

**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS  
CAMPUS MONTECILLO**

**POSGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**FRUTICULTURA**

**EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS TÉRMICOS  
MODERADOS Y ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS  
SOBRE LA SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA Y  
CALIDAD DE PULPA DE GUANÁBANA (*Annona  
muricata* L.)**

**ALMADALIA VELASCO HERNÁNDEZ**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO. DE MÉXICO**

2020

La presente tesis titulada: **Evaluación de tratamientos térmicos moderados y altas presiones hidrostáticas sobre la seguridad microbiológica y calidad de pulpa de guanábana (*Annona muricata* L.)** realizada por la alumna: **Almadalia Velasco Hernández** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**FRUTICULTURA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO

  
DR. CRESCENCIANO SAUCEDO VELOZ

ASESOR

  
DRA. DANIELA SAUCEDO REYES

ASESOR

  
DRA. MARTHA ELVA RAMÍREZ GUZMÁN

ASESOR

  
DR. SALVADOR VALLE GUADARRAMA

ASESOR

  
DR. SERGIO HUMBERTO CHÁVEZ FRANCO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Junio de 2020

**EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS TÉRMICOS MODERADOS Y ALTAS  
PRESIONES HIDROSTÁTICAS SOBRE LA SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA Y  
CALIDAD DE PULPA DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.)**

Almadalia Velasco Hernández, D. en C.

Colegio de postgraduados, 2020

**RESUMEN**

En México, la guanábana es procesada y comercializada como pulpa pasteurizada o congelada, y se usa para la elaboración de jugos, helados, néctares, jarabes, mermeladas, paletas y postres. Diversos estudios muestran la asociación entre el procesamiento de pulpas de frutas y el desarrollo de microorganismos; sin embargo, pocos se han enfocado a la asociación entre *Listeria monocytogenes* y pulpas de frutas ácidas, por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de tratamientos térmicos moderados y altas presiones hidrostáticas sobre la inactivación de *L. monocytogenes* y las propiedades fisicoquímicas de pulpa de guanábana para determinar las mejores condiciones de procesamiento que permitan mantener la calidad y conseguir un nivel de inocuidad adecuado. Cinéticas de inactivación térmica de *L. monocytogenes* inoculada en pulpa de guanábana se obtuvieron a cinco niveles de temperatura (50, 52.5, 55, 57.5, y 60 °C) y diferentes tiempos de exposición (0–60 min). Las curvas de sobrevivencia no siguieron una relación log-lineal y, en consecuencia, se ajustaron a la ecuación modificada de Gompertz. Los resultados indicaron que la ecuación modificada de Gompertz proporcionó una bondad de ajuste aceptable. Reducciones 5- $\log_{10}$  de *L. monocytogenes* se lograron a 50°C/60 min, 52.5 °C/16 min, 55 °C/10 min, 57.5 °C/5 min, y 60°C/1.25 min. Estos tratamientos 5- $\log_{10}$  aplicados a la pulpa de guanábana indicaron que la pulpa presentó cambios en los parámetros de color y disminución en el contenido

de azúcares totales, azúcares reductores, ácido ascórbico, fenoles totales y pH. Por otra parte, muestras de pulpa de guanábana inoculada con *L. monocytogenes* se sometieron a altas presiones hidrostáticas (200–300 MPa) y diferentes tiempos de exposición (0–7 min). Reducciones cercanas a 5- $\log_{10}$  de *L. monocytogenes* se lograron a 250 MPa por 7 min y 300 MPa por 3.5 min. Las cinéticas de inactivación de *L. monocytogenes* se describieron mediante modelos modificados de Weibull, estos modelos proporcionaron una bondad de ajuste aceptable y sus parámetros dependieron de la presión aplicada. Bajo las condiciones de presión (200–300 MPa) y tiempo de exposición evaluados (0–7 min), la pulpa de guanábana no mostró cambios en el contenido de sólidos solubles totales, ácido ascórbico y capacidad antioxidante. Sin embargo, la pulpa mostró cambios en pH y en el contenido de fenoles totales. Los tratamientos con alta presión hidrostática evaluados preservaron el color de la pulpa de guanábana y únicamente la pulpa sometida a 200 MPa/5 min, 250 MPa/1.5 min y 300 MPa/2.5 min, mostraron cambios en los parámetros de color. Se concluyó que, una reducción 5- $\log_{10}$  de *L. monocytogenes* se logró a 50.0 °C/60 min y, sólo bajo esta condición de temperatura y tiempo de exposición, no se afectaron significativamente el contenido de ácido ascórbico y fenoles totales en la pulpa de guanábana. Por otra parte, con los tratamientos de alta presión hidrostática evaluados, reducciones cercanas a 5- $\log_{10}$  de *L. monocytogenes* se lograron a 300 MPa por 3.5 min, y con este tratamiento, la pulpa de guanábana no mostró cambios en color, pH, sólidos solubles totales, ácido ascórbico, fenoles totales y capacidad antioxidante.

**Palabras clave:** pulpa de guanábana, *Listeria monocytogenes*, tratamiento térmico, cinética de inactivación, alta presión hidrostática, propiedades fisicoquímicas.

**EVALUATION OF MODERATE THERMAL TREATMENTS AND HIGH  
HIDROSTATIC PRESSURE ON MICROBIOLOGICAL SAFETY AND PULP  
QUALITY OF SOURSOP (*Annona muricata* L.)**

Almadalia Velasco Hernández, D. en C.

Colegio de postgraduados, 2020

**ABSTRACT**

In México, soursop is processed and commercialized as a pasteurized or frozen pulp used to prepare juice, ice cream, nectar, zyrup, jelly, popsicles and desserts. Several studies show the association between pulp processing and the development of various microorganisms; however, few have focused on the association between *L. monocytogenes* and the pulp of sour fruits, therefore, the objective was to evaluate the effect of moderate thermal treatments and high hydrostatic pressure on the inactivation of *L. monocytogenes* and the physicochemical properties in soursop pulp in order to determine the best processing conditions that will allow to maintain quality as well as to achieve an adequate level of safety. Thermal inactivation kinetics were obtained for *L. monocytogenes* inoculated in soursop pulp at five levels of temperature (50, 52.5, 55, 57.5, and 60 °C) and different exposure times (0–60 min). The survival curves did not suggest a log-linear relationship, and were, consequently, fitted to the modified Gompertz equation. The results indicated that the modified Gompertz equation provided an acceptable goodness of fit. Five- $\log_{10}$  cycles reductions of *L. monocytogenes* were achieved at 50 °C/60 min, 52.5 °C/16 min, 55 °C/10 min, 57.5 °C/5 min, and 60 °C/1.25 min. These 5- $\log_{10}$  treatments applied to the soursop pulp indicated that the soursop pulp showed changes in the color parameters and a decrease in the content of total sugars, reducing sugars, ascorbic acid, total phenols, and pH. On the other hand,

samples of soursop pulp inoculated with *L. monocytogenes* were subjected to high hydrostatic pressure (200–300 MPa) and different exposure times (0–7 min). Reductions close to 5- $\log_{10}$  of *L. monocytogenes* were achieved at 250 MPa for 7 min y 300 MPa por 3.5 min. The inactivation kinetics of *L. monocytogenes* were described using modified models of Weibull, these models provided an acceptable goodness of fit and their parameters depended on the applied pressure. Under the conditions of pressure and exposure time evaluated, the soursop pulp showed no change in the content of total soluble solids, ascorbic acid and antioxidant capacity. However, the pulp showed changes in pH and total phenols. High hydrostatic pressure treatments evaluated preserved the color of the soursop pulp and only the pulp subjected to 200 MPa/5 min, 250 MPa/1.5 min y 300 MPa/2.5 min showed changes in the color parameters. It was concluded that 5- $\log_{10}$  reductions of *L. monocytogenes* was achieved at 50.0 °C/60 min and, only under this condition of temperature and time of exposure, the content of ascorbic acid and total phenols in soursop pulp were not significantly affected. On the other hand, with the high hydrostatic pressure treatments evaluated, reductions close to 5- $\log_{10}$  of *L. monocytogenes* were achieved at 300 MPa for 3.5 min, and with this treatment, the soursop pulp did not show changes in color, pH, total soluble solids, ascorbic acid, total phenols, and antioxidant capacity.

**Key words:** soursop pulp, *Listeria monocytogenes*, thermal treatment, inactivation kinetics, high hydrostatic pressure, physicochemical properties.

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría empezar por dar las gracias a todos los contribuyentes de México, quienes a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y el Colegio de Postgraduados, financiaron parte de mi formación profesional con una beca doctoral.

Mil gracias al Colegio de Postgraduados, por la formación científica. Este logro no es sólo para mí, es para seguir contribuyendo con México.

Gracias al Dr. Crescenciano Saucedo Veloz, por guiarme durante mi formación profesional y por compartir sus conocimientos.

A la Dra. Daniela Saucedo Reyes, por poner su valioso tiempo a mi disposición e invertirlo en esta investigación.

Mis más sinceros agradecimientos al Dr. Sergio Humberto Chávez por sus atinadas observaciones a este trabajo.

Este estudio tampoco habría sido posible sin la Dra. Martha Elva Ramírez Guzmán, por su valioso apoyo en la parte estadística.

Mi gratitud al Dr. Salvador Valle Guadarrama por sus consejos y su preocupación durante el desarrollo de esta investigación para culminar en tiempo y forma.

También, gracias a la Dra. Diana Guerra Ramírez, por facilitarme los materiales y equipo del laboratorio a su cargo.

Un agradecimiento especial a la Dra. M. Dolores Rodrigo Aliaga y al Dr. Antonio Martínez López, por permitirme realizar una estancia en las instalaciones del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Paterna, Valencia, España.

Por último, agradezco a los profesores, compañeros y amigos que me apoyaron y acompañaron durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

Expreso mi gratitud a Dios.

Te llevo en mi alma como mi guía espiritual.

Con amor, para mis padres Lucila y Héctor, quienes me inspiran a conseguir cualquier cosa que me proponga, son el mejor ejemplo de dedicación, compromiso y responsabilidad.

Para mi tía Lupita, por no dudar en apoyarme durante mi preparación profesional en el Colegio de Postgraduados.

Para mi hermana Olga,

para mi hermano Diego Adrián,

porque con su apoyo he logrado esta meta, los amo.

*“Hay que practicar el bien y trabajar para merecer la dicha, no se llega a ella a través de la especulación y la pereza. La pereza seduce, el trabajo satisface” (Ana Frank).*



## CONTENIDO

	Página
RESUMEN .....	iii
ABSTRACT.....	v
AGRADECIMIENTOS .....	vii
LISTA DE CUADROS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
DEFINICIÓN DE TÉRMINOS NO COMUNES.....	xv
ABREVIACIONES .....	xvi
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
Objetivos .....	2
Objetivo general .....	2
Objetivos particulares .....	3
Hipótesis.....	3
Revisión de literatura .....	4
La guanábana.....	4
Origen y distribución.....	4
Botánica, morfología y estructura .....	4
Crecimiento del fruto y maduración.....	4
Respiración y producción de etileno .....	6
Sólidos solubles y azúcares en frutos de guanábana .....	6
Acidez titulable, pH y firmeza.....	6
Producción de guanábana .....	7
Factores de manejo postcosecha que afectan la calidad de los frutos .....	8
Importancia de la pulpa de guanábana .....	9
Listeria monocytogenes.....	9
Taxonomía.....	10
Características de <i>L. monocytogenes</i> .....	10
Listeriosis.....	11
Prevención y control de la transmisión de <i>L. monocytogenes</i> .....	13
Tratamiento térmico .....	13

Métodos de procesamiento con calor .....	14
Resistencia de microorganismos al calor.....	16
Cinética de la sobrevivencia microbiana.....	18
Alta presión hidrostática.....	21
Descripción del proceso.....	22
Principios del proceso.....	23
Requisitos de empaque .....	23
Efectos de la alta presión sobre microorganismos.....	24
Factores que influyen en la sensibilidad microbiana a la alta presión.....	26
Efectos de la alta presión en la calidad de los alimentos.....	27
Microbiología predictiva.....	28
Modelación de las respuestas microbianas.....	30
Clasificación de los modelos microbiológicos predictivos .....	33
Modelación de la inactivación de microorganismos .....	35
Validación de modelos predictivos.....	37
Literatura citada.....	38
<b>CAPÍTULO I. EFECTO DE TRATAMIENTOS TÉRMICOS MODERADOS SOBRE LA INACTIVACIÓN DE UNA CEPA DE <i>Listeria monocytogenes</i> Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PULPA DE GUANÁBANA.....</b>	<b>51</b>
1.1 RESUMEN.....	52
1.2 ABSTRACT .....	53
1.3 INTRODUCCIÓN. ....	53
1.4 MATERIALES Y MÉTODOS. ....	55
1.4.1 Proceso para la pulpa.....	55
1.4.2 Cepa bacteriana y preparación del cultivo celular.....	56
1.4.3 Tratamientos térmicos. ....	56
1.4.4 Enumeración de <i>L. monocytogenes</i> . ....	57
1.4.5 Modelación matemática y validación del modelo predictivo.....	57
1.4.6 Análisis microbiológico y fisicoquímico.....	59
1.4.7 Análisis estadístico. ....	62
1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	63
1.5.1 Inactivación de <i>L. monocytogenes</i> .....	63
1.5.2 Ajuste del modelo matemático. ....	65

1.5.3 Validación del modelo.....	69
1.5.4 Calidad microbiológica y propiedades fisicoquímicas.....	70
1.6 CONCLUSIONES.....	73
1.7 AGRADECIMIENTOS.....	74
1.8 REFERENCIAS.....	74
<b>CAPÍTULO II. DISTRIBUCIÓN EMPÍRICA DE LA FRACCIÓN SOBREVIVIENTE DE <i>Listeria monocytogenes</i> EN PULPA DE GUANÁBANA SOMETIDA A TRATAMIENTOS TÉRMICOS MODERADOS.....</b>	
2.1 RESUMEN.....	91
2.2 ABSTRACT.....	92
2.3 INTRODUCCIÓN.....	92
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	94
2.4.1 Datos experimentales.....	94
2.4.2 Análisis estadístico.....	94
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	95
2.6 CONCLUSIÓN.....	97
<b>CAPÍTULO III. EFECTO DE ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA SOBRE LA INACTIVACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i> CECT 4032 Y CALIDAD ORGANOLÉPTICA DE PULPA DE GUANÁBANA.....</b>	
3.1 RESUMEN.....	101
3.2 ABSTRACT.....	102
3.3 INTRODUCCIÓN.....	102
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	105
3.4.1 Preparación de las muestras de pulpa de guanábana.....	105
3.4.2 Preparación del cultivo.....	105
3.4.3 Inoculación de la pulpa de guanábana.....	106
3.4.4 Tratamientos con alta presión hidrostática.....	106
3.4.5 Enumeración de <i>L. monocytogenes</i> .....	107
3.4.6 Modelación matemática.....	107
3.4.7 Determinación de la calidad organoléptica en la pulpa de guanábana.....	108
3.4.8 Análisis estadístico.....	112
3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	112
3.5.1 Inactivación de <i>L. monocytogenes</i> con alta presión hidrostática.....	112

