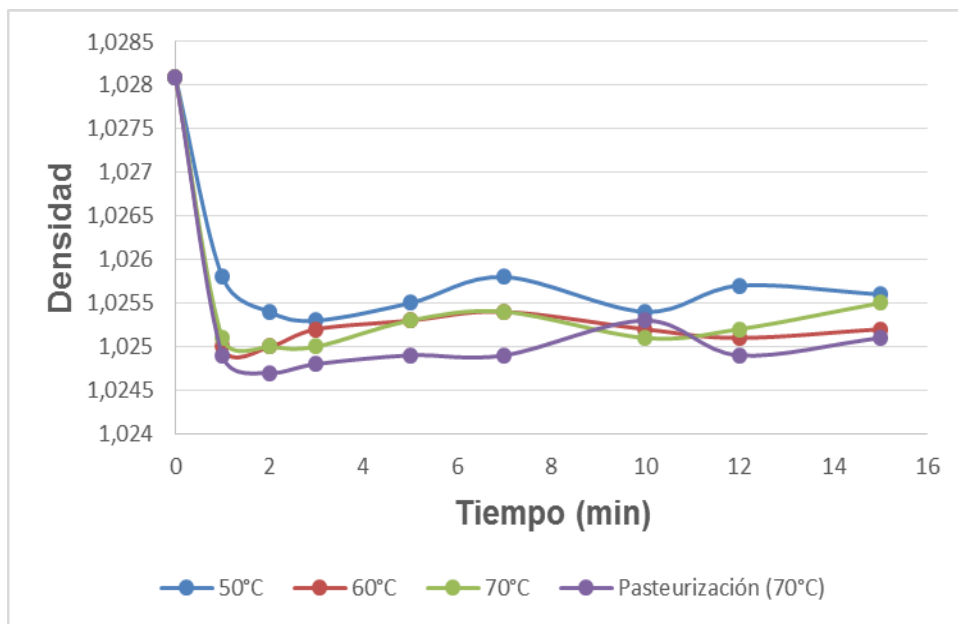


Figura 31. Efecto de la aplicación de termoultrasonificación sobre la densidad.

En la figura 31, podemos observar el efecto de la exposición a la termoultrasonificación, donde las mediciones fueron realizadas desde 1 a 15 min a tres niveles de temperatura (50; 60 y 70°C) frente al proceso de pasteurización a 70 °C como control. En donde se puede ver que el valor de la densidad desciende en todos los grupos manteniéndose en un rango de 1,024 a 1,025 hasta concluir la prueba.

Tabla 28. Análisis de varianza para los tratamientos por termoultrasonificación a temperaturas de 50; 60; 70 °C a diferentes tiempos sobre la densidad.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1,41889E-06	3	4,72963E-07	0,49514116	0,688217031	2,901119584
Dentro de los grupos	3,05667E-05	32	9,55208E-07			
Total	3,19856E-05	35				

En la tabla 28, observamos el análisis estadístico realizado para los grupos tratados, por medio del ANOVA donde se obtuvo una probabilidad de $> 0,05$ indicando que si existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio con respecto al control.

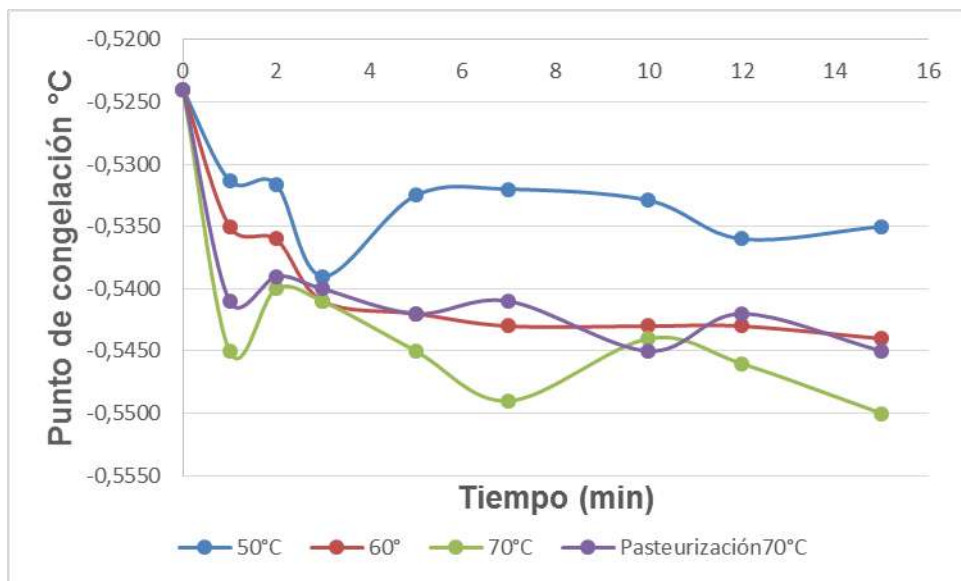


Figura 32. Efecto de la aplicación de termoultrasonificación sobre el punto de congelación.

