



Influencia de la turbidez en el efecto antimicrobiano de la luz ultravioleta y de los pulsos luminosos de luz blanca en néctar de naranja (*Citrus sinensis*)

Turbidity influence in the antimicrobial effect of the ultraviolet light and luminous pulses of white light in orange nectar (*Citrus sinensis*)

Meregildo Silva Ramirez ^{1,*}, Wilson Castro Silupu ¹, Jimy Oblitas Cruz ^{2,*}

¹ El Franco - Barrio de Higos Urco - Ciudad Universitaria, Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, Chachapoyas, Amazonas. Perú.

² Av. Atahualpa N° 1050, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cajamarca, Perú

Recibido 25 Marzo 2010; aceptado 15 Junio 2010

Resumen

La presente investigación tuvo por objetivo determinar la influencia del nivel de turbidez en el efecto antimicrobiano de la luz ultravioleta y luz blanca en néctar de naranja (*Citrus sinensis* L.). Dicha investigación fue realizada en una cámara de tratamiento de luz UVC con paredes de espejo y una lámpara de luz ultravioleta de 15 watts. El néctar, sometido a un proceso de pasteurización (90 °C, 10 minutos), se inoculó con levadura liofilizada (*Saccharomyces cerevisiae*), cepa MIT L51, hasta concentraciones de 1.0; 0.1 y 0.01 % (p/p) y se determinó la turbidez de las diluciones, reportando valores de turbidez de 10564, 1304 y 813 UTN respectivamente. Las muestras fueron expuestas a tres diferentes dosis, 0.57; 1.14 y 1.71 J/cm², tomando una muestra testigo denominada "0" minutos, para efectos de análisis inicial de microorganismos. Posteriormente a la aplicación del tratamiento se realizó el recuento en placas, en medio agar Sabouraud. Obtenidos los datos en la lectura de las colonias resultantes se determinó la tasa de supervivencia en cada tratamiento y el valor de la constante de reducción decimal "D" en J/cm². Dichos datos mostraron que la turbidez, debido a los sólidos disueltos, influencia adversamente la actividad antimicrobiana de la luz UVC. Se concluye que la actividad antimicrobiana expresada en términos de la constante de reducción decimal "D", bajo las condiciones de tratamiento en el néctar de naranja, depende directamente de la turbidez e indirectamente del la energía total transmitida.

Palabras clave: Actividad antimicrobiana, constante de reducción decimal, luz UVC, turbidez, pasteurización en frío.

Abstract

This investigation aimed to determine the influence of the level of turbidity in the antimicrobial effect of ultraviolet light on orange nectar (*Citrus sinensis* L.). The investigation was conducted in a chamber treatment UVC light with walls of mirror and a lamp ultraviolet light of 15 watts. The nectar, subjected to a process of pasteurization (90 °C, 10 minutes), were inoculated with freeze-dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), strain MIT L51, until concentrations of 1.0, 0.1 and 0.01% (w/p) and determine the turbidity of the dilutions, reporting turbidity values of 10564, 1304 and 813 NTU respectively. The samples were exposed to three different doses, 0.57, 1.14 and 1.71 J/cm² taking a sample witness called "0" minutes, for purposes of initial analysis of microorganisms. Subsequent to the implementation of treatment took place in the tally sheets, amid Sabouraud agar. Obtained data in the reading of the resulting colonies determined the survival rate in each treatment and value the constant decimal reduction "D" in J/cm². These data showed that the turbidity, due to the dissolved solids, adversely influence the antimicrobial activity of UVC light. We concluded that antimicrobial activity expressed in terms of constant decimal reduction "D", under these conditions treatment in the nectar of orange, depends directly and indirectly of the turbidity of the total energy transmitted.

Keywords: Antimicrobial activity, constant decimal reduction, UVC light, turbidity, nonthermal pasteurization.

* Autor para correspondencia
E-mail: joblitas78@gmail.com (J. Oblitas)

1. Introducción

La industria alimenticia ha estado trabajando en métodos de descontaminación microbiana y el mejoramiento de las técnicas para la mejor evaluación de los riesgos, la identificación y caracterización de riesgos (HACCP) ha incrementado los requerimientos del análisis de los productos alimenticios. Sin embargo, proteger las fuentes alimenticias y asegurar la seguridad del público genera un desafío, especialmente con los nuevos sistemas de procesamiento y el desarrollo de nuevos patógenos.