3.5.2 Modelación de las curvas de sobrevivencia. ....	113
3.5.3 Efecto de la alta presión hidrostática en color de la pulpa. ....	116
3.5.4 pH, sólidos solubles totales y ácido ascórbico. ....	117
3.5.5 Contenido de fenoles totales. ....	118
3.5.6 Capacidad antioxidante total. ....	119
3.6 CONCLUSIONES .....	120
3.7 REFERENCIAS .....	121
CONCLUSIONES GENERALES .....	134
ANEXOS .....	135
ANEXO A.....	135
A1. Equipo de altas presiones hidrostáticas .....	135
A2. Curvas de calibración. ....	136
ANEXO B. Diagrama de color. ....	138
ANEXO C. Artículo científico aceptado para su publicación en la revista Food Science and Technology International. ....	139

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.1 Parámetros cinéticos primarios y bondad de ajuste determinados para curvas de inactivación de <i>L. monocytogenes</i> en pulpa de guanábana.....	87
Cuadro 1.2 Modelos secundarios y valores $z_T$ para <i>L. monocytogenes</i> en pulpa de guanábana...	88
Cuadro 1.3 Factor de ajuste ( $A_f$ ) y factor de exactitud ( $B_f$ ) de <i>L. monocytogenes</i> en pulpa de guanábana. ....	88
Cuadro 1.4 Parámetros de color en pulpa de guanábana. ....	89
Cuadro 1.5 Determinaciones fisicoquímicas en pulpa de guanábana. ....	90
Cuadro 3.1 Parámetros cinéticos primarios y bondad de ajuste determinados para curvas de inactivación de <i>L. monocytogenes</i> en pulpa de guanábana sometida a alta presión hidrostática.....	131
Cuadro 3.2 Cambios en los parámetros de color en pulpa de guanábana después de los tratamientos con alta presión hidrostática.....	132
Cuadro 3.3 pH, sólidos solubles totales (TSS), ácido ascórbico, contenido de fenoles totales (TPC) y capacidad antioxidante en pulpa de guanábana después de los tratamientos con alta presión hidrostática.....	133

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 Curvas de sobrevivencia ( $\circ$ ) de *L. monocytogenes* inoculada en pulpa de guanábana tratada térmicamente a) 50.0 °C, b) 52.5 °C, c) 55.0 °C. d) 57.5 °C, e) 60.0 °C. Curvas ajustadas (–) usando la ecuación modificada de Gompertz (ecuación (1.1)). . 85
- Figura 1.2 Relación entre la temperatura y los parámetros estimados de la ecuación modificada de Gompertz: a) parámetro *C*, b) parámetro *B*, c) parámetro *M*, d)  $\mu_{\max}$ . . . . . 86
- Figura 2.1 Funciones de densidad de probabilidad empírica de la fracción sobreviviente [ $\text{Log}_{10} (N/N_0)$ ] de las células de *L. monocytogenes* en pulpa de guanábana tratada térmicamente, a) 50 °C/0–60 min, b) 52.5 °C/0–16 min, c) 60 °C/0–1.25 min. . . . . 100
- Figura 3.1 Curvas de sobrevivencia ( $\diamond$ ) de *L. monocytogenes* inoculada en pulpa de guanábana después del tratamiento con alta presión hidrostática a) 200 MPa, b) 250 MPa, c) 300 MPa. Curvas ajustadas (–) usando a) el modelo propuesto por Mafart et al. [ecuación (3.1)]; b) y c) el modelo modificado de Weibull propuesto por Albert y Mafart [ecuación (3.2)]. . . . . 130
- Figura 3.2 Equipo de altas presiones hidrostáticas. . . . . 135
- Figura 3.3 Curva de calibración generada con ácido ascórbico para el cálculo del contenido de ácido ascórbico en pulpa de guanábana. . . . . 136
- Figura 3.4 Curva de calibración preparada con ácido gálico para el cálculo del contenido de fenoles totales en pulpa de guanábana. . . . . 136
- Figura 3.5 Curva de calibración obtenida a partir de disolución de Trolox, rango de concentración de 0 – 250  $\mu\text{M}$ , para el cálculo de capacidad antioxidante total en pulpa de guanábana. . . . . 137
- Figura 3.6 Diagrama de color CIELab. . . . . 138

## DEFINICIÓN DE TÉRMINOS NO COMUNES

Anisotrópico. Propiedad de la materia según la cual, cualidades como la elasticidad, temperatura, conductividad, etc., varían según la dirección en que son examinadas.

Bacilo. Cualquier bacteria con forma de barra o vara.

Barosensibilidad. Sensibilidad de un organismo a los tratamientos por presión.

Biofilm. Ecosistema microbiano organizado, conformado por una o varias especies de microorganismos asociados a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas. Este tipo de conformación microbiana se caracteriza por la excreción de una matriz extracelular adhesiva protectora.

Epizootico. Enfermedad contagiosa que ataca a un número elevado e inusual de animales al mismo tiempo y se propaga con rapidez.

Irradiación. Proceso que consiste en exponer un alimento a una energía ionizante para inactivar microorganismos perjudiciales y extender su vida de anaquel. La energía ionizante puede consistir en rayos gamma, en rayos X o haz de electrones.

Motilidad de volteo. Movilidad flagelar impulsada en forma de volteo.

Perturbación. Alteración que se produce en las características que conforman el desarrollo normal de un proceso.

Psicotrófico. Organismo que puede crecer y reproducirse a bajas temperaturas.

Serotipo. Variedad de un microorganismo identificada mediante un análisis serológico.

Sincarpo. Fruto carnosos múltiple.

## ABREVIACIONES

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
$a_w$	Actividad del agua
BHI	Infusión cerebro-corazón
CTA	Agar cistina tripticasa
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
GAE	Equivalente de ácido gálico
NA	Agar nutriente
NACMCF	Comité Consultivo Nacional sobre Criterios Microbiológicos para Alimentos
NaOH	Hidróxido de sodio
PDA	Agar papa dextrosa
TPC	Contenido de fenoles totales
PW	Agua de peptona
TSB	Caldo de triptona y soya
TSS	Sólidos solubles totales
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente de Trolox
TE	Equivalente de Trolox
UFC	Unidades formadoras de colonias
VRBD	Agar bilis rojo violeta
$\mu_{max}$	Velocidad máxima de muerte exponencial
5-Log <sub>10</sub>	Cinco ciclos logarítmicos
$\Delta E$	Diferencia de color

### Unidades

°Bx	Grados brix
h	Hora
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimol
MPa	Megapascal
nm	Nanómetros
s	Segundo
$\mu$ M	Micromol



## INTRODUCCIÓN GENERAL

Existe evidencia de una correlación entre el consumo de frutas y sus productos en la prevención de diversas enfermedades (Loizzo et al., 2012; Hansen et al., 2003; Rawson et al. 2011). En particular, los frutos de *A. muricata* proporcionan nutrientes, fitoquímicos y propiedades biológicas que son vitales para mantener la salud humana (Almeida et al., 2011; Dembitsky et al., 2011). Sin embargo, la pulpa de guanábana (*Annona muricata* L.) es susceptible al deterioro y al oscurecimiento enzimático, lo que afecta sus cualidades nutricionales y sensoriales (Dias et al., 2015). Diferentes productos preparados con fruta de guanábana como jugos pasteurizados (Abbo et al., 2006; Nwachukwu y Ezeigdo, 2013) y néctares pasteurizados (Peters et al., 2000) han sido evaluados y, según estos reportes, la pasteurización es efectiva en la inactivación enzimática de productos hechos con guanábana, sin embargo, la pasteurización térmica provoca alteraciones indeseables que reducen la calidad de los productos (Anaya-Esparza et al., 2017)

Además de preservar la calidad organoléptica y nutricional, otra preocupación en el procesamiento de pulpas está relacionada con la seguridad del producto. Hay reportes (Tribst et al., 2009; De Oliveira et al., 2018) de brotes involucrando patógenos transmitidos por alimentos, asociados con pulpas y jugos de frutas, aunque en la literatura, *L. monocytogenes* no está bien establecido como un patógeno relevante transmitido por el consumo de estos productos, en comparación con *Salmonella* y *E. coli* 0157: H7. Sin embargo, este patógeno puede considerarse preocupante en frutas frescas, jugos y pulpas de frutas procesadas, ya que tiene una capacidad notable de sobrevivir bajo una variedad de condiciones adversas (Tribst et al., 2009). Además, *L. monocytogenes* es capaz de sobrevivir y crecer en las superficies de los equipos de procesamiento y presenta un comportamiento notablemente psicotrófico (Caggia et al., 2009).

La aplicación de calor es el método más común para inactivar microorganismos durante el proceso de alimentos. Sin embargo, el procesamiento con calor, particularmente en condiciones severas, puede inducir varios cambios químicos y físicos que deterioran las propiedades organolépticas y pueden reducir el contenido o la biodisponibilidad de algunos compuestos bioactivos (Patras et al., 2009; Patras et al., 2010; Rawson et al., 2011), situación que ha planteado la necesidad de estudiar la aplicación de tecnologías no térmicas o no convencionales como lo son las altas presiones hidrostáticas (Rawson, 2011).

El procesamiento de alimentos con alta presión hidrostática ha mostrado gran potencial para inactivar microorganismos patógenos y de descomposición (Frustoli et al., 2003) produciendo productos microbiológicamente seguros y un impacto no severo en las características organolépticas y nutricionales de los alimentos (Syed et al., 2016). En particular, tiene un efecto mínimo sobre el contenido bioactivo de varias frutas y hortalizas (Oey et al., 2008). Así, los productos a base de frutas y hortalizas tratadas por esta tecnología constituyen una ventaja competitiva frente a los productos pasteurizados por calor (Deliza et al., 2005; Bayindirli et al., 2006; Hsu, 2008; Hsu et al., 2008). Por consiguiente, la tecnología de alta presión hidrostática resulta en un método de conservación viable para frutos como la guanábana, principalmente en forma de pulpa, la cual, se utiliza como materia prima para otros subproductos.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar los efectos de tratamientos térmicos moderados y altas presiones hidrostáticas sobre la inactivación de una cepa de *L. monocytogenes* inoculada en pulpa de guanábana para determinar las mejores condiciones de procesamiento que permitan mantener la calidad y lograr un nivel de seguridad adecuado.

### **Objetivos particulares**

Evaluar el efecto de tratamientos térmicos moderados sobre la inactivación de *L. monocytogenes* inoculada en la pulpa de guanábana y comportamiento de la calidad fisicoquímica de la pulpa.

Estudiar los efectos de altas presiones hidrostáticas en la cinética de inactivación de *L. monocytogenes* y en las características fisicoquímicas de la pulpa de guanábana.

Generar los modelos matemáticos que permitan conocer el comportamiento de *L. monocytogenes* bajo un tratamiento térmico y de altas presiones hidrostáticas.

Determinar las mejores condiciones de los tratamientos térmicos y de altas presiones hidrostáticas que permitan el control de *L. monocytogenes* en pulpa de guanábana.

### **Hipótesis**

La pérdida de viabilidad de *L. monocytogenes*, aumenta conforme se incrementa la temperatura del tratamiento térmico en la pulpa de guanábana, sin cambios en las propiedades fisicoquímicas de la pulpa.

La inactivación de *L. monocytogenes*, aumenta al incrementar la intensidad de presión, y se mantienen las propiedades fisicoquímicas de la pulpa.

Mediante modelos matemáticos es factible conocer la dinámica de inactivación de *L. monocytogenes* bajo condiciones de un tratamiento térmico o de altas presiones hidrostáticas.

## **Revisión de literatura**

### **La guanábana**

#### **Origen y distribución**

La guanábana (*Annona muricata* L.) es un árbol frutal nativo de América tropical (Paull, 1998). Paull y Duarte (2011) reportan que se originó en el Caribe y la región norte de América del Sur. La guanábana se adapta a los climas tropicales, por lo que se distribuye por los trópicos del mundo. Actualmente se cultiva en las zonas del Caribe, América, África y el sudeste asiático, como Malasia, Indonesia y Filipinas (Gajalakshmi et al., 2012).

#### **Botánica, morfología y estructura**

La guanábana pertenece a la familia Annonaceae y, al igual que otros frutos del género *Annona*, es un sincarpo formado por la fusión de pistilos y receptáculos en una gran estructura pulposa. Es, por lo tanto, un fruto compuesto formado por un grupo de bayas, cuyos componentes individuales del carpelo permanecen en la cáscara durante todo el desarrollo en forma de espuelas o espinas pulposas, que son curvas y cortas (Bueso, 1980; Worrell et al., 1994).

En plantaciones comerciales donde la polinización manual es un procedimiento regular, los frutos son ovoides, miden 15 – 30 cm de largo y 10 – 20 cm de ancho, con un peso promedio de 4.5 kg. La cáscara es delgada y de color verde oscuro. El mesocarpio contiene semillas de color marrón oscuro brillante, que miden aproximadamente 2 cm de largo y 1 cm de ancho. La pulpa, que consiste en segmentos fibrosos y jugosos alrededor de un receptáculo oblongo, es blanca y tiene un sabor ácido (Zayas, 1966; Bueso, 1980).

#### **Crecimiento del fruto y maduración**

De acuerdo con Worrell et al. (1994) el patrón de crecimiento del fruto de guanábana es de tipo doble sigmoide, presentando tres etapas características. La etapa inicial de crecimiento rápido,

comienza inmediatamente después del final de la quiescencia (el período de descanso después de la fertilización de la flor, que se caracteriza por el oscurecimiento de la parte superior del carpelo). Al final de esta etapa, el fruto de guanábana ya ha alcanzado la mitad de su tamaño final y los hombros han comenzado a desarrollarse alrededor del punto de fijación del pedicelo. La siguiente etapa, se caracteriza por un crecimiento relativamente lento y precede a la etapa final de crecimiento rápido. Durante este último, el fruto alcanza la madurez fisiológica y su tamaño máximo.