En la figura 32, podemos observar el efecto de la exposición a la termoultrasonificación, donde las mediciones fueron realizadas desde 1 a 15 min a tres niveles de temperatura (50; 60 y 70°C) frente al proceso de pasteurización a 70 °C como control. En donde se puede ver que el valor del punto de congelación aumenta con los tramientos de 60 y 70 °C aplicando una frecuencia constante de 34 KHz. Si bien existe un aumento pero con 50°C los valores no se encuentran dentro del rango del método control.

Tabla 29. Análisis de varianza para los tratamientos por termoultrasonificación a temperaturas de 50; 60; 70 °C a diferentes tiempos sobre el punto de congelación.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,000478474	3	0,000159491	4,03715338	0,015273982	2,901119584
Dentro de los grupos	0,001264189	32	3,95059E-05			
Total	0,001742663	35				

En la tabla 29, observamos el análisis estadístico realizado para los grupos tratados, por medio del ANOVA donde se obtuvo una probabilidad de $< 0,05$ indicando que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio con respecto al control.

9.5 Determinación de la vida útil.

La determinación de la vida útil de un alimento es de mucha importancia porque esto permite poder conocer el tiempo de vida anaquel para su consumo, llegando a garantizar el grado de inocuidad y de calidad del producto. Para ello se evaluó la vida útil de la leche cruda que fue tratada por los diferentes métodos de conservación: radiación ultravioleta, termoultrasonificación y pasteurización; también se evaluó una matriz sin tratamiento alguno como blanco. El método utilizado para determinar el tiempo de vida útil del producto fue por medio del método de punto de corte donde se tomaron en cuenta las características fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas del producto.

9.5.1 Características fisicoquímicas.

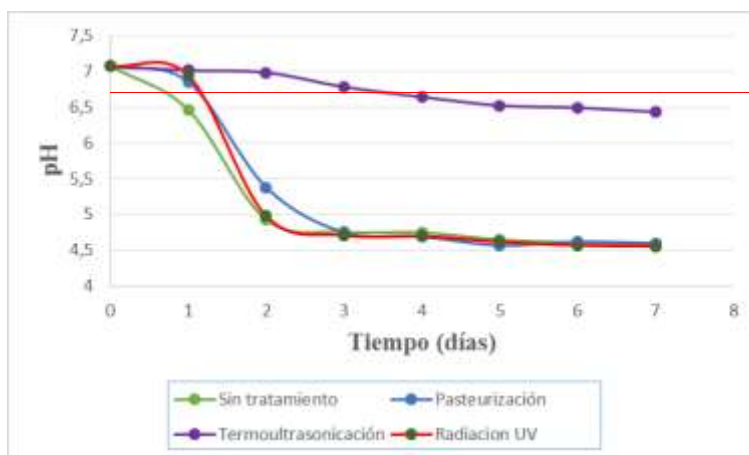


Figura 33. Punto de corte por medio del pH.

En la figura 33, podemos observar el comportamiento del pH con respecto a los diferentes tratamientos aplicados en la matriz, donde haciendo el seguimiento se puede ver que con la aplicación de la termoultrasonificación el pH se mantiene en un rango de 6,5 a 7 hasta el día 7. No obstante los valores de pH muestran un descenso al día 2 con los tratamientos de radiación UV y pasteurización.