Para la prevención del deterioro de los tejidos animales y vegetales se presenta una difícil tarea, con doble cometido, se debe no solo conservar el alimento para su uso sino también excluir de él las otras fuerzas naturales que lo degradan. Los cambios que se pueden producir en los alimentos son de origen bioquímico no microbiano ó cambios microbianos, siendo las causas: físicas, químicas o enzimáticas; interviniendo en el deterioro de los alimentos simultáneamente (Sosa, 2006).

La aplicación de las tecnologías emergentes a los procesos de conservación de alimentos deberán permitir obtener productos de excelente calidad, a un precio razonable y, por encima de todo, seguros. En general se busca que los nuevos métodos de tratamiento y conservación sean menos agresivos con el alimento, con unos menores consumos energéticos y más eficaces contra enzimas y microorganismos alterantes y patógenos. Dentro de las tecnologías asociadas a esta línea de desarrollo se encuentran aplicación de rayos ultra violeta (UVC) y aplicación de pulsos luminosos de luz blanca (Dunn, 1997; Gómez-López *et al.*, 2007).

2. Materiales y métodos

Cámara axénica (UV) Centrifuga discontinua (6000 RPM), turbidímetro, Liofilizador Terroni LC 1500, Sistema de generación de

pulsos luminosos, Materiales de vidrio. Además se utilizó levadura MIT-L51 y muestras de naranja del distrito de Santo Tomas – Rodríguez de Mendoza.

Los pasos que se siguieron para la realización de este estudio se describen a continuación: La cámara de irradiación UV se construyó utilizando espejos de cristal como paredes y un fluorescente de luz UV (253.7 nm), tal como se puede ver en la figura 1.

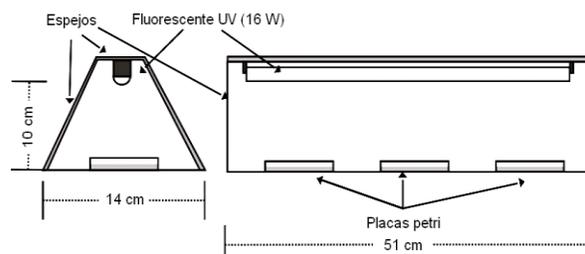


Figura 1. Esquema de la cámara de tratamiento con luz ultravioleta

El generador de pulsos de luz blanca se construyó tomando como base las tres partes básicas que la componen (FAO, 2001) y se pueden apreciar en la figura 2:

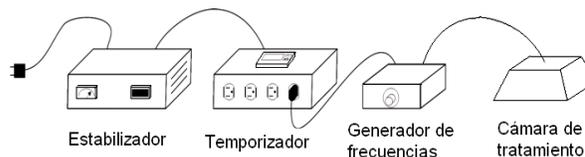


Figura 2. Esquema del sistema generador de pulsos de luz blanca

El temporizador controló los tiempos de tratamiento de las muestras, tanto de luz blanca como de luz UV. El generador de frecuencias, es un circuito de acumuladores (condensadores) con base en las luces estroboscópicas; la pulsación se genera utilizando las pulsaciones generadas en el triac mediante los dos diac que se encuentran conectados en serie.

La cámara de tratamiento, se construyó utilizando paredes de espejo y dos flashes de Xenón de 420 V, donde se aplico el

tratamiento con luz pulsante blanca se muestra en la figura 3:

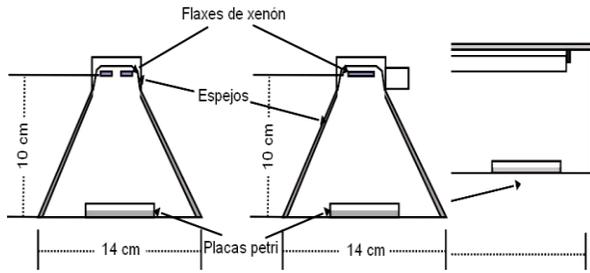


Figura 3. Esquema de la cámara de tratamiento con luz pulsante blanca

La determinación de la turbidez se realizó mediante nefelometría, usando un turbidímetro con escala de 0 a 1000 UTN, para cada una de las muestras y realizando un análisis de regresión a los resultados a fin de poder estimar la influencia de la

concentración de levaduras en la turbidez total de las soluciones.