La madurez fisiológica (maturity) es definida como el estado del desarrollo en la cual los frutos alcanzan los requisitos necesarios para continuar con el proceso de maduración en o fuera de la planta; implica un punto medible en el desarrollo del producto y también implica la necesidad de contar con métodos para medir este estado de madurez (Reid, 2002). Para el fruto de guanábana, los principales cambios asociados con la maduración son: mayor separación y pérdida de firmeza de las espinas, pérdida de firmeza de la superficie del fruto y cambios en el color del epicarpio. En la mayoría de los fenotipos, el brillo de la cáscara también aumenta y su color cambia de verde oscuro a una tonalidad verde amarillento (Zayas, 1966; Worrell et al., 1994). Los cambios en el color de la cáscara del fruto de guanábana, se deben a la degradación de la clorofila (Lima y Alves, 2011).

En la guanábana, los cambios relacionados con la maduración ocurren en un período muy corto, lo que refleja una actividad metabólica elevada (Lima y Alves, 2011). Estudios realizados por Lima et al. (2003a) mostraron que las frutas de guanábana que se cosecharon en madurez fisiológica y se mantuvieron a temperatura ambiente ( $26.3 \pm 0.6$  °C y  $87.6 \pm 12.2$  % HR) maduraron en cinco días.

### **Respiración y producción de etileno**

Mediante la medición de la velocidad de respiración, la guanábana se ha clasificado como un fruto climatérico múltiple, debido a que las bayas que forman el fruto maduran en diferentes momentos (Biale y Barcus, 1970). Worrell et al. (1994), determinaron que los frutos maduros de guanábana produjeron un climaterio respiratorio bifásico, con una producción de CO<sub>2</sub> que alcanzó los 100 ml kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, y luego 350 ml kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, a 25–30 °C. La producción máxima de etileno (250-350 ml kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) ocurrió entre los dos máximos respiratorios.

### **Sólidos solubles y azúcares en frutos de guanábana**

Durante la maduración de frutos hay un aumento en los sólidos solubles y contenido de azúcares. Este aumento se atribuye principalmente a la hidrólisis de los carbohidratos de reserva que se acumularon durante el crecimiento del fruto en el árbol, lo que resulta en la producción de azúcares solubles (Wills et al., 2007). Entre los azúcares que están presentes en la pulpa, los más importantes son glucosa, fructosa y sacarosa. El disacárido sacarosa es el principal azúcar no reductor, mientras que la glucosa y la fructosa constituyen los principales azúcares reductores. En el fruto de guanábana, ocurre un aumento en el contenido de azúcares reductores durante la maduración (Lima et al., 2003a).

### **Acidez titulable, pH y firmeza**

Los cambios en la acidez también son importantes en el desarrollo del sabor característico de los frutos. Generalmente, uno o dos ácidos orgánicos se acumulan en mayor proporción (Kays, 1991). Para la mayoría de los frutos, el contenido de ácidos orgánicos disminuye con la maduración debido al uso como sustrato en el proceso respiratorio y en la reacción de síntesis de nuevos compuestos (Kays, 1991). No obstante, en el fruto de guanábana y en otras anonáceas, un aumento en el contenido de ácidos orgánicos se ha observado durante la maduración, comportamiento

relacionado con el metabolismo de aromas (Bruinsma y Paull, 1984; Lima et al., 2003a, 2003b; Medeiro et al., 2009).

Lima y Alves (2011) mencionaron que el aumento de los ácidos orgánicos en la fruta de guanábana puede estar asociado con tres causas posibles: el catabolismo del almidón y los carbohidratos de la pared celular, que también suministran sustratos para la síntesis de azúcares y compuestos volátiles; la transformación de sales ácidas en formas libres; y la baja utilización de ácidos orgánicos en la respiración. El contenido de ácido málico comienza a aumentar dentro de los 2 días de la cosecha y hay un incremento de 3 veces durante la maduración (Paull, 1998). Este aumento en el ácido málico contribuye al sabor ácido de la fruta y a la disminución del pH de la pulpa (Paull, 1982).

La firmeza de la fruta de guanábana se reduce abruptamente en unos días después de la cosecha. La pérdida de firmeza es similar a otras frutas, y es acompañada por la disminución del contenido de almidón, un aumento en la solubilidad de pectinas y una pérdida de galactosa de la pared celular (Lima et al., 2003b).

### **Producción de guanábana**

En América, México es el principal productor de guanábana, seguido de Venezuela y Brasil (Sanusi y Bakar, 2018).

En México, en 2018 se cultivaron 3 693 ha de guanábana, con un rendimiento promedio de 9.8 t ha<sup>-1</sup> y un valor de la producción cercano a 300 millones de pesos. Nayarit fue el principal estado productor con 21 860 t, en 2 532 ha cultivadas (SIAP, 2019).

## **Factores de manejo postcosecha que afectan la calidad de los frutos**

Los frutos de guanábana, cuando se cosechan y maduran a temperatura ambiente, pueden alcanzar la madurez de consumo en 2, 3 o hasta 7 días, dependiendo de la etapa de madurez con la que se cosecharon (Paull, 1998; Lima et al., 2003b). Se ha reportado una vida útil de entre 4 y 8 días para la fruta de guanábana madurada a 25 °C en Nayarit (Espinosa et al., 2013; González et al., 2014) lo que manifiesta un producto altamente perecedero. Tovar-Gómez et al (2011), describen una pérdida de 60% posterior a la cosecha debido a la naturaleza perecedera y la fragilidad física de esta fruta, lo que hace que la exportación de la guanábana se realice el mismo día de la cosecha por vía aérea a una temperatura de 13 °C, lo que resulta muy costoso. La refrigeración es la tecnología postcosecha más importante para mantener la calidad y reducir la velocidad del deterioro de los productos hortícolas cosechados, ya que es ampliamente aceptado que la velocidad del deterioro postcosecha está estrechamente relacionada con la velocidad con la que respira el producto, comportamiento que depende en sí mismo de la temperatura (Valero y Serrano, 2010). Hay poca información disponible sobre las temperaturas de refrigeración requeridas para aumentar la vida útil de la guanábana. Castillo-Ánimas et al (2005), trabajaron con frutos de guanábana de La Peñita de Jaltemba, Nayarit, México, y reportaron que guanábanas cosechadas con tonalidad verde-oscuro se deben almacenar a 20–26 °C y los frutos verdes-claro a 16–18 °C, o bien, a 12–14 °C cuando adquirieron una textura firme, para evitar daños por frío. Lima y Alves (2011), indicaron que, en Brasil, las frutas almacenadas a 15 °C maduraron en 9 días. Los frutos de guanábana cosechados en El Tonino, Nayarit, y almacenados a 16 °C con la aplicación de 1-metilciclopropeno (1-MCP) maduraron en 8 y 9 días (Espinosa et al., 2013).

Los frutos de guanábana son muy susceptibles a las bajas temperaturas por la inducción de daños por frío, los cuales se manifiestan por oscurecimiento de la piel, falta de maduración,



decoloración de la pulpa, mal sabor y aroma, y aumento de la podredumbre (Paull, 1998). El almacenamiento de frutos de guanábana a 10 °C durante 1 día conduce a una pérdida notable de sabor y aroma (Paull, 1990).

### **Importancia de la pulpa de guanábana**

La pulpa de guanábana se comercializa como pulpa natural, pasteurizada o congelada, y se usa para la elaboración de jugos, helados, néctares, jarabes, batidos, mermeladas, jaleas, conservas y yogures (Awan et al., 1980; Bueso, 1980; Gratão et al., 2007; Koesriharti, 1991; Lutchmedial et al., 2004; Umme et al., 1999). También es una materia prima para polvos, barras con frutas y hojuelas (Umme et al., 2001).

La pulpa de guanábana es una fuente importante de ácido ascórbico (Umme et al., 1997), pero éste se degrada durante la pasteurización y el almacenamiento prolongado (Saguy et al., 1978); hay evidencia de los efectos de la pasteurización en la pulpa de guanábana y en diferentes productos preparados con la pulpa de esta fruta (Nwachukwu y Ezeigdo, 2013; Peters et al., 2001; Umme et al., 1997).

### **Listeria monocytogenes**

Los primeros reportes sugieren que *L. monocytogenes* pudo haberse aislado de secciones de tejido de pacientes en Alemania en 1891 y del fluido medular de pacientes con meningitis en 1917 y nuevamente en 1920 (Reed, 1958;) Sin embargo, no fue hasta 1926 que el microorganismo se describió por completo, cuando Murray et al. (1926), aislaron una pequeña bacteria Gram-positiva en forma de bacilo, que causó un brote epizoótico en 1924 entre conejos y cobayas, y llamaron al organismo *Bacterium monocytogenes*. Aproximadamente al mismo tiempo, Pirie (1927) aisló y describió el mismo organismo en los jerbos en Sudáfrica, a la que llamó *Listerella hepatolytica*, y posteriormente en 1940 recomendó que el nombre se cambiara a *L. monocytogenes* (Reed, 1958).

## **Taxonomía**

En la séptima edición del Manual de Bergey de Bacteriología Determinativa (1957), *L. monocytogenes* se incluyó en el amplio grupo de la familia Corynebacteriaceae, principalmente debido a las similitudes en la morfología. El uso de la secuenciación parcial de ARN ribosómico 16S mostró que *L. monocytogenes* pertenecía a la rama secundaria *Clostridium* junto con *Brochothrix*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* (Ludwig et al., 1984). Estos hallazgos se tuvieron en cuenta en el Manual de bacteriología sistemática de Bergey publicado en 1986 (Seeliger and Jones, 1986), donde el género *Listeria* se colocó en una sección llamada “bacilos Gram-positivos regulares, no esporulados”.

La evidencia obtenida de la secuenciación de flagellina, listeriolisina y genes de proteínas de asociación invasiva han proporcionado evidencia de que *L. monocytogenes* existe en al menos tres líneas evolutivas, con un alto grado de conservación dentro de esas líneas (Rasmussen et al., 1995). Sin embargo, la mayoría de los aislados pertenecen solo a dos de los tipos de secuencia para los que existe una correlación con los antígenos flagelares. En la mayoría de los estudios, la división I contiene los serotipos 1/2a, 1/2c, 3a y 3c, mientras que la división II incluye los serotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d y 4e. (Farber and Peterkin, 2000)

### **Características de *L. monocytogenes***

*L. monocytogenes* es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa, no formadora de esporas, que expresa una motilidad de volteo típica a 20-25 °C, pero no a 35 °C. El organismo es psicrotrófico y crece en un rango de temperatura de 0° a 45 °C, con un óptimo de alrededor de 37 °C. *L. monocytogenes* puede crecer a niveles de pH entre 4.4 y 9.4, y en actividades de agua  $\geq 0.92$  con cloruro de sodio (NaCl) como soluto (Miller, 1992).

*L. monocytogenes* es considerada como una preocupación importante de seguridad en la industria alimentaria debido a su habilidad para crecer sobre un amplio rango de temperatura en ambientes ácidos, así como en la ausencia o a bajos niveles de O<sub>2</sub>, y sobrevivir en diferentes tipos de alimentos (Das et al., 2016).

Aunque con frecuencia *L. monocytogenes* está presente en alimentos crudos de origen vegetal y animal, también está presente en los alimentos cocinados debido a la contaminación posterior al procesamiento si los alimentos cocinados se manipulan después de la cocción. *L. monocytogenes* ha sido frecuentemente aislada de los entornos de procesamiento de alimentos, particularmente aquellos que son fríos y húmedos. *L. monocytogenes* se ha aislado en alimentos como leche líquida cruda y pasteurizada, quesos (particularmente variedades de maduración suave), helados, vegetales crudos, carne cruda fermentada y salchichas cocidas, aves crudas y cocidas, carnes crudas y ahumadas, y mariscos crudos (Buchanan et al., 1989; Farber and Peterkin, 1991; FDA, 2017; Ryser and Marth, 1991). Incluso cuando *L. monocytogenes* está inicialmente presente en un nivel bajo en un alimento contaminado, su capacidad de crecer durante el almacenamiento refrigerado significa que es probable que sus niveles aumenten durante el almacenamiento de aquellos alimentos que pueden apoyar el crecimiento del microorganismo (Pinner et al., 1992).

### **Listeriosis**

A partir de 1980, se han reportado importantes brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, relacionados con *L. monocytogenes* en Europa y Estados Unidos. Lo anterior ha promovido la realización de estudios epidemiológicos para determinar la prevalencia del patógeno y su forma de transmisión. El estudio de estos brotes ha revelado que las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos y pacientes presentan la misma identidad (Cratwrighth et al., 2013).

La listeriosis humana es una enfermedad con tasa de mortalidad alta (20 a 30%), que incluye padecimientos severos como la meningitis, septicemias y abortos; afecta principalmente a personas inmunocomprometidas e inmunodeficientes, así como a embarazadas, ancianos y niños (Zunabovic et al., 2011). *L. monocytogenes* causa listeriosis invasiva al penetrar el revestimiento del tracto gastrointestinal y establecer infecciones en sitios normalmente estériles dentro del cuerpo. Una vez que *L. monocytogenes* penetra en el tejido intestinal, es absorbida por las células del sistema inmune, los fagocitos. Sin embargo, dentro del fagocito es capaz de escapar del fagosoma y crecer posteriormente. Los fagocitos parecen ser el medio por el cual la bacteria puede ser transportada a varias partes del cuerpo (Shelef, 1989; Farber y Peterkin, 1991). La probabilidad de que *L. monocytogenes* invada el tejido intestinal depende de varios factores, incluido el número de organismos consumidos, la susceptibilidad del huésped y la virulencia del aislado específico (Gellin y Broome, 1989). La dosis infectiva se estima entre  $10^4$ – $10^6$  UFCg<sup>-1</sup> de alimento ingerido, pero puede ser menor (0.3 UFC g<sup>-1</sup>) en personas susceptibles (Jacquet et al., 1995). Los períodos de incubación pueden ser largos, típicamente 2–3 semanas y hasta tres meses (Gellin y Broome, 1989).