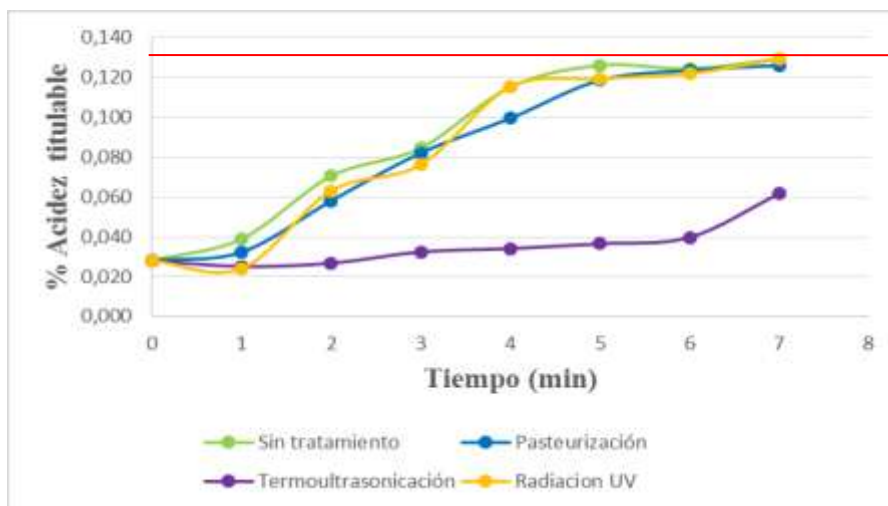


Figura 34. Punto de corte por medio del porcentaje de acidez titulable.

En la figura 34, podemos observar el comportamiento del porcentaje de acidez titulable con respecto a los diferentes tratamientos aplicados en la matriz, donde haciendo el seguimiento se puede ver que con la aplicación de la termoultrasonificación la acidez titulable se mantiene con un valor de 0,070 hasta el día 7, si bien los valores suben con los otros tratamientos los valores medidos no sobrepasan el valor referencia según NB 33013:2013.

9.5.2 Características microbiológicas

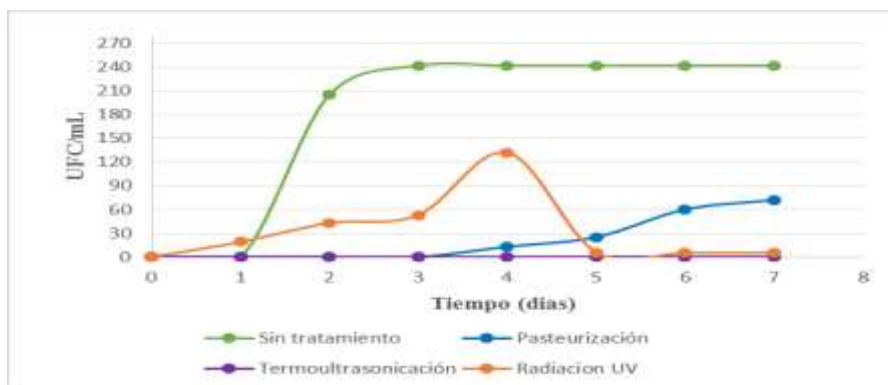


Figura 35. Punto de corte por medio del recuento aerobios mesofilos totales.

En la figura 35, podemos observar el recuento de los aerobios mesofilos totales en muestras en las cuales se aplicaron los tratamientos estudiados, por un lado la radiación UV, termoultrasonificación, pasteurización y una muestra sin ningún tratamiento como blanco. Donde se puede ver que con la aplicación de la termoultrasonificación el recuento es menor a $<1 \times 10^1$ UCF/mL al cabo de los 7 días, por el contrario, la radiación UV y en la pasteurización si presento desarrollo al cuarto día con $1,2 \times 10^2$ UCF/mL y 7×10^1 UCF/mL al séptimo día respectivamente. Como era de esperar el grupo que no recibió ningún tipo de tratamiento mostro un recuento máximo en el segundo día.

9.5.3 características organolépticas

Tabla 30. Características organolépticas de la matriz a diferentes tratamientos.

TIEMPO (días)	SIN TRATAMIENTO			TERMOULTRASONICACION			PATEURIZACIÓN			RADIACION ULTRAVIOLETA		
	AROMA	COLOR	TEXTURA	AROMA	COLOR	TEXTURA	OLOR	COLOR	TEXTURA	AROMA	COLOR	TEXTURA
0	Característico	Normal	Normal	Característico	Normal	Normal	Característico	Normal	Normal	Característico	Normal	Normal
1	Característico	Normal	Normal	Característico	Normal	Normal	Característico	Normal	Normal	Característico	Normal	Normal
2	Agrio	Normal	Grumo (++)	Característico	Normal	Normal	Característico	Normal	Normal	Poco agrio	Ligeramente amarillento	Grumo (+)
3	Fermentado	Ligeramente amarillo	Grumoso (+++)	Característico	Normal	Normal	Característico	Normal	Normal	Fermentado	Amarillo	Grumoso (++)
4	Fermentado	Ligeramente amarillo	Grumo (++++)	Característico	Normal	Normal	Fermentado	Normal	Grumoso (++)	Fermentado	Amarillo	Grumoso (++++)
5	Fermentado	Amarillo y blanco	Grumo (++++)	Característico	Normal	Grumo	Fermentado	Amarillento	Grumoso (+++)	Fermentado	Amarillo y blanco	Grumoso (++++)
6	Fermentado	Amarillo y blanco	Grumo (++++)	Característico	Normal	Grumo (+)	Fermentado	Amarillento	Grumoso (++++)	Fermentado	Amarillo y blanco	Grumoso (++++)
7	Fermentado	Amarillo y blanco	Grumo (++++)	Característico	Normal	Grumo (+)	Fermentado	Amarillento	Grumoso (++++)	Fermentado	Amarillo y blanco	Grumoso (++++)