Las muestras inoculadas con levadura fueron tratadas en una cámara de luz UVC y luz blanca. Los tratamientos de las muestras se realizaron sometiendo estas a la luz UVC y blanca por periodos crecientes de 5, 10 y 15 minutos; para cada periodo se calculó la cantidad de energía transmitida a la superficie de la muestra. A fin de evitar crecimiento a expensas del consumo de los componentes del néctar, con lo cual se variaría las condiciones del experimento, se inoculó la levadura, antes liofilizada, hasta llegar a concentraciones de 1, 0.1 y 0.01 % p/p. Posteriormente se realizó el tratamiento de las muestras siguiendo el procedimiento observado en la figura 4.

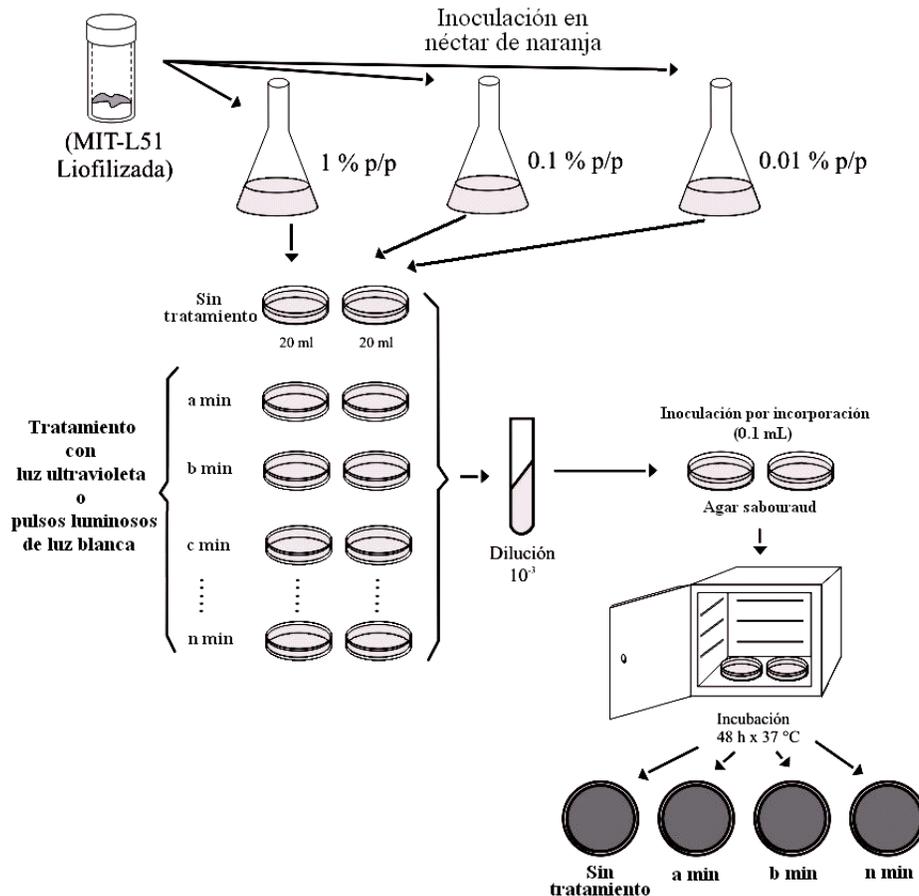


Figura 4. Esquema experimental para la determinación del efecto antimicrobiano

Para determinar si existe o no diferencias significativas fue realizado un análisis de varianza (ANVA) para la turbidez y tipo de agente antimicrobiano (tipo de luz). Fue utilizado un delineamiento experimental aleatorizado, con tratamientos en esquema causalizado, con tratamientos dispuestos en esquema de estímulo creciente, referentes a 4 niveles de tratamientos: 0 (testigo) 0.57; 1.14 y 1.71 J/cm², con 3 repeticiones por tratamiento.