Debido a la severidad de los cuadros clínicos que produce y a su elevada tasa de mortalidad, la listeriosis se considera una enfermedad de alto impacto. En 2009 se reportaron 1 558 casos de listeriosis en 27 países de Europa. El índice de mortalidad general fue de 20%, aunque en ancianos la tasa se elevó a 67% (EFSA, 2011). En 2010, en Estados Unidos, se reportaron 1662 casos de listeriosis con 1520 hospitalizaciones y 266 muertes, lo que representó la tercera causa de muerte por enfermedades transmitidas por alimentos (Cratwrigh et al., 2013). En México no existen datos exactos sobre la incidencia de la listeriosis. Al respecto, se han reportado algunos casos. Entre los pacientes afectados fueron neonatos, niños inmunocomprometidos y adultos con cirrosis hepática

y enfermedad del tejido conectivo (Espinoza-Gómez et al., 2006; Castrejón-Alba et al., 1997; Bonfil et al., 1997; Kraus et al., 1994).

### **Prevención y control de la transmisión de *L. monocytogenes***

El Reglamento de la Comisión Europea No. 2073/2005 requiere que los operadores de alimentos demuestren que los alimentos listos para el consumo que apoyan el crecimiento de *L. monocytogenes* no excedan el límite de 100 UFC g<sup>-1</sup> durante su vida útil (Comisión Europea, 2005). De acuerdo con las directrices del Codex Alimentarius, la cantidad del patógeno debe limitarse a 100 UFC g<sup>-1</sup> al final de la vida útil cuando las condiciones de almacenamiento no permiten su crecimiento (Luber, 2011). De lo contrario, debe garantizarse la ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g de producto (Luber, 2011).

En México, las normas oficiales NOM-091-SSA1-1994 y NOM-121-SSA1-1994 establecen cero tolerancias en quesos y leche pasteurizada, respectivamente, mientras que en otros alimentos no se aplica ninguna política. Aunque la NOM-143-SSA1-1995 contempla los procedimientos microbiológicos para la detección de *L. monocytogenes* en los alimentos, no se han implementado, por parte del gobierno ni de la industria alimentaria, leyes o programas que regulen la inocuidad de los alimentos en relación con *L. monocytogenes*.

### **Tratamiento térmico**

El tratamiento térmico, además de ser el método más utilizado en la actualidad para la conservación de los alimentos, es una de las principales técnicas utilizadas en la industria alimentaria para garantizar la destrucción de los patógenos, reducir los riesgos microbianos a niveles seguros, y proporcionar seguridad alimentaria (Doyle et al., 2001; Van Zuijlen et al., 2010; Garre et al., 2017). El tratamiento térmico también puede ser importante para inactivar enzimas, para evitar el oscurecimiento de la pulpa por polifenol oxidasa y minimizar los cambios de sabor

resultantes de la lipasa y la actividad proteolítica. El proceso de calentar un alimento también induce cambios físicos y reacciones químicas, como la gelatinización de almidón, la desnaturalización de proteínas o el obscurecimiento, que a su vez afectan las características sensoriales, como el color, el sabor y la textura, de manera ventajosa o adversa, y además los tratamientos térmicos pueden cambiar el valor nutricional de los alimentos. Los procesos térmicos varían considerablemente en su intensidad, desde procesos leves como la pasteurización hasta procesos más severos como la esterilización en contenedores (Lewis, 2006).

Aproximadamente en 1810, Appert demostró que calentar los alimentos en recipientes herméticamente cerrados podría hacerlos estables durante largos períodos a temperatura ambiente. Más de un siglo después Bigelow et al. (1920), realizaron la primera evaluación matemática de la esterilización por calor aplicada a los alimentos enlatados, y Ball (1923) se basó en esto para derivar “métodos de cálculo para determinar el tiempo necesario para procesar alimentos enlatados”. Desde entonces se han propuesto muchos enfoques nuevos (Tucker, 1991).

El objetivo del procesamiento térmico para la esterilización comercial es reducir la probabilidad de sobrevivencia y/o crecimiento de microorganismos en un alimento, en particular a un nivel aceptablemente bajo. La razón de lo que es un nivel aceptablemente bajo se ha desarrollado durante muchos años y se ha centrado en consideraciones de seguridad, siguiendo los estudios originales de Esty y Meyer (1922) sobre la cinética de inactivación térmica de esporas de cepas proteolíticas de *Clostridium botulinum*.

### **Métodos de procesamiento con calor**

Los principales tipos de tratamiento térmico son la pasteurización y la esterilización. En los Estados Unidos, el NACMCF (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods) definió la pasteurización como “cualquier proceso, tratamiento o combinación de los

mismos que se aplique a los alimentos para reducir los microorganismos más resistentes de importancia para la salud pública a un nivel que no es probable que presente un riesgo para la salud pública en condiciones normales de distribución y almacenamiento” (NACMCF, 2006). La pasteurización térmica de los jugos de frutas, por ejemplo, incluye tratamientos térmicos entre 60 °C y 100 °C para destruir los microorganismos o enzimas objetivo (Ramesh, 2007). Se puede considerar una reducción 5 log para todos los procesos que tienen como objetivo reducir el recuento microbiano. El proceso debe considerar el “patógeno pertinente”, determinado de acuerdo con el tipo de jugo. *Salmonella* spp. se considera un buen objetivo para el jugo de naranja, *E. coli* y *Cryptosporidium* se consideran buenos objetivos para el jugo de manzana, y *L. monocytogenes* se considera un buen objetivo para varios jugos que nunca han estado involucrados en brotes (Tribst et al., 2009). Aunque la pasteurización con calor de purés y jugos es llevada a cabo para destruir microorganismos e inactivar la enzima pectin metilesterasa (PME); similar a otras prácticas térmicas esto puede también ocasionar cambios en el contenido bioactivo de los productos alimenticios. En el caso de frutas, la pasteurización conduce a una reducción en los niveles de compuestos bioactivos posiblemente debido a la severidad de estos procesos térmicos (Elez-Martinez et al, 2006).

La esterilización de los alimentos mediante la aplicación de calor puede realizarse en contenedores sellados o mediante técnicas de flujo continuo. Tradicionalmente es un proceso en contenedor, aunque ha habido muchos desarrollos en la tecnología de contenedores desde que el proceso se comercializó por primera vez a principios del siglo XIX. Cualquiera que sea el proceso, las principales preocupaciones son la seguridad y la calidad de los alimentos. La temperatura de 121.1 °C (250 °F) se toma como temperatura de referencia para los procesos de esterilización. Esto se usa junto con el valor  $z$  para *C. botulinum*, que se toma como 10 °C, para construir Cuadros de

letalidad estándar. Como las letalidades son aditivas, es posible sumar las letalidades para un proceso y determinar el efecto letal integrado total, que se conoce como el valor  $F_0$  que se expresa en minutos a una temperatura de referencia de 121.1 °C, utilizando las Cuadros de letalidad estándar derivadas para un valor  $z$  de 10 °C (Lewis, 2006).

### **Resistencia de microorganismos al calor**

Los primeros estudios sobre la resistencia al calor de las esporas bacterianas se realizaron para desarrollar procesos para la producción de alimentos enlatados. Se usó el concepto del punto de muerte térmica y Bigelow y Esty (1920) lo definieron como “el tiempo a diferentes temperaturas necesarias para destruir completamente una concentración definida de esporas en un medio de concentración conocida de iones hidrógeno”.

Con base en un estudio de 109 cepas de *C. botulinum*, Esty y Meyer (1922) concluyeron que para las esporas de este organismo que mostraban la máxima resistencia al calor, eran necesarios tratamientos térmicos para esterilizar suspensiones que contenían miles de millones de esporas en solución buffer fosfato a pH 7 de la siguiente manera: 4 minutos a 120 °C; 10 minutos a 115 °C; 33 minutos a 110 °C, 100 minutos a 105 °C; y 330 minutos a 100 °C. También mostraron que, 1) a 100 °C el logaritmo de la cantidad de esporas viables disminuyó en más de 10 ciclos logarítmicos de manera aproximadamente lineal con el tiempo de calentamiento, 2) que la germinación de esporas calentadas podría ocurrir después de demoras muy largas, y 3) que, en los jugos de algunos alimentos enlatados; la resistencia al calor de las esporas era mayor que en la solución buffer de fosfato de referencia.

Se han llevado a cabo varios experimentos para determinar la resistencia al calor de las esporas de *C. botulinum* y *C. sporogenes* en soluciones buffer de fosfato y en los alimentos. Se introdujeron los conceptos de valor  $F$  y valor  $z$ , donde  $F$  es el número de minutos necesarios para destruir el



organismo en un medio específico, a una temperatura específica, y  $z$  es la pendiente de la curva de tiempo de muerte térmica, definido como el cambio de temperatura que resulta en un cambio de diez veces en el tiempo de reducción decimal (Townsend et al., 1938). Los datos de Esty y Meyer (1922) para *C. botulinum* fueron recalculados incorporando correcciones para las etapas lag de calentamiento y enfriamiento. El valor  $F$  resultante para *C. botulinum* en alimentos enlatados con bajo contenido de ácido es 2.45 min a 250 °F (121.1 °C) con un valor  $z$  de 17.6 °F (9.8 °C). Esto se reconoce en la industria de enlatados como el proceso mínimo práctico de *C. botulinum* (Townsend et al., 1938). Los aspectos de seguridad de la aplicación de calor para la esterilización de productos alimenticios todavía se basan en estos primeros estudios (Pflug y Gould, 2000).

El modelo de muerte logarítmica como una función de un proceso térmico ( $U$ ), es  $U = D (\log N_0 - \log N_U)$ .  $U$  es el tiempo de calentamiento a una temperatura especificada,  $D$  es el tiempo para una reducción del 90% en el número de organismos sobrevivientes,  $N_0$  es la carga microbiana inicial y  $N_U$  el nivel de sobrevivientes del punto final; en los procesos de control microbiano es un valor de probabilidad como 1 en 1 000 o 1 en  $10^6$  o  $10^9$ . El valor  $n$  se usa para indicar la reducción del ciclo logarítmico,  $n = (\log N_0 - \log N_U)$  por lo tanto,  $U = nD$ . En el área de inocuidad de los alimentos,  $nD$  se usa frecuentemente como requisito del proceso. Los ejemplos del uso de  $nD$  son:  $12D$ , como el proceso requerido de *C. botulinum* para alimentos enlatados con bajo contenido de ácido, y  $7D$ , para garantizar la seguridad con respecto a la inactivación de salmonellae durante la cocción de la carne (Angelotti, 1978). Este último uso condujo a un requisito del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) para este nivel de inactivación en la cocción de carne asada, y se requirió  $5D$  para salmonellae en carne molida y *Escherichia coli* 0157 en salchichas fermentadas. Del mismo modo, se propusieron procesos  $6D$  (UK Department of Health) o procesos de  $7D$  (Mossel y Struijk, 1991) para garantizar la seguridad con respecto a la sobrevivencia de *L.*

*monocytogenes* en alimentos calentados moderadamente, pasteurizados en empaques, almacenados en frío. La capacidad de alcanzar estos niveles deseados de destrucción en procesos particulares depende absolutamente del conocimiento de la cinética de la inactivación por calor de microorganismos en los alimentos (Pflug y Gould, 2000).

### **Cinética de la sobrevivencia microbiana**

Rahn (1945a) citó experimentos mostrando que el tratamiento con calor húmedo a temperatura constante resultó en una tasa logarítmica de muerte de esporas y microorganismos vegetativos. Descontando varias desviaciones bien establecidas y efectos de artefactos que pueden influir en las formas de las curvas de supervivencia, la cinética subyacente es tal que, cuando se calienta una alícuota de un cultivo homogéneo de microorganismos a temperatura constante, el número de sobrevivientes, por lo tanto, representa una progresión geométrica, esta condición es reconocible gráficamente por una línea recta obtenida al trazar los logaritmos de sus números contra el tiempo de exposición. En el modelo de curva de sobrevivientes logarítmico, se hace referencia al término, sobrevivencia microbiana nivel fraccional. Los niveles de sobrevivencia fraccional son números positivos pequeños, por ejemplo, 1 en 10 = 0.1, 1 en 100 = 0.01, 1 en 1,000 = 0.001, etc.; sin embargo, sus logaritmos o potencias exponenciales de 10 son los números negativos: -1, -2, -3, etc. A medida que se avanza hacia cero sobrevivientes por unidad, el número de fracción de supervivencia se vuelve cada vez más pequeño y el valor del exponente negativo cada vez más grande. Por lo tanto, se ha acostumbrado hablar del “orden logarítmico de la muerte” o la “inactivación exponencial” de las bacterias.

La hipótesis más comúnmente citada para explicar el orden logarítmico de muerte de los microorganismos es la termodinámica derivada particularmente por Rahn (1945a). Withell (1942), señaló que una distribución de resistencias entre las células individuales en una población podría

conducir a una cinética de inactivación exponencial si se supone que el calor actúa de manera igual y uniforme en cada célula. Este enfoque “vitalista” fue desarrollado por Cole et al. (1993) para modelar la cinética de inactivación por calor de *L. monocytogenes*. El enfoque termodinámico se basa en el hecho de que, en cualquier instante, en cualquier sistema a cualquier temperatura por encima del cero absoluto, hay una distribución de niveles de energía entre las moléculas que están presentes. Para reaccionar e inactivar una molécula objetivo que está dentro de un microorganismo, esencial para evaluar la viabilidad, la energía de la molécula reactiva debe exceder un cierto valor. Por lo tanto, a temperatura constante, las moléculas objetivo individuales en una población estarán sujetas a la misma posibilidad de inactivación por unidad de tiempo. Por tanto, a temperatura constante, la cinética de inactivación será logarítmica. Esta es la explicación más simple de la cinética clásica de inactivación por calor y se basa sólidamente en la naturaleza del calor (Pflug y Gould, 2000).

Por otra parte, Brannen (1968) desarrolló varios modelos para la destrucción microbiana, discutiendo un modelo “multihit” en el que la sobrevivencia no logarítmica es inherente al organismo. Brannen (1970) también investigó, a través de modelos, las consecuencias del supuesto de que la homogeneidad genética y la homogeneidad química del ADN de una población microbiana no son equivalentes. Rederickson (1966) describió modelos probabilísticos de muerte microbiana y observó que, en tales modelos, el tiempo de extinción del “último” organismo es una variable aleatoria, y que la curva de sobrevivencia modelada muestra caídas repentinas e impredecibles a medida que el tamaño de la población se reduce.