En la tabla 30, se ve el seguimiento realizado durante 7 días, a la matriz con respecto a los diferentes tratamientos aplicados sobre las características organolépticas. De modo que, la matriz sin tratamiento al segundo día manifiesta deterioro, por otro lado la matriz tratada por la termoultrasonificación mantiene sus características hasta el día 7. La pasteurización y la radiación UV solo logran ampliar el tiempo de la vida útil de la matriz por dos días con respecto a la matriz sin tratamiento.

10. Conclusiones

Tras haber realizado el análisis de los resultados y la discusión de cada punto procedemos a conocer las conclusiones del estudio.

- El prototipo del sistema de tratamiento por radiación UV fue construido, el mismo conto con un caudalímetro que permite medir el caudal y por medio de pasos de llave poder regular el paso de 1,3; 7 y 13 L/min a través de una cascara con una lámpara de 254 nm λ . Podemos concluir que se cumplió con la finalidad de poder bajar la carga microbiana de la leche. Por otro lado también se aporta con información sobre como poder diseñar y construir un sistema de tratamiento simple y económico para los productores de leche para la provincia Omasuyos del departamento de La Paz.
- La evaluación del efecto se realizó sobre la cepa de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, donde se observó que el método de pasteurización disminuye la carga microbiana a los 5 minutos de tratamiento a una temperatura de 80°C con ambos microorganismos y que se llega a un recuento de $<1 \times 10^1$ UFC/mL. Por otra parte con el tratamiento de radiación UV, no se llega a un recuento de $<1 \times 10^1$ UFC/mL a lo largo del tiempo de la prueba con los tres caudales usados en el estudio, donde la cepa de *E.coli* presenta más resistencia que la cepa de *S. aureus*. Finalmente la termoultrasonificación llega a valores similares con la pasteurización porque logra la reducción de la carga microbiana hasta un recuento de $<1 \times 10^1$ UFC/mL a tiempos 1 y 3 min de exposición. De manera que concluimos con respecto a este objetivo que el método más ideal para disminuir la carga microbiana es la termoultrasonificación.
- Con respecto al valor nutricional de la leche donde se observó que el método de radiación UV, a los caudales de 1,3 y 7 L/min no afecta el porcentaje de proteína, grasa

y lactosa, pero a un caudal de 13 L/min ocasiona el descenso del porcentaje de grasa y lactosa principalmente, hasta valores que no estarían en norma. Concerniente a la termoultrasonificación los porcentajes de proteína, grasa y lactosa se mantiene sin alteración alguna durante el tiempo de tratamiento. De cara a los futuros estudios sobre la repercusión del método de conservación, sería conveniente analizar este fenómeno con otras matrices alimentarias.

- Por otro lado las propiedades fisicoquímicas de la matriz como la densidad y el punto de congelación también fueron analizados en este estudio, donde se observó que el método de radiación UV, a los caudales de 1,3 y 7 L/min no afecta el porcentaje de densidad ni el punto de congelación, pero a un caudal de 13 L/min ocasiona el descenso del porcentaje de la densidad y un aumento en el punto de congelación, hasta valores que no estarían en norma. Mas al contrario la termoultrasonificación no ocasiona cambios en la densidad y el punto de congelación. los porcentajes de proteína, grasa y lactosa se mantiene sin alteración alguna durante el tiempo de tratamiento. De cara a los futuros estudios sobre la repercusión del método de conservación, sería conveniente analizar este fenómeno con otras matrices alimentarias.
- Con respecto a la vida útil, tras el seguimiento por el lapso de 7 días de la matriz tratada por los métodos en estudio se concluye que el método más apropiado para alargar la vida útil es la termoultrasonificación.