3. Resultados y discusión

La energía total transmitida mediante el sistema de luz UV sólo es dependiente del tiempo y de la posición de la lámpara con respecto a la muestra. Al controlar esta posición se logró la trasmisión “teórica” fija de una cantidad de energía calculable sobre la muestra (Tabla 1).

Tabla 1

Energía total transmitida con respecto al tiempo de tratamiento

Tiempo (min)	Energía transmitida (J/cm ²)
0	0.00
5	0.57
10	1.14
15	1.71

La energía de la luz pulsante blanca no sólo depende del tiempo y de la posición de la lámpara, sino además de la frecuencia de los pulsos y la energía que estos conducen. En la figura 5 se puede observar la evolución de los voltajes con respecto al tiempo para cada punto del generador de frecuencias y del cual se determinaron las frecuencias, voltajes, tiempos de descarga, etc. Dicho estudio se realizó utilizando un osciloscopio de onda senoidal de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad Nacional de Trujillo. El sistema generador de pulsos de luz blanca, con base en los datos mostrados en la figura 5, entregó seis diferentes frecuencias, cada una con voltaje diferente (Tabla 2).

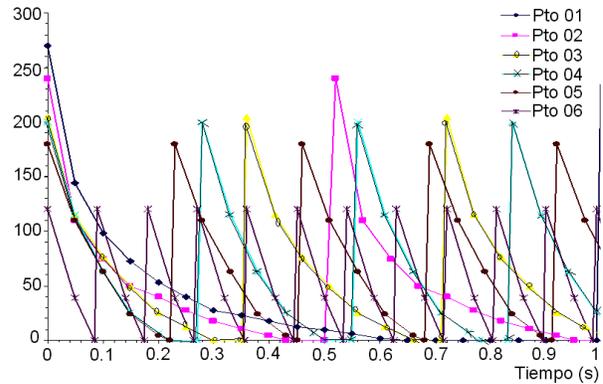


Figura 5. Evolución de voltaje en función del tiempo para cada punto del generador de frecuencias

Tabla 2

Frecuencia y voltaje de disparo del equipo generador de pulsos luminosos

Pto	Frecuencia (Hz)	Volt (C.A)
1	1.0	380
2	1.9	338
3	2.8	287
4	3.5	281
5	4.3	253
6	11.4	169

Considerando la ley de Reciprocidad o de Burlen Roscoe (cuando el producto de la intensidad y el tiempo de exposición son constantes, el hecho fotoquímico es el mismo; Valdivia, 2004) fue analizada la frecuencia y el voltaje de cada punto, eligiéndose el punto en que las curvas se interceptan (Figura 6).

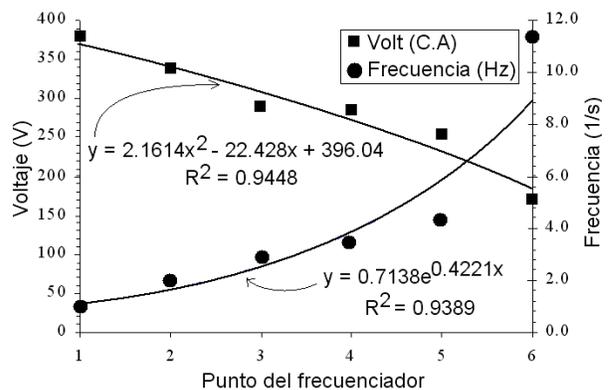


Figura 6. Voltaje y frecuencia de los puntos del selector de frecuencia.

En base a la selección del punto 5, con una frecuencia de 4.3 s^{-1} y 253 voltios, la energía total transmitida mediante este sistema se detalla en la tabla 3.

Tabla 3

Variación de las frecuencias y voltajes para cada punto del frecuenciador.

Tiempo (min)	Energía transmitida (J/cm ²)
0	0.0
5	1.0
10	1.9
20	3.8
30	5.8

Las muestras de néctar de naranja se caracterizaron a fin de poder mantener constante nuestro objeto de estudio. En la tabla 4 se detallan los resultados de la caracterización.