Abraham et al. (1990), llevaron a cabo estudios experimentales de curvas de sobrevivencia utilizando esporas de *Bacillus stearothermophilus* en suspensión acuosa a seis temperaturas constantes que fueron desde 105°–130 °C. Las curvas de sobrevivencia mostraron hombros

iniciales antes de las disminuciones log-lineales. Por lo tanto, en la práctica, cuando los datos de la curva de sobrevivientes para poblaciones de esporas microbianas aparentemente homogéneas sometidas a calor húmedo se trazan en gráficos semi-logarítmicos, las curvas resultantes no siempre son líneas rectas.

La forma de la curva de sobrevivientes varía con el cultivo de esporas, el sustrato y la temperatura de prueba (Pflug y Odlaug, 1978). Cuando las esporas bacterianas son sometidas a un proceso de calor, donde el tiempo de calentamiento es suficientemente largo que los errores de calentamiento y enfriamiento son mínimos, las formas de las curvas de sobrevivencia obtenidas son: (a) log lineal, constituye cerca del 40% de las curvas de esporas sobrevivientes, por ejemplo, *C. sporogenes* en solución buffer fosfato (Pflug y Odlaug, 1978), (b) curvas cóncavas hacia abajo son frecuentemente descritas teniendo un hombro (una aglomeración extensa de células podría resultar en un retraso antes de que los números de UFC comiencen a disminuir), 20% a 25% de las curvas de sobrevivencia son de esta forma, (c) curvas de sobrevivencia cóncavas hacia arriba resultan cuando hay una mezcla de población microbiana (Rahn, 1945b), 20% a 25% de las curvas de sobrevivencia son de esta forma, (d) las combinaciones de todos los factores anteriores a menudo dan como resultado curvas de tipo sigmoidal, y (e) una curva log lineal con cola; frecuentemente ocurre como resultado de heterogeneidad, diferencias de resistencia al calor de célula a célula dentro la población (Cerf, 1977; Sharpe and Bektash, 1977) o incluso por “adaptación al calor”, un aumento en la resistencia al calor que ocurre durante el proceso de calentamiento ( Han et al., 1976).

Cuando células vegetativas de microorganismos son sometidas a una variedad de estrés ambiental, incluyendo calor, reaccionan homeostáticamente para adaptarse al estrés. Estas adaptaciones involucran la activación y expresión de nuevos grupos de genes, por ejemplo,

después de la irradiación (Moseley, 1989), estrés oxidativo (Demple and Halbrook, 1983), inanición (Groat et al., 1986), etc. Lo mismo es cierto para el calor. El calentamiento moderado conduce a la síntesis de proteínas de “choque térmico”, por ejemplo, en *Escherichia coli* y en *Neurospora crassa* (Plesofsky-Vig and Brambl, 1985). Después de la síntesis de las nuevas proteínas, aumenta la resistencia al calor de las células. El aumento puede ser transitorio, o la resistencia puede permanecer elevada durante largos períodos, dependiendo de las condiciones y de si la síntesis de las proteínas de choque térmico continúa (Pflug y Gould, 2000).

### **Alta presión hidrostática**

Las altas presiones hidrostáticas, por encima de aproximadamente 100 MPa (1 MegaPascal es equivalente a 9.87 atmósferas, 10 bar, 0.1 kgf cm<sup>-2</sup>, 145 lbf inch<sup>-2</sup>), fueron demostradas originalmente para inactivar las bacterias vegetativas por Hite (1899). Se descubrió que las esporas eran mucho más resistentes, sobreviviendo a presiones superiores a 1200 MPa (Larson et al. 1918). Estos primeros estudios también demostraron que el tratamiento a presión extendió la calidad de conservación de algunos alimentos, como leche (Hite, 1899), frutas y verduras (Hite, 1914). Sin embargo, las limitaciones tecnológicas impidieron el uso comercial de la presión para la descontaminación de alimentos hasta la década de 1980 (Mertens, 1995). Hasta esta fecha, las técnicas de ingeniería habían avanzado en la medida en que se desarrollaron procesos industriales para la pasteurización a presión de varios alimentos de pH bajo, en los que las esporas no eran un problema, incluidas mermeladas, jugos de frutas, jaleas, salsas y fruta para yogurt (Selman, 1992). Al mismo tiempo, la tecnología presenta nuevas oportunidades para la texturización de alimentos novedosos, ya que la presión afecta a las macromoléculas desnaturalizando proteínas y modificando geles de polisacáridos para provocar cambios en la textura (que difieren de los causados por calor) (Mertens, 1995). Más recientemente, ha habido una rápida expansión en la

investigación sobre la tecnología de la ingeniería, la microbiología, la ciencia de los materiales y otros aspectos de la ciencia de los alimentos de la pasteurización por presión (Knorr, 1995). Esto fue seguido por la introducción de nuevos alimentos pasteurizados por presión, por ejemplo, guacamole, lácteos, pescado y productos cárnicos almacenados en frío (Palaniappan, 1996).

### **Descripción del proceso**

El tratamiento industrial con alta presión es actualmente un proceso por lotes o semicontinuo. La selección del equipo depende del tipo de producto alimenticio a procesar. Los productos alimenticios sólidos o alimentos con partículas sólidas grandes solo pueden tratarse en modo discontinuo. Los líquidos y otros productos bombeables tienen la opción adicional de producción semicontinua (Ting y Marshall, 2002).

Actualmente, la mayoría de las máquinas de alta presión de uso industrial para el procesamiento de alimentos son sistemas por lotes, mediante los cuales el producto se coloca en una cámara de alta presión, el producto se sumerge en un líquido que actúa como medio transmisor de presión, generalmente agua mezclada con una pequeña cantidad de aceite para lubricación y aditivos para evitar la corrosión de los recipientes, pistones y válvulas de acero (Gould, 2000), el recipiente se cierra y se presuriza bombeando medio al recipiente o reduciendo el volumen de la cámara de presión, por ejemplo, utilizando un pistón. Una vez que se alcanza la presión deseada, se detiene la bomba o el pistón, se cierran las válvulas y se mantiene la presión sin mayor aporte de energía. Una vez transcurrido el tiempo de retención requerido, el sistema se despresuriza, se abre el recipiente y se descarga el producto. El sistema se vuelve a cargar con el producto, ya sea por operadores o máquinas, dependiendo del grado de automatización posible (Ting y Marshall, 2002).

## **Principios del proceso**

Existen dos principios científicos generales de relevancia directa para el uso de altas presiones en el procesamiento de alimentos. El primero es el Principio de Le Chatelier que se aplica a todos los procesos físicos y establece que, cuando se altera un sistema en equilibrio, el sistema responde de una manera que tiende a minimizar la perturbación (Pauling, 1964). Esto significa que la alta presión estimula las reacciones que resultan en una disminución en el volumen, pero se opone a las reacciones que implican un aumento en el volumen. Cualquier fenómeno (por ejemplo, transición de fase, cambio en la configuración molecular, reacción química) que se acompañe de una disminución en el volumen se verá potenciado por la presión (Hogan et al., 2005). En segundo lugar, la regla isostática establece que la presión se transmite de manera instantánea y uniforme a través de una muestra bajo presión, ya sea que la muestra esté en contacto directo con el medio de presión o herméticamente sellada en un empaque flexible que transmite presión (Olsson, 1995). La presión se transmite de manera uniforme (isostática) y casi instantánea en toda la muestra; por lo tanto, el tiempo necesario para el procesamiento a presión es independiente del tamaño de la muestra, en contraste con el procesamiento térmico (Hogan et al., 2005).

## **Requisitos de empaque**

El procesamiento con alta presión requiere empaques herméticos que puedan soportar un cambio en el volumen respondiendo a la compresibilidad del producto (Hugas et al., 2002), ya que los alimentos disminuyen en volumen en función de la presión aplicada, mientras que se produce una expansión igual en la descompresión. Por esta razón, el empaque utilizado para los alimentos tratados con alta presión debe ser capaz de acomodar una reducción de volumen de hasta un 15% y volver a su volumen original sin pérdida de integridad del sello o propiedades de barrera (Hayashi, 1995). El uso de bolsas flexibles puede lograr altas relaciones de empaque; el uso de

bandejas semirrígidas también es posible; los productos envasados al vacío son ideales para alta presión. Dado que el tamaño y la forma del producto tendrán efectos importantes en la efectividad de apilamiento, deben optimizarse para el proceso más rentable; obviamente no es económico tratar el espacio vacío (Ting y Marshall, 2002).

### **Efectos de la alta presión sobre microorganismos**

La barosensibilidad de diferentes organismos es muy variable. En general, cuanto mayor es la complejidad de un organismo, mayor es la sensibilidad al tratamiento por presión (Mor-Mur y Yuste. 2005).

El sitio primario para la inactivación microbiana inducida por la presión es la membrana celular, por ejemplo, modificaciones en la permeabilidad y el intercambio iónico (McClements et al., 2001). Además, la alta presión causa cambios en la morfología celular y reacciones bioquímicas, desnaturalización de proteínas e inhibición de mecanismos genéticos. Otros mecanismos de acción que pueden ser responsables de la inactivación microbiana incluyen la desnaturalización de las enzimas clave y la alteración de los ribosomas (Linton y Patterson, 2000).

### **Bacterias**

El tratamiento de alimentos con alta presión puede destruir microorganismos patógenos y de descomposición; sin embargo, existe una gran variación en la resistencia a la presión de las diferentes cepas bacterianas (Frustoli et al., 2003). La etapa de crecimiento de la bacteria también es importante para determinar la resistencia a la presión, ya que las células en la fase estacionaria son más resistentes que las de la fase exponencial (McClements et al., 2001; Cheftel, 1995; Pagán and Mackey, 2000). Además, las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas difieren significativamente en términos de la estructura química de sus paredes celulares. Las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas son significativamente más débiles y las bacterias Gram-



negativas tienden a ser más sensibles a la presión que las bacterias Gram-positivas (Patterson y Kilpatrick, 1998).

Si bien los primeros estudios sobre los efectos de la presión sobre los microorganismos mostraron que las células vegetativas en la leche, la carne, las frutas y las verduras podían inactivarse a aproximadamente 300 MPa o más, había pocos datos sobre la cinética de inactivación y los niveles de muerte alcanzables. Recientemente se han realizado estudios más detallados y, aunque se han reportado algunos ejemplos de cinética exponencial para la inactivación de células vegetativas mantenidas a presión constante, por ejemplo, *Escherichia coli* (Butz y Ludwig, 1986; Ludwig et al., 1992), la mayoría de los estudios han encontrado “colas” en las curvas de sobrevivencia (Earnshaw, 1995; Metrick et al., 1989; Patterson et al., 1995). Se ha sugerido que una razón para estas discrepancias aparentes es que a temperaturas más altas (por ejemplo, 40 °C y superiores, para *E. coli* a 250 MPa) la inactivación es cercana al primer orden, mientras que a temperaturas más bajas (30 °C para *E. coli*) es más cerca del segundo orden. Se propuso que los cambios dependientes de la temperatura en la composición de los lípidos pueden explicar estas diferencias y, de hecho, se ha demostrado que los cambios de fase en los lípidos de la membrana ocurren alrededor de 30 °C en *E. coli* (Eze, 1990). Otra posible explicación para el efecto de “colas” es que una pequeña fracción de la población celular es más resistente a la presión o está adaptada al estrés por presión que hace que las células restantes sean más resistentes (Mor-Mur y Yuste, 2005).

### **Esporas bacterianas**

Está bien establecido que las esporas son las formas de vida más resistentes a la presión conocidas; en general, solo presiones muy altas (>800 MPa) pueden matar las esporas bacterianas alrededor de la temperatura ambiente. Alternativamente, otros métodos de procesamiento,

aplicados en combinación con alta presión, pueden ser efectivos para la eliminación de esporas bacterianas, al lograr un efecto sinérgico o de obstáculo. Las endosporas bacterianas de *C. botulinum*, son las formas de vida más resistentes a la presión (Gould, 1995).

### **Hongos y levaduras**

Las células bacterianas vegetativas, las levaduras y los mohos son, en general, más susceptibles a la presión que las esporas bacterianas; por lo tanto, se pueden inactivar usando presiones relativamente bajas (Hogan et al., 2005). El tratamiento a presiones inferiores a 400 MPa durante unos minutos es suficiente para inactivar la mayoría de las levaduras, y presiones entre 300 y 600 MPa pueden inactivar la mayoría de los hongos (Smelt, 1998).

### **Factores que influyen en la sensibilidad microbiana a la alta presión**

pH: A valores de pH ácidos, la inactivación inducida por la presión generalmente aumentará y la recuperación de las células lesionadas subletalmente se inhibirá, para la mayoría de las especies (Linton y Patterson, 2000; Pagán et al., 2001). Las esporas bacterianas son generalmente más resistentes a los efectos directos del tratamiento a presión a pH neutro (Smelt, 1998).

Actividad del agua ( $a_w$ ): En general, se ha reportado que la reducción en la actividad del agua ( $a_w$ ) conduce a incrementar la tolerancia de los microorganismos a la presión. (Oxen y Knorr, 1993; Smelt, 1998). Por otro lado, la recuperación de células subletalmente lesionadas puede ser inhibida por una baja  $a_w$  (Smelt, 1998).

Productos alimenticios: Los diferentes componentes e ingredientes alimentarios pueden desempeñar un papel protector contra la presión. Los carbohidratos son generalmente más baroprotectores que las sales (Smelt, 1998).

Temperatura, presión y tiempo de retención: Si bien muchos procesos con alta presión se realizan a temperatura ambiente, se ha encontrado que el aumento o la disminución de la temperatura, aumentan la tasa de inactivación de microorganismos durante el tratamiento con alta presión (Kalchayanand et al., 1998). Generalmente, en el rango de temperatura de +20 °C a -20 °C, la alta presión es más efectiva para inactivar microorganismos vegetativos (Somoike et al., 1992; Takahshi et al., 1991). Las temperaturas superiores a 45–50 °C, también aumentan la tasa de inactivación de patógenos alimentarios y microorganismos de descomposición (Palou et al., 2002). El uso de altas temperaturas para el procesamiento de alimentos se complica por el hecho de que los alimentos en sí pueden sufrir un aumento significativo de la temperatura durante el procesamiento por el calentamiento adiabático. Los incrementos de temperatura debido a las compresiones adiabáticas pueden ser de 3 °C o más por 100 MPa y, aunque estos aumentos de temperatura son generalmente transitorios, en algunos procesos la muestra puede retener este calor y aumentar la dimensión térmica de las condiciones de procesamiento (Ting et al., 2002).