11. Recomendaciones

- Trabajar con cepas ATCC de referencia, para evaluar el efecto de la aplicación de los tratamientos de conservación con la finalidad de poder observar el desarrollo característico del microorganismo de interés.
- Tomar en cuenta los parámetros no analizados en el presente estudio según NB 33013:2013 para poder llegar a una conclusión más amplia sobre la aplicación de estos métodos de conservación.
- Difundir la información generada hacia las entidades reguladoras de control y vigilancia de alimentos con el objeto de coadyuvar con la toma de medidas preventivas o correctivas para evitar el consumo de alimentos contaminados y de esta forma garantizar la inocuidad de los mismos.
- Utilizar cepas ATCC con mecanismos de resistencia.

12. Perspectivas futuras

- Poder analizar las variaciones que se generaron por la aplicación de los tratamientos ya sea por radiación ultravioleta o termoultrasonificación.
- Probar otros métodos de conservación emergentes como pulsos eléctricos, presiones hidrostáticas entre otros para la conservación de la leche.
- Estudiar la aplicación del sistema de radiación UV combinado con baño termostático en la leche.
- Estudiar la aplicación de los métodos de radiación UV y termoultrasonificación en otras matrices alimentarias, como jugos.
- Evaluar el efecto de la aplicación de los métodos de radiación UV y termoultrasonificación sobre microorganismos esporulados.

13. Bibliografía

- Aguirre Reinoso, W. R., & Bermeo Castro, M. S. (2019). *Diseño y construcción de una máquina cortadora tipo tazón de acero inoxidable para carne de res con capacidad de 10 kg/hora para la microempresa Lucita Carnes y Embutidos* (Bachelor's thesis).
- Alayo Rojas, A. (2017). Determinación de las características fisicoquímicas del suero obtenido de la fabricación de mantequilla de leche de vaca.
- Asociación Española de normalización y certificación AENOR norma Europea (2006) EN 10088-1, Parte 1: Relación de aceros inoxidables octubre.
- Begum, M., Hocking, AD y Miskelly, DI (2009). Inactivación de hongos que deterioran los alimentos por irradiación ultravioleta (UVC). *Revista Internacional de Microbiología de Alimentos*, 129 (1), 74-77.
- Bendicho, S., Espachs, A., Arantegui, J., & Martín, O. (2002). Effect of high intensity pulsed electric fields and heat treatments on vitamins of milk. *Journal of Dairy Research*, 69(1), 113-123.
- Bintsis, T., Litopoulou - Tzanetaki, E. y Robinson, RK (2000). Aplicaciones actuales y potenciales de la luz ultravioleta en la industria alimentaria: una revisión crítica. *Revista de ciencia de la alimentación y la agricultura*, 80 (6), 637-645.
- Casaburi, M., Flamini, N., Lettieri, J., Therisod, M., & Stambullian, M. (2019). Revisión bibliográfica sobre la migración de metales y otros elementos desde utensilios de cocina hacia los alimentos. *Revista Nutrición Investiga*, 4 (1), 1-58.

- Cerón, J. P. P. Q., Pérez, Y. B., & Real, C. V. (2013). Avances en la aplicación de luz ultravioleta de onda corta (UVC) en frutas y vegetales enteros y mínimamente procesados: revisión. *Tumbaga*, 1(8), 29-60.
- Céspedes Cáceres, J. E. (2019). Efecto de la aplicación de frecuencia ultrasónica y tiempo en la estabilización microbiológica de chicha de jora.
- Chavarría Morbioni, M. L. (2010). *Determinación del tiempo de vida útil de la leche de soya mediante un estudio de tiempo real* (Bachelor's thesis).
- Cheftel, J. C. y Dumay, E. (1993). Microcoagulación de proteínas para el desarrollo de "cremosidad". *Food Reviews International*, 9 (4), 473-502.
- Collette, L. (2011). Ahorrar para crecer: guía para los responsables de las políticas de intensificación sostenible de la producción agrícola en pequeña escala.
- Conservación no térmica de alimentos. Gustavo V. Barbosa-Cánovas, Usha R. Pothakamury, Enrique Palou y Barry G. Swanson. Traducido por Albert Ibarz Ribas. Publicado en 1999 por Editorial Acribia, SA XIII + 280 pp., ISBN 84200 0888 5
- Cristiani, M. (2018). Estudio del daño producido en el ADN y proteínas de *Escherichia coli* por desinfección mediante radiación UV-C y APA.
- Diehl, J. F. (1993). ¿La irradiación mejorará o reducirá la seguridad alimentaria? *Política alimentaria*, 18 (2), 143-151.
- Djubo, O. (2014). Efectos de los tratamientos térmicos sobre las proteínas de la leche.
- Ehlermann, D. A. (2009). The RADURA-terminology and food irradiation. *Food control*, 20(5), 526-528.