Tabla 4

Características promedio del néctar utilizado

Requisitos fisicoquímicos	Promedio
Sólidos solubles (°Brix) a 20°C	12
pH	4.5
Sólidos en suspensión en % (V/V)	12
Benzoato de sodio y/o sorbato de potasio (solos o en conjunto) (g/100 ml)	0.0
Requisitos microbiológicos:	
Bacterias patógenas	No analizadas
Moho y levaduras	Sin presencia detectable

Por otro lado, la turbidez de las muestras es directamente proporcional a la concentración de levaduras (Figura 7) con ajuste a una ecuación de primer grado. A efectos de poder determinar la influencia de la turbidez del néctar de naranja en la turbidez total, se determinó la turbidez de dilución de levadura en agua destilada. De la diferencia entre ambas líneas resulta el valor del néctar (en promedio 713 UTN).

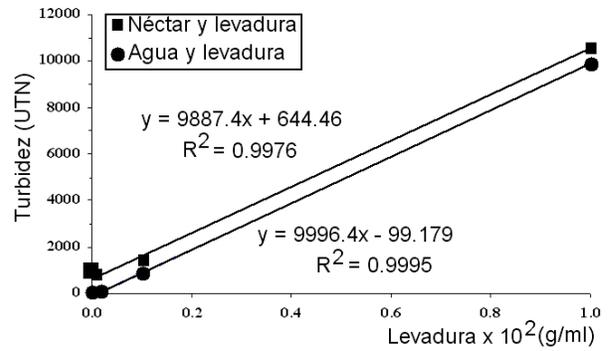


Figura 7. Turbidez de néctar de naranja y agua destilada inoculadas con levadura a diferentes concentraciones.

En las figuras 8 y 9 se pueda apreciar los porcentajes de inactivación logrados mediante tratamiento con luz UVC y con luz pulsante blanca, según energía transmitida. Las turbideces de las muestras 10564, 1304 y 813 UTN corresponden a concentraciones de 1, 0.1 y 0.01 %, respectivamente.

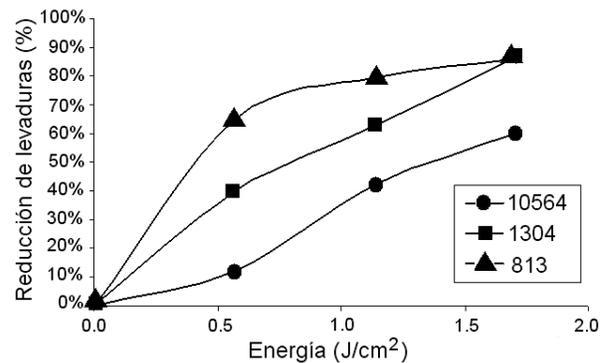


Figura 8. Porcentaje de inactivación de levaduras mediante luz UV.

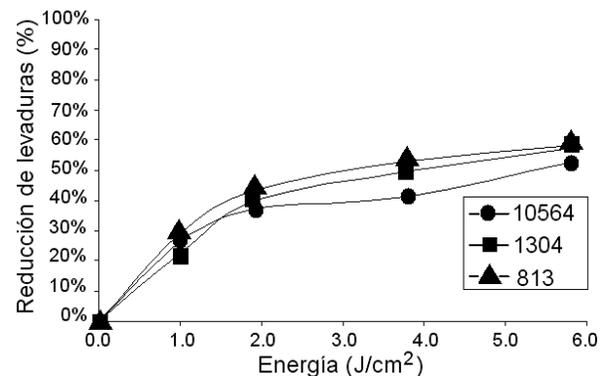


Figura 9. Porcentaje de inactivación de levaduras mediante luz blanca.

Los valores de la constante de reducción decimal “D” obtenidos, tanto en J/cm^2 como en minutos, se presentan en la figuras 10 y 11 para la luz UVC y luz pulsante blanca, respectivamente.