Los aumentos en la magnitud de la presión y la duración del tiempo de retención generalmente conducen a altas letalidades, pero no linealmente. Existe una presión crítica mínima que depende del tipo de organismo por debajo de la cual la inactivación microbiana no tendrá lugar independientemente del tiempo del proceso (Farkas y Hoover, 2000). Pagán y Mackey (2000) afirman que el mecanismo de inactivación puede diferir según el nivel de presión.

### **Efectos de la alta presión en la calidad de los alimentos**

Si bien la seguridad alimentaria y la vida útil a menudo están estrechamente relacionadas con la calidad microbiana, otros fenómenos como las reacciones bioquímicas, las reacciones enzimáticas y los cambios estructurales pueden influir significativamente en la percepción de los consumidores sobre la calidad de los alimentos (Le Bail et al., 2003).

Para algunos productos alimenticios, dependiendo de la exposición al tiempo de presión, se puede producir cierto grado de desnaturalización de proteínas durante el tratamiento con alta presión. Esto puede provocar un cambio en la funcionalidad física y/o cambios en color relativo a productos crudos o no procesados (Hogan et al., 2005).

La estructura física de la mayoría de los productos de alta humedad permanece sin cambios después de la exposición a alta presión, ya que la presión no genera fuerzas de corte. Para los productos que contienen gas tratados bajo alta presión, el color y la textura pueden cambiar debido al desplazamiento de gas y la infiltración de líquidos. La contracción física puede ocurrir debido al colapso mecánico de burbujas de aire y la distorsión de la forma puede estar relacionada con el comportamiento anisotrópico. Para los alimentos que no contienen burbujas de aire, la alta presión con frecuencia produce un cambio mínimo o nulo en las características de textura (Ting y Marshall, 2002). Por otra parte, los tratamientos con alta presión, pueden inducir cambios deseables en la textura y estructura del producto y, en consecuencia, pueden usarse para el desarrollo de nuevos productos o para aumentar la funcionalidad de algunos ingredientes (Hugas et al., 2002).

Uno de los beneficios citados más frecuentemente del procesamiento con alta presión en relación con otros métodos de conservación, es la posibilidad de incrementar la vida de anaquel mientras se conservan las características sensoriales de los productos alimenticios frescos (Hugas et al., 2002; Palou et al., 2002).

### **Microbiología predictiva**

La microbiología alimentaria predictiva se puede definir como el uso de expresiones matemáticas para describir el comportamiento microbiano en un producto alimenticio (Whiting y Buchanan, 1994). La microbiología predictiva se basa en la premisa de que las respuestas de las poblaciones de microorganismos a los factores ambientales son reproducibles y que, al caracterizar

los ambientes en términos de los factores que más afectan el crecimiento y la sobrevivencia microbiana, es posible a partir de observaciones anteriores predecir las respuestas de esos microorganismos en otros ambientes similares (Ross et al., 2000).

La historia de la microbiología predictiva fue revisada por Ross y McMeekin (1994) quienes trazaron sus orígenes en una serie de iniciativas. Estas iniciativas incluyeron lo siguiente: investigación sobre el deterioro del pescado en el Reino Unido (UK) (Spencer y Baines, 1964) y Australia (Olley y Ratkowsky, 1973.); en los Estados Unidos (EE. UU.) para definir combinaciones de factores que evitarían el crecimiento de patógenos y la formación de toxinas (Genigeorgis, 1981); y trabajos en Canadá para reunir los resultados de muchos experimentos aparentemente dispares en *Clostridium botulinum* (Holgate, 1989). La disponibilidad inmediata de computadoras personales potentes y software fácil de usar que alentó a los microbiólogos a explorar áreas de estadística y matemáticas también contribuyó. Los intentos de definir los límites del "crecimiento - no crecimiento" de patógenos (Riemann et al., 1972)) condujeron a resultados de experimentos complejos que se expresaron como ecuaciones que predicen la probabilidad de crecimiento y producción de toxinas en *C. botulinum* (Broughall y Brown, 1984; Dodds, 1989).

El desarrollo de la microbiología predictiva recibió un gran impulso después de que el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentos del Reino Unido revisara posibles temas para nuevos programas de investigación y decidiera, en 1988, financiar un programa coordinado sobre patógenos bacterianos para: (1) obtener datos sistemáticos sobre crecimiento y muerte microbiana para diferentes temperaturas, valores de pH, actividades de agua y conservadores; (2) tratar los datos matemáticamente para hacer modelos del comportamiento de los microbios; (3) asegurar que los modelos imiten el comportamiento de los microbios en una variedad de condiciones de

crecimiento y muerte; y (4) validar el modelo en comparación con datos científicos publicados de forma independiente. (Baranyi y Roberts, 2000)

### **Modelación de las respuestas microbianas**

Los primeros experimentos en microbiología predictiva intentaron identificar qué parte de la respuesta microbiana podría explicarse por los efectos de un pequeño número de factores de control. Tal que, surgieron una serie de principios y lineamientos importantes que condujeron a protocolos efectivos para el modelado predictivo (Baranyi and Roberts, 2000) los cuales se mencionan a continuación.

Medio de cultivo: En general, los alimentos son ricos en nutrientes, por lo que los medios de laboratorio elegidos para el modelado también deben ser ricos, y no susceptibles de provocar un agotamiento temprano de los nutrientes. No es prudente confiar en un solo medio para todos los organismos, sino que se debe seleccionar un medio rico diseñado para el organismo y que permita un crecimiento cercano a la tasa de crecimiento máxima posible.

Elección de organismos: El debate continúa si los modelos deben desarrollarse usando una sola cepa de un patógeno u organismo de descomposición o usando varias cepas mezcladas en un "cóctel". El uso de una sola cepa proporciona una definición más precisa de sus respuestas, pero cepas de las mismas especies pueden variar en su respuesta, especialmente en condiciones subóptimas. Si se usa una sola cepa, debería de ser representativa de otras cepas de ese organismo, es decir, tolera de manera similar la actividad del agua y pH bajo, etc., y con características de temperatura similares. Idealmente, se deben usar aislamientos recientes. Las cepas mantenidas durante largos períodos, por ejemplo, en colecciones de cultivo, pueden haber perdido importantes resistencias u otras características. Muchos modelistas se han basado en "cocteles" de cepas para obtener una respuesta, que tiene en cuenta el hecho de que una cepa puede crecer a temperatura

ligeramente más baja, mientras que una cepa diferente puede ser ligeramente más tolerante al pH bajo. Al usar "cócteles", se espera que el modelo incluya todas las variaciones y, lo más importante, cualquier respuesta extrema.

**Patógenos:** Las cepas que se han asociado con brotes recientes de enfermedades deben usarse siempre que sea posible. Al igual que con los organismos de descomposición, se deben evitar las cepas que han residido en colecciones de cultivo durante largos períodos para evitar perder cualquier propiedad importante. Debe reconocerse que pueden ocurrir diferencias menores en las respuestas dentro de las especies, por ejemplo, en diferentes serotipos del mismo organismo. Sin embargo, modelar cada serotipo importante por separado suele ser una tarea imposible y la única solución realista es incluir en el "cóctel" representantes de todos los serotipos importantes.

**Mantenimiento de organismos:** Es posible que un subcultivo repetido, incluso durante el curso de generación de datos, pueda producir cambios similares a los encontrados en los cultivos antiguos. La generación de datos generalmente ocurre en unos pocos meses y se debe evitar el subcultivo no esencial. Sin embargo, incluso cuando se obtuvieron datos adicionales sobre los patógenos algunos meses posteriores, después de la finalización de una serie inicial de experimentos, se ha encontrado que esos nuevos datos generalmente replican los datos anteriores de manera adecuada, por lo que esto no ha demostrado ser un problema grave.

**Preparación del inóculo:** Durante los primeros estudios de modelos de crecimiento, los inóculos se prepararon de manera estándar, generalmente creciendo en condiciones casi óptimas para alcanzar la fase exponencial. Luego se hicieron subcultivos y se colocaron en una gama de condiciones de crecimiento, algunas casi óptimas, y otras consideradas cercanas a condiciones que no apoyarían el crecimiento. Si el inóculo se preparó mediante subcultivos a partir de condiciones idénticas a las condiciones de crecimiento previstas, puede producirse una respuesta de

crecimiento diferente, por ejemplo, en experimentos para investigar el crecimiento a baja temperatura. En particular, la fase lag generalmente es la más afectada. Sin embargo, las diferencias entre las dos respuestas no se han cuantificado ampliamente y la mayoría de los modeladores consideran que la complejidad del último procedimiento es un desincentivo.

Condiciones cambiantes durante el crecimiento: Generalmente se toma una decisión consciente para modelar el crecimiento, la supervivencia y la muerte en función de las condiciones iniciales de pH, actividad del agua, concentración de conservadores, etc., a temperatura constante para mantener la experimentación lo más simple posible. En modelos más sofisticados, se hace necesario generar modelos bajo condiciones cambiantes o mostrar que los modelos desarrollados bajo una serie de condiciones estáticas pueden ser satisfactoriamente predictivos cuando se aplican a aquellos que cambian.

Aireación: Al decidir acercamientos experimentales para la generación de datos destinados a modelar, se debe considerar la aireación de cultivos de bacterias aerobias. La agitación, combinada con el uso de un pequeño volumen en relación con el tamaño del recipiente, parece una solución simple, pero rara vez logra una buena transferencia de oxígeno a un cultivo a medida que aumenta la concentración de organismos y, por lo tanto, su demanda de oxígeno. La gasificación hace que la experimentación sea más complicada y puede justificarse donde se sabe que los efectos del oxígeno sobre el crecimiento son sustanciales. Sin embargo, generalmente se ha encontrado que las predicciones de muchos modelos existentes que se derivaron usando cultivos estáticos parecen imitar adecuadamente las respuestas documentadas de las bacterias en los alimentos almacenados.

Muestreo: Se han utilizado dos enfoques diferentes: (1) se muestrea un solo recipiente de cultivo repetidamente durante el almacenamiento, o (2) los cultivos replicados se derivan de un solo recipiente de cultivo inoculado, destruyéndose uno por muestreo en cada intervalo de tiempo.



El primero ofrece un cultivo mixto más uniforme, pero tiene un mayor riesgo de posible contaminación, especialmente si el período de incubación es prolongado. Este último es efectivo y flexible siempre que se proporcione un número suficiente de réplicas para tener en cuenta el crecimiento lento inesperado. Cualquiera de los enfoques debe proporcionar un número suficiente de estimaciones de números viables para permitir que se caractericen las inflexiones en las curvas de crecimiento, idealmente del orden de 12 a 20 estimaciones por curva.

### **Clasificación de los modelos microbiológicos predictivos**

Los modelos predictivos pueden ser clasificados según su fundamento matemático, en modelos empíricos o mecanicistas (Roels y Kossen, 1978), modelos probabilísticos y cinéticos (Roberts, 1989); y modelos primarios, secundarios y terciarios, siendo ésta última clasificación propuesta por Whiting y Buchanan (1993) la más utilizada en la comunidad científica, ya que incluye, complementa y unifica las anteriores (Geeraerd et al. 2004).

#### **Modelos primarios**

Los modelos primarios representan el cambio en el número de microorganismos en función del tiempo, bajo un conjunto dado de condiciones. Cuando estas condiciones son favorables para los microorganismos, el modelo primario será un modelo de crecimiento, mientras que, en condiciones estresantes, el modelo primario será un modelo de inactivación (Devlieghere et al., 2009)

Como ejemplos de modelos primarios pueden destacarse el modelo de Baranyi y Roberts (1994), que permite cuantificar la cinética de crecimiento microbiano y obtener, por ejemplo, la velocidad máxima específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ); el modelo modificado de la ecuación de Gompertz para el mismo fin (Zwietering et al., 1990), el modelo de poblaciones heterogéneas de Mckellar (1997), en el cual se asume que el inóculo está distribuido en dos compartimentos, es decir, células en crecimiento y células que no están en crecimiento, el modelo trifásico de

Buchanan et al. (1997), en el que se describe la clásica curva de crecimiento en tres fases (latencia, exponencial y estacionaria), entre otros.

### **Modelos secundarios**

Los modelos secundarios caracterizan los parámetros de los modelos primarios, con respecto a uno o más factores extrínsecos (temperatura, pH, actividad de agua, etc.). Modelan el efecto de dos o más factores sobre el crecimiento microbiano en una matriz. Algunos ejemplos de modelos secundarios son los modelos de adaptación de la ecuación de Arrhenius (Davey, 1989; Huang et al., 2011), el modelo de Ratkowsky et al., (1982), que relaciona la raíz cuadrada de la velocidad específica de crecimiento en función de la temperatura, los modelos con un enfoque polinomial (Gibson et al., 1988), modelos obtenidos con redes neuronales artificiales (García-Gimeno et al., 2005), y modelos de superficie de respuesta (Zurera-Cosano et al., 2006).

### **Modelos terciarios**

Los modelos terciarios son paquetes de software en los cuáles los modelos primarios y secundarios están integrados en una herramienta de aplicación lista para usar. La potencia de los actuales ordenadores ha hecho que estas herramientas sean cada vez más asequibles, ahorrando a los usuarios cálculos matemáticos (McKellar y Lu, 2003). El modelo terciario más conocido es el Pathogen Modeling Program (PMP), el cual fue desarrollado por la USDA (United States Department of Agriculture) en 1990. Este describe el comportamiento de varias bacterias patogénicas en función de las condiciones ambientales. El modelo contiene curvas de crecimiento, curvas de inactivación, y sobrevivencia, modelos de enfriamiento e irradiancia. Este también puede hacer predicciones del tiempo de turbidez o el tiempo para producción de toxinas de algunos patógenos. Otro modelo es Combase, creado por el IFR (Institute of Food Research, UK), el cual

contiene modelos predictivos de crecimiento e inactivación, generados a partir de datos facilitados por cientos de investigadores.

### **Modelación de la inactivación de microorganismos**

El modelado de la inactivación, más específicamente el modelado de la inactivación térmica, fue una de las primeras aplicaciones de la microbiología predictiva. Además de la inactivación térmica, también se puede modelar la inactivación no térmica. La inhibición química es uno de los temas de investigación en el área del modelado predictivo. Otros factores de inhibición no térmica pueden ser la alta presión o la irradiación (Devlieghere et al., 2009).