- Fernández Collado, C., Baptista Lucio, P., & Hernández Sampieri, R. (2014). Metodología de la Investigación. *Editorial McGraw Hill*.
- Fernández, M., & Hierro, E. (2016). Pulsos de luz: una nueva tecnología para la higienización de los alimentos listos para el consumo. *Actas de la Real Academia Española de Ciencia Veterinarias*.
- Figuerola, G., Navarrete, P., Caro, M., Troncoso, M., & Faúndez, G. (2002). Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos en manipuladores de alimentos. *Revista médica de Chile*, 130(8), 859-864.
- Flores, T. G., & Herrera, R. A. R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud pública de México*, 47(5), 388-390.
- García-Caicedo, J., Villota-Paz, J., & Rojas-Navarro, J. F. (2017). Evaluación del efecto de temperatura, tiempo, pH y UFC, sobre la vida útil de leche pasteurizada en marcas comercializadoras en Pasto (Nariño). *Revista Biumar*, 1(1).
- Ghosh, P. y Calam, J. (1989). Antral *Helicobacter pylori*, hipergastrinemia y úlceras duodenales: efecto de la erradicación del organismo. *BMJ: British Medical Journal*, 299 (6714), 1504.
- Gómez, D. A. A., & Mejía, O. B. (2005). Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. *Revista Lasallista de investigación*, 2(1), 38-42.
- Gonzales-Malca, J., & Abanto-López, M. (2020). Inocuidad de los derivados lácteos comercializados en la Región Amazonas. *Revista de Investigación de Agroproducción Sustentable*, 4(2), 78-84.

- González-Púmariega, M., Tamayo, M. V., & Sánchez-Lamar, Á. (2009). La radiación ultravioleta. Su efecto dañino y consecuencias para la salud humana. *Theoria*, 18(2), 69-80.
- Gutteridge, J. (1993). Radicales libres y aditivos alimentarios. *Revista médica de posgrado*, 69 (809), 250.
- Hernández Garay, A., Enríquez Quiroz, J. F., Pérez Pérez, J., Quero Carrillo, A. R., & Herrera Haro, J. G. (2011). Rebrote y estabilidad de la población de tallos en el pasto *Panicum maximum* cv.'mombaza' cosechado en diferentes intervalos de corte. *Revista fitotecnia mexicana*, 34(3), 213-220.
- Hijnen, W. A. M., Beerendonk, E. F., & Medema, G. J. (2006). Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo) cysts in water: a review. *Water research*, 40(1), 3-22.
- Instituto boliviano de normalización y calidad (IBNORCA) (NB) 33013:2013 Productos lácteos-leche cruda y fresca- Requisitos.
- Illanes Castañeta, R., & La Fuente Arias, C. I. A. (2018). *Efecto de la termoultrasonificación en zumo de zanahoria (daucus carota) sobre la carga microbiana y el contenido nutricional* (Doctoral dissertation).
- Jordá, G. B., Marucci, R. S., Guida, A. M., Pires, P. S., & Manfredi, E. A. (2012). Portación y caracterización de *Staphylococcus aureus* en manipuladores de alimentos. *Revista argentina de microbiología*, 44(2), 101-104.

- Kleeberg-Hidalgo, F. (2007). El HACCP y la ISO 22000: Herramienta esencial para la inocuidad y calidad de los alimentos. *Ingeniería industrial*, (025), 69-86.
- Kuo, S., Sainju, UM y Jellum, EJ (1997). Influencia del cultivo de cobertura invernal sobre el nitrógeno del suelo. *Revista de la Sociedad de Ciencias del Suelo de América*, 61 (5), 1392-1399.
- Lado, B. H., & Yousef, A. E. (2002). Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes and infection*, 4(4), 433-440.
- Laegreid, WW, Elder, RO y Keen, JE (1999). Prevalencia de *Escherichia coli* O157: H7 en terneros de carne de rango al destete. *Epidemiología e infección*, 123 (2), 291-298.
- Lahou, E. y Uyttendaele, M. (2014). Evaluación de tres dispositivos de frotis para la detección de *Listeria monocytogenes* en diferentes tipos de superficies en contacto con alimentos. *Revista internacional de investigación ambiental y salud pública*, 11 (1), 804-814.
- Lee, PR (1994). Irradiación para prevenir enfermedades transmitidas por alimentos. *JAMA*, 272 (4), 261-261.
- Loaharanu, P. (1995). Food irradiation: current status and future prospects. In *New methods of food preservation* (pp. 90-111). Springer, Boston, MA.
- Loret de Mola Garay, J. E. (2011). Estilos y estrategias de aprendizaje en el rendimiento académico de los estudiantes de la Universidad Peruana 'Los Andes' de Huancayo-Perú. *Revista de estilos de aprendizaje*.