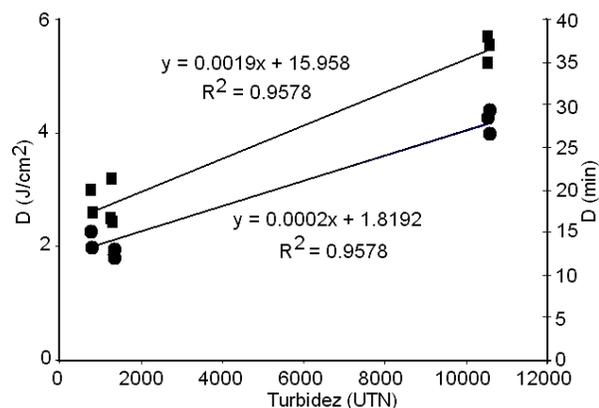


Figura 10. Constante de reducción decimal en el tratamiento con luz UV.

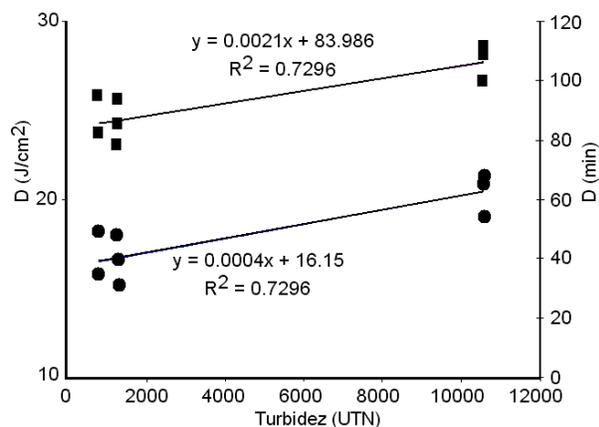


Figura 11. Constante de reducción decimal en el tratamiento con luz pulsante blanca.

En ambos casos se muestra una dependencia directa entre el valor de la constante de reducción decimal y la turbidez de la muestra, la que como ya se ha mencionado, es dependiente de la concentración microbiana.

El flujo luminoso “teórico” o cantidad de energía máxima transmitida a las muestras fluctuó entre 1.71 y $5.8 \text{ J}/\text{cm}^2$ para la luz UV y la luz pulsante blanca, respectivamente,

comprendido en la definición de la FAO 2000 para los tratamientos con luz. Se logró valores de inactivación máximos de entre 87% para el tratamiento con luz UV y 58% para el tratamiento con luz pulsante blanca; es decir menos de 1 reducción logarítmica para las muestras en estudio. Sin embargo, Gómez-López *et al.*, (2005) realizando tratamientos en lechugas y coliflores, mínimamente tratadas, logró reducciones de entre 0.27 y 1.67 en 45 segundos de exposición. En ese estudio, la energía total no ha sido claramente determinada, aunque hace referencia a Sharma (2003), que utilizó $0.3 \text{ J}/\text{cm}^2$.

Wekhof (2003) muestra que para lograr una reducción decimal con un pulso simple se requiere de aproximadamente $30000 \text{ W}/\text{cm}^2$, pero ello depende de la duración del pulso. A su vez Gómez-López *et al.* (2005) muestra que la composición del medio es crucial para la descontaminación con este tipo de tecnologías, siendo los medios con alto contenido de proteínas o aceites inapropiados para la descontaminación mediante luz pulsante. En este trabajo, la presencia de proteínas (levaduras inactivadas en capas superficiales de la muestra) generó un efecto de protección para aquellos microorganismos que se encontraban en capas inferiores de la muestra.

Thu-Thi-Tran y Farid (2004), quién trató jugo de naranja con luz ultravioleta tipo C en un equipo de flujo continuo a nivel de laboratorio, logró valores “D” entre 0.087 y $0.19 \text{ J}/\text{cm}^2$. Hay que precisar que en ese trabajo se controló también el espesor de la película (de 0.21 a 0.48 mm); este espesor comparado con los 5 mm utilizados en esta investigación permitió que el agente antimicrobiano tenga menor cantidad de “capas” que atravesar.