### **Modelación de la inactivación térmica**

Los tecnólogos alimentarios han aplicado durante muchos años modelos de la muerte microbiana en los principales procesos alimentarios en todo el mundo, por ejemplo, para garantizar la inactivación suficiente de las esporas de *C. botulinum* en alimentos enlatados de baja acidez a través del concepto 12-D, el proceso de calor mínimo para inactivar  $10^{12}$  esporas, basado en estudios de resistencia al calor en esporas de *C. botulinum*. De manera similar, los tiempos mínimos de procesamiento para la eliminación de *Salmonella* a un rango de temperaturas internas mínimas (Goodfellow et al, 1978) condujeron a Lineamientos y Buenas Prácticas de Manufactura (AMI, 1984) que abordan los problemas de cocinar carne fresca y curada con respecto a la supervivencia de *Salmonella*, y se han hecho enfoques similares con respecto a *L. monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, basados en modelos empíricos de inactivación térmica (Baranyi and Roberts, 2000).

A principios del siglo XX, Bigelow et al. (1920) y Esty and Meyer (1922), propusieron los primeros modelos predictivos de inactivación térmica de microorganismos. Estos modelos estaban basados en cinéticas de primer orden (modelos lineales), los cuales tenían como premisa que todas

las células de una población tenían la misma probabilidad de morir. Debido a los avances tecnológicos, se observó que las poblaciones microbianas también presentaban comportamientos no lineales cuando eran expuestos al calor (presencia de fenómenos de hombros y/o colas), por lo que se propusieron nuevos modelos predictivos que explican y modelan este tipo de comportamientos (Pérez-Rodríguez y Valero 2013; McMeekin et al., 2007; Huertas et al., 2015).

### **Modelación de inactivación no térmica**

En los alimentos, a veces hay condiciones de temperatura, pH y  $a_w$  bajo las cuales la multiplicación de bacterias no puede ocurrir, pero las condiciones no son letales, por ejemplo, Buchanan et al. (1994), evaluaron el efecto de la temperatura, pH, cloruro de sodio, y nitrito de sodio en la inactivación no térmica de una mezcla de tres cepas de *L. monocytogenes* en caldo de infusión cerebro-corazón. Las curvas de supervivencia las describieron matemáticamente mediante el ajuste de los datos experimentales usando modelos primarios lineales y no-lineales, y observaron curvas de supervivencia con efecto de “cola”, además, la velocidad de inactivación no térmica fue dependiente de la densidad de población inicial.

Los conceptos de los valores D conocidos por los tratamientos térmicos con calor, suponiendo que una curva de supervivencia semilogarítmica sea lineal, se han extendido a la inactivación química. Obviamente, el concepto de un valor D se vuelve problemático cuando las curvas de supervivencia semilogarítmica determinadas experimentalmente son claramente no lineales (Peleg y Pechina, 2000), que frecuentemente es el caso de la inactivación química. Por otra parte, Xiong et al. (1999) propusieron un modelo matemático para ajustar curvas de supervivencia lineales, curvas con un hombro, curvas con una cola y curvas sigmoidales. Peleg y Pechina (2000) informaron de otras dos formas de curvas de inactivación química, que fueron curvas cóncavas hacia abajo y cóncavas hacia arriba.

## Validación de modelos predictivos

Los modelos predictivos deben validarse para evaluar su capacidad predictiva, y así determinar si las predicciones proporcionan una buena descripción del crecimiento o sobrevivencia de microorganismos en los alimentos (te Giffel y Zwietering, 1999). La validación puede realizarse en medios, pero especialmente en productos alimenticios reales. (Devlieghere et al., 2009).

La precisión de los modelos se puede evaluar gráficamente trazando los valores observados contra las predicciones correspondientes de un modelo. Además, la raíz del error cuadrático medio (*RMSE*) y el coeficiente de determinación  $R^2$  también se pueden usar como una indicación de la confiabilidad de los modelos cuando se aplican en alimentos (Devlieghere et al., 2009).

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) da una idea del ajuste total conseguido, midiendo la fracción de la variación, alrededor de la media, que es explicada por el modelo, es decir mide la proporción de la variabilidad total de la variable dependiente respecto a su media que es explicada por el modelo de regresión. El valor más cercano a 1 significa una mejor predicción obtenida por el modelo predictivo (Sutherland y Bayliss, 1994).

La raíz del error cuadrático medio (*RMSE*) es una de las maneras de cuantificar el error cuadrático de las diferencias entre un valor predicho por un modelo y un valor real u observado. El valor más bajo de *RMSE* implica que el modelo predice con razonable certeza. Sin embargo, el *RMSE* de los datos observados puede ser grande y aun así el modelo predice con exactitud, ya que depende mucho del orden de magnitud de los valores predichos y observados (Valero, 2006).

Ross (1996) propuso dos índices para evaluar la bondad de ajuste de modelos predictivos de forma sencilla. El objetivo de esos índices fue permitir la evaluación de la confiabilidad de dichos modelos en comparación con las observaciones no utilizadas para generar el modelo,

particularmente en los alimentos. Estas comparaciones permiten evaluar la utilidad del modelo en la toma de decisiones en materia de seguridad alimentaria (Baranyi et al., 1999). Esos índices se denominaron factor de exactitud ( $B_f$ ) y factor de ajuste ( $A_f$ ). Desde el desarrollo de estos índices, su aplicación ha sido muy amplia en estudios de validación (Ross et al., 2000; Devlieghere et al., 2005).

Idealmente, los modelos predictivos deberían tener un valor de  $B_f = A_f = 1$ , pero típicamente el valor de  $A_f$  aumentará en 0.10 a 0.15 por cada variable del modelo, siendo, por ejemplo, aceptable un modelo que predice el efecto de la temperatura, pH y la  $a_w$  sobre la velocidad de crecimiento con valores de  $A_f = 1.3 - 1.5$ . No así para los valores que pueda tomar  $B_f$ , ya que definir un rango de éste, será relativo a la aplicación específica del modelo (Ross, 1996).

### **Literatura citada**

- Abbo, E.S., T.O. Olurin, and G. Odeyemi. 2006. Studies on the storage stability of soursop (*Annona muricata* L.) juice. *Afr. J. Biotechnol.* 5: 1808–1812.
- Abraham, G., E. Debray, Y. Candau, and P. Georges. 1990. Mathematical model of thermal destruction of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3073–3080.
- Almeida, M.M.B., de Sousa, P.H.M., Arriaga, A.M.C., do Prado, G. M., Magalhaes, C.E.C., Maia, G.A. and Lemos, G.A. 2011. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Res. Int.* 44: 2155–2159.
- Anaya-Esparza, L.M., R.M. Velázquez-Estrada, S.G. Sayago-Ayerdi, J.A. Sánchez-Burgos, M.V. Ramírez-Mares, M.L. García-Magaña and E. Montalvo-González. 2017. Effect of thermosonication on polyphenol oxidase inactivation and quality parameters of soursop nectar. *Food Sci. Technol.* 75: 545–551.
- AMI (American Meat Institute). 1984. Good Manufacturing Practices No. 1: Guidelines for the Production of Fresh and Cured Cooked Beef. AMI, Washington, DC.
- Angelotti, R. 1978. Cooking requirements for cooked beef and roast beef. *Fed. Register.* 43: 30791–30793.
- Ball, C.O. 1923. Thermal Process Time for Canned Food. *Bull. Natl. Res. Council* No. 37, Vol 7, Part 1. Natl. Res. Council, Washington, DC.

- Baranyi, J., C. Pin, and T. Ross, 1999. Validating and comparing predictive models. *Int. J. Food Microbiol.* 48(3): 159–166.
- Baranyi, J. and T.A. Roberts. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23: 277–294.
- Baranyi, J. and T.A. Roberts. 2000. Principles and Application of Predictive Modeling of the Effects of Preservative Factors on Microorganisms. *In: Lund B.M, A.C. Baird-Parker, G.W. Gould (eds). The microbiological safety and quality of food.* Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. pp: 342–358.
- Bayindirly, A., H. Alpas, F. Bozoğlu, and M. Hizal. 2006. Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. *Food Control.* 17: 52–58.
- Biale, J.B., and D.E. Barcus. 1970. Respiratory patterns in tropical fruits of the Amazon Basin. *Trop Sci.* 12: 93–104.
- Bigelow, W.D., G.S. Bohart, A.C. Richardson, and C.O. Ball. 1920. Heat Penetration in Processing Canned Foods. *Bull. No. 16-L. Res. Labs. Natl. Canners Assoc., Washington, DC.* 128 p.
- Bigelow, W.D. and J.R. Esty. 1920. Thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. *Infect. Dis.* 27: 602–617.
- Bonfil, A.A., S.L. Sánchez, A.L. Pineda, G.D. Villanueva. Listeriosis neonatal. 1997. Reporte de tres casos. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 47: 447–448.
- Brannen, J.P. 1968. On logarithmic extrapolation of microbial survivor curves for planetary quarantine requirements. *Space Life Sci.* 1: 150–152.
- Brannen, J.P. 1970. On the role of DNA in wet heat sterilization of microorganisms. *J. Theor. Biol.* 27: 425–432.
- Broughall, J.M., and C. Brown. 1984. Hazard analysis applied to microbial growth in foods: development and application of three-dimensional models to predict bacterial growth. *Food Microbiol.* 1: 12–22.
- Bruinsma, J., and R.E. Paull. 1984. Respiration during postharvest development of soursop fruit, *Annona muricata* L. *Plant Physiol.* 76: 131–138.
- Buchanan, R.L., M.H. Golden, R.C. Whiting, J. Phillips, and J.L. Smith. 1994. Non-thermal inactivation models for *Listeria monocytogenes*. *J. Food Sci.* 59: 179–188.
- Buchanan, R.L., H.G. Stahl, and R.C. Whiting. 1989. Effects of interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 52: 844–851.
- Buchanan, R.L., R.C. Whiting, and W.C. Damert. 1997. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food microbiol.* 14: 313–326.

- Bueso, C.E. 1980. Soursop, tamarind and chironja. *In*: Nagy S. and P.S. Shaw (eds). Tropical and Subtropical Fruits: Composition, Properties and Uses. AVI Publishing. Westport, USA. pp: 375 – 406.
- Caggia, C., G.O. Scifò, C. Restuccia, C.L. Randazzo. 2009. Growth of acid-adapted *Listeria monocytogenes* in orange juice and in minimally processed orange slices. *Food Control*. 20: 59–66.
- Castañeda-Ruelas, G., C. Eslava-Campos, N. Castro-del Campo, J. León-Félix, C. Chaidez-Quiroz. 2014. Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica. *Salud pública de México*. 56(6): 654–659.
- Castillo-Ánimas, D., G. Varela-Hernández, B.R. Pérez-Salvador, y C. Pelayo-Zaldívar. 2005. Daños por frío en guanábana. Índice de corte y tratamientos postcosecha. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 11: 51–57.
- Castrejón-Alba, M.M., T. Mateo-Balmelli, A. Pérez-Miravete. 1997. Meningoencefalitis por *Listeria monocytogenes* en niños inmunocomprometidos. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex*. 54:76–80.
- Cerf, O. 1977. Trailing of survival of bacterial spores. *J. Appl. Bacteriol*. 42: 1–19.
- Cheftel, J.C. 1995. Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Sci. Technol. Int*. 1: 75–90.
- Cole, M.B., K.W. Davies, G. Munro, C.D. Holyoak, and D.C. Kilsby. 1993. A vitalistic model to describe thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *J. Indust. Microbiol*. 12: 232–239.
- Cratwright, E.J., K.A. Jackson, S.D. Jhonson, L.M. Graves, B.J. Silk, and B.E. Mahon. 2013. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. *Emerg. Infect. Dis*. 19:1–9.
- Das, S., K.V. Lalitha, G. Joseph, C.K. Kamalakanth, and J. Bindu. 2016. High pressure destruction kinetics along with combined effect of potassium sorbate and high pressure against *Listeria monocytogenes* in Indian white prawn muscle. *Ann. Microbiol*. 66(1): 245–251.
- Davey, K.R. 1989. A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase. *J. Appl. Bacteriol*. 67(5): 483-8.
- Deliza, R., A. Rosenthal, F.B.D. Abadio, C.H.O. Silva, C. Castillo. 2005. Application of high pressure technology in the fruit juice processing: benefits perceived by consumers. *J. Food Eng*. 67: 241–246.
- Dembitsky, V.M., S. Poovarodom, H. Leontowicz, M. Leontowicz, S. Vearasilp, S. Trakhtenberg, and S. Gorinstein. 2011. The multiple nutrition of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. *Food Res. Int*. 44: 1671–1701.
- Demple, B. and J. Halbrook, 1983. Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature*. 304: 466–468.
- De Oliveira, E.S., L. Tombini, E.C. Tondo. 2018. Foodborne outbreaks in Brazil associated with fruits and vegetables: 2008-2014. *Food Qual. Saf*. 2(4): 173–181.



- Devlieghere, F., K. Francois, A. Vermeulen, and J. Debevere. 2009. Predictive Microbiology. *In*: Costa, R., and K. Kristbergsson (eds). Predictive Modeling and Risk Assessment. Springer Science & Business Media, New York. pp: 29–54.
- Devlieghere, F., A.H. Geeraerd, J.F. Van Impe, B. De Meulenaer, S. Samapundo. 2005. Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. *Int. J. Food Microbiol.* 105(1): 35–52.
- Dias, D.D.R.C., Z.M.P. Barros, C.B.O. De Carvalho, F.A. Honorato, N.B. Guerra, and P.M. Azoubel. 2015. Effect of sonication on soursop juice quality. *Food Sci. Technol.-Lebensm. Wiss. Technol.* 62: 883–889.
- Dodds, K.L. 1989. Combined effect of water activity and pH on inhibition of toxin production by *Clostridium botulinum* in cooked, vacuum-packed potatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 656–660.
- Doyle, E.M., A.S. Mazzotta, T.Wang, D.W. Wiseman, and V.H. Scott. 2001. Heat Resistance of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* 64(3):410–429.
- Earnshaw, R.G. 1995. High pressure microbial inactivation kinetics. *In*: Ledward, D.A., D.E. Johnston, R.G. Earnshaw, and A.P.M. Hasting (eds). High Pressure Processing of Foods. Nottingham University Press, Nottingham. pp:37–46.
- Elez-Martinez, P., I. Aguiló-Aguayo, and O. Martín-Belloso. 2006. Inactivation of Orange juice peroxidase by high-intensity pulsed electric fields as influenced by process parameters. *J. Sci. Food Agric.* 86: 71–81.
- Espinosa, I., R.I. Ortiz, B. Tovar, M. Mata, and E. Montalvo. 2013. Physiological and physicochemical behavior of soursop fruits refrigerated with 1-methylcyclopropene. *J. Food Qual.* 36(1):10–20.
- Espinoza-Gómez, F., O. Newton, V. Melnikov, L. Pinzón. 2006. Peritonitis bacteriana espontánea por *Listeria monocytogenes*, en un paciente con cirrosis hepática. *Rev. Med. Chile.* 134:1171–1174.
- Esty, J.R. and K.F. Meyer. 1922. The heat resistance of spores of *Bacillus botulinus* and allied anaerobes. *XI. Infect. Dis.* 31:650–663.
- European Commission. 2005. Commission Regulation (EC) N0. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Communities.* 338:1–26.
- European Food Safety Authority. 2011. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2009. *EFSA J.* 9:2090.
- Eze, M.O. 1990. Consequences of the lipid bilayer to membrane-associated reactions. *J. Chem. Ed.* 67: 17–20.
- Farber, J.M. and P.I. Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55: 476–511.