- Lucht, L., Blank, G. y Bousa, J. (1998). Recuperación de microorganismos transmitidos por los alimentos de daños por radiación potencialmente letales. *Revista de protección alimentaria*, 61 (5), 586-590.
- Malca, J. G., Villegas, S. M. P., & López, M. S. A. (2019). Calidad de los derivados lácteos producidos en la Región Amazonas, Perú, 2018. *Revista Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*, 1(3), 14-19.
- Mariscal, P. C. A., Ibáñez, R. A., & Gutiérrez, M. F. D. (2013). Características Microbiológicas de Leche Cruda de Vaca en Mercados de Abasto de Trinidad Bolivia. *Revista Científica Agrociencias Amazonía*, 18.
- Mejía-López, A., Rodas, S., & Baño, D. (2017). La desnaturalización de las proteínas de la leche y su influencia en el rendimiento del queso fresco. *Enfoque UTE*, 8(2), 121-130.
- Millán Villarroel, D., Romero González, L., Brito, M., & Ramos-Villarroel, A. Y. (2015). Luz ultravioleta: inactivación microbiana en frutas. *Saber*, 27(3), 454-469.
- Mofidi, A. A., Meyer, E. A., Wallis, P. M., Chou, C. I., Meyer, B. P., Ramalingam, S., & Coffey, B. M. (2002). The effect of UV light on the inactivation of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* cysts as determined by animal infectivity assay (P-2951-01). *Water research*, 36(8), 2098-2108.

OMS/OPS INOCUIDAD ALIMENTARIA <https://www.paho.org/es/temas/inocuidad-alimentos>

- Ordas, E. G. (2013). *Desarrollo de procesos combinados de higienización de alimentos basados en la aplicación de radiación ultravioleta y calor* (Doctoral dissertation, Universidad de Zaragoza).
- Pantoja-Espinoza, J. C., Proal-Nájera, J. B., García-Roig, M., Cháirez-Hernández, I., & Osorio-Revilla, G. I. (2015). Eficiencias comparativas de inactivación de bacterias coliformes en efluentes municipales por fotólisis (UV) y por fotocatalisis (UV/TiO₂/SiO₂). Caso: depuradora de aguas de Salamanca, España. *Revista mexicana de ingeniería química*, 14(1), 119-135.
- Pellegrino, M. S., Frola, I. D., Odierno, L. M., & Bogni, C. I. (2011). Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 12(7), 1-14.
- Peña, Y. P., Hernández, M. E., & Castillo, V. L. (2014). Resistencia antimicrobiana en *Salmonella* y *E. coli* aisladas de alimentos: revisión de la literatura. *Panorama. Cuba y Salud*, 6(1), 30-38.
- Raso, J., Palop, A., Pagan, R., & Condon, S. (1998). Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by combining ultrasonic waves under pressure and mild heat treatment. *Journal of applied microbiology*, 85(5), 849-854.
- Reuter, G. (1985). Medios electivos y selectivos para bacterias del ácido láctico. *Revista Internacional de Microbiología de Alimentos*, 2 (1-2), 55-68.
- Rivera-Pastrana, D. M., Béjar, A. A. G., Martínez-Téllez, M. A., Rivera-Domínguez, M., & González-Aguilar, G. A. (2007). Efectos bioquímicos postcosecha de la irradiación UV-C en frutas y hortalizas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(4), 361-372.