Gómez-López *et al.* (2005) argumentan que los tratamientos con luz pulsante blanca se ha dirigido especialmente al tratamiento de superficies de alimentos que contienen un

amplio espectro de luz y ricos en luz UV (tipo C); esto se debe a la poca penetrabilidad de los mismos y debido a que el mecanismo principal, propuesto por Wekhof (2003), es la destrucción de la pared microbiana generada por un repentino calentamiento de los mismos. Sin embargo, cuando el pico de poder del pulso es insuficiente para lograr el calentamiento, o si el medio lo impide como cuando se encuentra el microorganismo en suspensión acuosa, resulta sólo en una acción germicida similar al de una lámpara UV estándar; lo cual por el bajo valor de “D” obtenido es presumiblemente el caso que hayamos encontrado. Además, Labas *et al.* (2005) propone un modelo de cinética de inactivación microbiana el cual se desprende de la consideración que el efecto de la intensidad de la luz absorbida en la inactivación no es directamente proporcional a la radiación incidente absorbida y presenta un orden de dependencia inusual. Esto explicaría los bajos valores de correlación en las regresiones lineales para la determinación del valor “D”.

4. Conclusiones

Resulta factible la inactivación microbiana en néctar de naranja; aunque el contenido de sólidos disueltos y la turbidez ejercen efecto adverso al tratamiento. Por otro lado, la cinética de inactivación microbiana en los pulsos luminosos de luz blanca no es de primer grado.

El efecto antimicrobiano, expresado como valor de tiempo de reducción decimal “D”, bajos las condiciones de tratamiento en el néctar de naranja, es influido por la turbidez del medio (relación lineal):

Luz ultravioleta

$$D \text{ (J/cm}^2\text{)} = 1.81891 - 0.000222 * \text{Turbidez (UTN)}$$

$$D \text{ (min)} = 15.958 - 0.0019 * \text{Turbidez (UTN)}$$

Pulsos luminosos de luz blanca

$$D \text{ (J/cm}^2\text{)} = 16.15 - 0.0004025 * \text{Turbidez (UTN)}$$

$$D \text{ (min)} = 83.97 - 0.002094 * \text{Turbidez (UTN)}$$

El nivel de sobrevivencia microbiana depende directamente de la turbidez e indirectamente del tiempo de exposición o energía total transmitida por el agente desinfectante, presentando la luz ultravioleta menores tiempos de reducción decimal, con respecto a los pulsos luminosos de luz blanca.

Referencias

- Dunn, J. 1997. Investigation of pulsed light for terminal sterilization of WFI filled blow/fill/seal polyethylene containers. Parenteral Drug Association J. of Pharm. Sci. & Tech. 51(3): 111-115.
- FAO, 2000. Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing Technologies – Pulsed Light technology. Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/~com.m/ift-pul.html>
- FAO, 2001. Technical Elements of New and Emerging Non Thermal Food Technologies. Disponible en: www.fao.org/ag/ags/agsi/Nonthermal/nonthermal_1.htm
- Gómez-López, V; Devlieghere, F.; Bonduelle, V.; Debevere, J. 2005. Intense Light pulse decontamination of minimally processed vegetables and their shelf life. International Journal of Food Microbiology 03(1): 79-89.
- Gómez-López, V; Ragaert, P.; Debevere, J; Devlieghere, F. 2007. Pulsed Light for food decontamination: a review. Trends in Food Science and Technology 18(9): 464-473.
- Thu-Thi-Tran, M; Farid, M. 2004. Ultraviolet treatment of orange juice. Innovative Food Science & Emerging Technologies 5(4): 495-502.
- Labas, M.D.; Martín, C.A.; Cassano, A.E. 2005. Kinetics of bacteria disinfection with UV radiation in an absorbing and nutritious medium. Chemical Engineering Journal 114(1-3): 87-97.
- Sosa, D. 2006. Pulsos eléctricos de alta tensión para conservación de alimentos y esterilización médica. XIV Seminario de Ing. Biomédica – Facultades de Medicina e Ingeniería – Univ. De la Rep. Oriental del Uruguay. Uruguay. Disponible en: http://web.ctnc.es/noticias/pdf/DocumentosdeInteres/pulsos_conservacion.pdf.
- Wekhof, A. 2003. Ultra-fast Sterilisation by Disintegration of Micro-organisms with Intense Pulsed UV Light. Touch Briefings. 2003. Disponible en: http://www.touchbriefings.com/pdf/33/gs031_t_wektec.pdf