- Rubeglio, E. A., & Tesone, S. (2007). *Escherichia coli* O157 H7: presencia en alimentos no cárnicos. *Archivos argentinos de pediatría*, 105(3), 193-194.
- Rubio Montero, D. (2017). Efecto de la radiación UV-C en la flora nativa y capacidad antioxidante de la mezcla para té compuesto por toronjil, ortiga, perejil y paico provenientes de Cotacachi-Ecuador. *Revista Politécnica*, 39(1), 19-26.
- Santisteban, F. L. D. (2012). Tecnología Alimentaria y Salud Humana. El Caso de la Leche y los Productos Lácteos. La Industria Alimentaria como Estrategia Sanitaria. Producciones Artesanales y Seguridad Alimentaria (Discurso de entrada del doctor Francisco Luis Dehesa Santisteban con ocasión de su ingreso en la Real Academia de Medicina del País Vasco en sesión celebrada el 14 de febrero de 2011). *Gaceta Médica de Bilbao*, 109(2), 79-88.
- Scheidegger, D. (2013). Fotooxidación de proteínas de leche [Tesis doctoral Universidad Nacional de Córdoba].
- Silva, J. F. M., Feitosa, A. C., & Rodrigues, R. M. (2017). Staphylococcus aureus em alimentos. *DESAFIOS-Revista Interdisciplinar Da Universidade Federal Do Tocantins*, 4(4), 15-31.
- Silvestre Esquivel Antonio. (2005) “Producción lechera en el municipio de Achacachi (prov. Omasuyos) y su relación con la demanda y oferta de crédito” UMSA (tesis de Licenciatura).
- Sozer, N. y Kokini, JL (2009). Nanotecnología y sus aplicaciones en el sector alimentario. *Tendencias en biotecnología* , 27 (2), 82-89.

- Suárez Guato, D. J. (2013). *Determinación de los cambios físico-químicos, sensoriales y microbiológicos en la lechuga (Lactuca sativa), Variedad capitata sometida a tratamiento con luz ultravioleta de onda corta (UV-C)* (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Bioquímica).
- Suárez, L. C., & Piñeros, Y. (2013). Tratamiento con radiación UV: Alternativa en la poscosecha de lechuga (*Lactuca sativa*) variedad batavia en la sabana de Bogotá. *Alimentos Hoy*, 22(28), 13-22.
- Tregidga, H., & Milne, M. J. (2006). From sustainable management to sustainable development: a longitudinal analysis of a leading New Zealand environmental reporter. *Business Strategy and the Environment*, 15(4), 219-241.
- Vásquez Mazo, P. (2015). *Efecto de la combinación de luz ultravioleta y temperatura en el procesamiento de leche y derivados* (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- Villegas Soto, N. R., Hernández Monzón, A., & Díaz Abreu, J. A. (2018). Optimización de pasteurización de la leche y momento de corte de la cuajada para queso fresco enzimático artesanal. *Tecnología Química*, 38(2), 386-397.

ANEXOS

Anexo 1. Lámpara UV



Anexo 2. Preparación y composición de medio Agar Rojo Bilis Cristal Violeta (RBCV)

Componente	Cantidad (g)
EXTRACTO DE LEVADURA	3.0
PEPTONA	7.0
SALES BILIARES	1.5
LACTOSA	10.0
CLORURO DE SODIO	5.0
ROJO NEUTRO	0.03
CRISTAL VIOLETA	0.002
AGAR	15.0

Suspender 41,5 g del polvo en 1 L de agua purificada. Reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición durante 1 minuto para disolución total. No esterilizar en autoclave. La siembra de las muestras fue realizada por profundidad.

Anexo 3. Preparación y composición de Agar manitol salado.

Componente	Cantidad (g)
EXTRACTO DE CARNE	3.0
PEPTONA DE CARNE	7.0
TRIPTEINA	1.5
MANITOL	10.0
CLORURO DE SODIO	5.0
ROJO FENOL	0.03
AGAR	15.0

Suspender 108 g del polvo en 1 L de agua purificada. Reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición durante 1 minuto para disolución total. Esterilizar en autoclave a 121°C. La siembra de las muestras fue realizada por profundidad.

Anexo 4. Equipo LactoStar



Anexo 5. Reporte del equipo

Tuesday 2017/06/13 01:18:51
Nr. 7 (P 2, P. 0) 12/68
4.44% Grasa
9.04% extraco seco magro
3.31% Proteina
4.86% Lactosa
1.0257 Densidad
-0.536°C Punto de congelacion (calc)
0.78 % Minerales

Anexo 6. Análisis de las muestras



Anexo 7. Equipo de termoultrasonido



Anexo 8. *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923 en medio Agar manitol salado



Anexo 9. *Escherichia coli* cepa ATCC 25922 en medio Agar Mac Conkey



Anexo 10. Sistema de tratamiento por radiación UV



Anexo 11. Ganado vacuno raza *Holtein*