- Farber, J.M. and P.I. Peterkin 2000. *Listeria monocytogenes*. In: Lund B.M, A.C. Baird-Parker, G.W. Gould (eds). The microbiological safety and quality of food. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. pp: 1178–1232.
- Farkas, D.F, and D.G. Hoover. 2000. High pressure processing. *J. Food Sci.* 65: 47–64.
- Food and Drug Administration (FDA). Alerts, Advisories and Safety Information. United States (FDA, US). 2017. FDA advises consumers not to eat apple tree goat dairy goat cheese products because of possible *Listeria* contamination. Disponible en: <https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts> (acceso junio 2018).
- Fredehckson, A.G. 1966. Stochastic models for sterilization. *Biotechnol. Bioeng.* 8: 167–182.
- Frustoli, M., S. Gola, L. Miglioli, P. Rovere. 2003. Combined heat/high-pressure treatments of *Listeria* spp. in a model system. *Industria Conserve.* 78: 169–182.
- Gajalakshmi, S., S. Vijayalakshmi Devi R.V. 2012. Phytochemical and pharmacological properties of *Annona muricata*: a review. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 4: 3–6.
- García-Gimeno, R.M., C. Hervás-Martínez, R. Rodríguez-Pérez, G. Zurera-Cosano. 2005. Modelling the growth of *Leuconostoc mesenteroides* by Artificial Neuronal Networks. *Int. J. Food Microbiol.* 105(3): 317–332.
- Garre, A., P.S. Fernández, R. Lindqvist, J.A. Egea. 2017. Bioinactivation: software for modelling dynamic microbial inactivation. *Food Res. Int.* 93: 66–74.
- Geeraerd, A.H., V.P. Valdramidis, F. Devlieghere, H. Bernaerts, J. Debevere, J.F. Van Impe. 2004. Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modelling. *Int. J. Food Microbiol.* 91: 229–244.
- Gellin, B.G. and C.V. Broome. 1989. Listeriosis. *J. Am. Med. Assoc.* 261: 1313–1320.
- Genigeorgis, C. 1981. Factors affecting the probability of growth of pathogenic microorganisms in foods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179: 1410–1417.
- Gibson, A.M., N. Bartchell, and T.A. Roberts, 1988. Predicting microbial growth: growth responses of *Salmonella* in a laboratory medium affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 6(2): 155–78.
- González, E. M., A.E. Fernández, H.R. Paez, M.M. Oca, y B.T. Gómez. 2014. Uso combinado de 1-Meticiclopropeno y emulsiones de cera en la conservación de guanábana (*Annona muricata*). *Rev. Bras. Frut.* 36(1): 296–304.
- Goodfellow, S.J., and W.L. Brown. 1978. Fate of *Salmonella* inoculated into beef for cooking. *J. Food Prot.* 41: 598–605.
- Gould, G.W. 1995. The microbe as a high pressure target. In: Ledward, D.A., D.E. Johnston, R.G. Earnshaw, A.P.M. Hasting (eds). *High Pressure Processing of Food*. Nottingham University Press, Loughborough. pp. 27–36.

- Gould, G.W. 2000. New and Emerging Physical Methods of Preservation. *In*: Lund B.M, A.C. Baird-Parker, G.W. Gould (eds). The microbiological safety and quality of food. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. pp: 277–293.
- Gratão, A.C.A., V. Jr. Silveira, and J. Telis-Romero. 2007. Laminar flow of soursop juice through concentric annuli: Friction factors and rheology. *J. Food Eng.* 78: 1343–1354.
- Groat, R.G., J.E. Schultz, E., Zychlinsky, A. Bockman, and A. Matin. 1986. Starvation proteins in *Escherichia coli*: kinetics of synthesis and role in starvation survival. *J. Bacteriol.* 168: 486–493.
- Han, Y.W., H.I. Zhang, and J.M. Krochta. 1976. Death rates of bacterial spores: mathematical models. *Can. J. Microbiol.* 22: 295–300.
- Hansen, S. L., S. Purup, and L.P. Christensen. 2003. Bioactivity of faltarinol and its content in carrots. *J. Sci. Food Agric.* 83: 1010–1017.
- Hayashi, R. 1995. Advances in high pressure food processing technology in Japan. *In*: Gaonkar, A.G. (ed). *Food Processing: Recent Developments*. Elsevier, Amsterdam. pp. 185–195.
- Hite, B.H. 1899. The effect of pressure in the preservation of milk. *Bull. W. Virginia Univ. Agric. Exp. Stn.* 58: 15–35.
- Hite, B.H., N.J. Giddings, and C.W. Weakley. 1914. The effect of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables. *Bull. W. Virginia Univ. Agric. Exp. Stn.* 146: 3–67.
- Hogan, E., A.L Kelly, and D.-W. Sun. 2005. High Pressure Processing of Foods: An Overview. *In*: Sun, Da-W. (ed). *Emerging Technologies for Food Processing*. Elsevier Academic Press, San Diego. pp:3–32.
- Holgate, P. 1989. Variates of a stochastic model: a comparative study of the Gompertz effect. *J. Theor. Biol.* 139: 369–378.
- Hsu, K.C. 2008. Evaluation and processing qualities of tomato juice induced by thermal and pressure processing. *Food Sci. Technol.-Lebensm. Wiss. Technol.* 41: 450–459.
- Hsu, K.C., F.J. Tan, H.Y Chi. 2008. Evaluation of microbial inactivation and physicochemical properties of pressurized tomato juice during refrigerated storage. *Food Sci. Technol.-Lebensm. Wiss. Technol.* 41: 367–375.
- Huang, L., A. Hwang, J. Phillips. 2011. Effect of temperature on microbial growth rate-mathematical analysis: the Arrhenius and Eyring-Polanyi connections. *J. Food Sci.* 76(8): E553-60. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02377.x.
- Huertas, J.P., A. Alvarez-Ordoñez, R. Morissey, M. Ros-Chumillas, M.D. Esteban, J. Maté, A. Palop, and C. Hill. 2015. Heat resistance of *Cronobacter sakazakii* DPC 6529 and its behavior in reconstituted powdered infant formula. *Food Res. Int.* 69: 401–409.
- Hugas, M., M. Garriga, J.M. Monfort. 2002. New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Science.* 62: 359–371.

- Jacquet, C., B. Catimel, R. Brosch, C. Buchrieser, P. Dehaumont, V. Goulet, A. Lepoutre, P. Veit, and J. Rocourt. 1995. Investigations related to the epidemic strain involved in the french listeriosis outbreak in 1992. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2242–2246.
- Kalchayanand, N., A. Sikes, C.P. Dunne, B. Ray. 1998. Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurisation and Pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. *J. Food Protect.* 61(4): 425–431.
- Kays, S.J. 1991. Postharvest physiology of perishable plant products. Van Nostrand Reinhold. New York. 532 pp.
- Knorr, D. 1995. High pressure effects on plant derived foods. *In: Ledward, D.A., D.E. Johnston, R.G. Earnshaw, and A.P.M. Hasting (eds). High Pressure Processing of Foods.* Nottingham University Press, Nottingham. pp: 123–135.
- Koesriharti. 1991. Edible fruits. And nuts. *In: Verheij, E.W. and R.E. Coronel (eds). Plant Resources of South-East Asia, No 2.* Pudoc Wageningen, Prosea Foundation: Bogor, Indonesia, and Pudoc-DLO: S Wageningen, Netherlands. pp: 75–78.
- Kraus, A., A.R. Cabral, J. Sifuentes-Osornio, C. Alarcón-Segovia. 1994. Listeriosis in patients with connective tissue diseases. *J. Rheumatol.* 21:635–638.
- Larson, W.P., T.B. Hartzell, and H.S. Diehl. 1918. The effect of high pressure on bacteria. *J. Infect. Dis.* 22: 271–278.
- Le Bail, A., L. Boillereaux, A. Davenel, M. Hayert, T. Lucas, J.Y. Monteau. 2003. Phase transition in foods: effect of pressure and methods to assess or control phase transition. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 4: 15–24.
- Lewis, M.J. 2006. Thermal Processing. *In: Brennan J.G (ed). Food Processing Handbook.* WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. pp: 33–70.
- Lima, M.A.C. and R.E. Alves. 2011. Soursop (*Annona muricata* L.). *In: Yahia E.M. (ed). Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits. Volume 4.* Mangosteen to White Sapote. Woodhead Publishing. Cambridge UK. pp: 363–391.
- Lima, M.A.C. de, R.E. Alves, and H.A.C. Filgueiras. 2003a. Avaliação da qualidade e da suscetibilidade ao escurecimento oxidativo de graviola (*Annona muricata* L.) durante a maturação pós-colheita. *Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort.* 46: 23–26.
- Lima, M.A.C. de, R.E Alves, H.A.C. Filgueiras, and J. Enéas-Filho. 2003b. Comportamento respiratório e qualidade pós-colheita de graviola (*Annona muricata* L.) “Morada” sob temperatura ambiente. *Rev. Bras. Frut.* 25: 49–52.
- Linton, M., and M.F. Patterson. 2000. High pressure processing of foods for microbiological safety and quality. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 47(2–3): 175–182.
- Loizzo, M.R., R. Tundis, M. Bonesi, F. Menichini, V. Mastellone, L. Avallone, and F. Menichini. 2012. Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill. (Cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents. *J. Food Compost. Anal.* 25: 179–184.

- Luber, P. 2011. The Codex Alimentarius guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Food Control*. 22(9):482–1483.
- Ludwig, H., C. Bieler, K. Hallbauer, and W. Scigalla. 1992. Inactivation of microorganisms by hydrostatic pressure. *In*: Balny, C., R. Hayashi, K. Heremans, and P. Masson (eds). *High Pressure Biotechnology*. Colloque INSERM, J. Libby, London. pp: 25–32.
- Ludwig, W., K.H. Scheifer, and E. Stackebrandt. 1984. 16S RNA analysis of *Listeria monocytogenes* and *Brochothrix thermosphacta*. *FEMS Microbiol. Lett.* 25: 199–204.
- Lutchmedial, M., R. Ramlal, N. Badrie, and I. Chang-Yen. 2004. Nutritional and sensory quality of stirred soursop (*Annona muricata* L.) yoghurt. *Int. J. Food Sci.* 55: 407–414.
- McClements, J.M.J., M.F. Patterson, and M. Linton. 2001. The effect of growth stage and growth temperature on high hydrostatic pressure inactivation of some psychrotrophic bacteria in milk. *J. Food Protect.* 64(4): 514–522.
- McDonald, K., and D.W. Sun. 1999. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 52 (1-2): 1–27.
- McKellar, R.C. 1997. Heterogeneous population model for the analysis of bacterial growth kinetics. *Int. J. Food Microbiol.* 36 (2-3): 179–86.
- McKellar, R.C., and X. Lu. 2003. *Modelling microbial responses in foods*. CRC Press, Series in Contemporary Food Science, Boca Raton. 360 p.
- McMeekin, T.A., L.A. Mellefont, and T. Ross. 2007. Predictive microbiology: past, present and future *In*: Brul, S., Van S. Gerwen, and M. Zwietering (eds). *Modelling microorganisms in food*. CRC Press, Florida. 294 p.
- Medeiro, Q.P.V., V Mendonça, B.P. Maracaj, M.E.M Aroucha, and G.R. Pereira. 2009. Physical-chemical characterization of atemóia fruit in different maturation stages. *Revista Caatinga*. 22(2): 87–90.
- Mertens, B. 1995. Hydrostatic pressure treatment of food: equipment and processing. *In*: Gould, G.W. (ed). *New Methods of Food Preservation*. Blackie Academic and Professional, Glasgow. pp:135–158.
- Metrick, C., D.G. Hoover, and D.F. Farkas. 1989. Effects of high hydrostatic pressure on heat-resistant and heat-sensitive strains of *Salmonella*. *J Food Sci.* 54: 1547–1564.
- Miller, A.J. 1992. Combined water activity and solute effects on growth and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Prot.* 55: 414–418.
- Mor-Mur, M., and J. Yuste. 2005. Microbiological Aspects of High-pressure Processing. *In*: Sun, Da-W. (ed). *Emerging Technologies for Food Processing*. Academic Press, Amsterdam. pp: 47–65.
- Moseley, B.E.B. 1989. Ionizing radiation: action and repair. *In*: Gould, G.W. (ed). *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*. Elsevier Applied Science, London. pp: 43–79.

- Mossel, D.A.A. and C.B. Struijk. 1991. Public health implications of refrigerated pasteurized (“sous-vide”) foods. *Int. J. Food Microbiol.* 13:187–206.
- Murray, EGD., R.A. Webb, and M.B.R. Swann. 1926. A disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus, *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* 29: 407–439.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF). 2006. Requisite scientific parameters for establishing the equivalence of alternative methods of pasteurization. *J. Food Prot.* 69:1190–1216.
- Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias. 1994. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/091ssa14.html>. (Fecha de consulta: 21 noviembre 2016).
- Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. 1994. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/121ssa14.html>. (Fecha de consulta 2 diciembre 2016).
- Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*. 1995. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/143ssa15.html>. (Fecha de consulta: 2 diciembre 2016).
- Nwachukwu, E., and C. Ezeigdo. 2013. Changes in the microbial population of pasteurized soursop juice treated with benzoate and lime during storage. *Afr. J. Biotechnol.* 7: 3992–3995.
- Oey, I., I.V. Plancken, A.V. Loey, and M. Hendrickx. 2008. Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems? *Trends Food Sci. Technol.* 19(6): 300–308.
- Olley, J., and D.A. Ratkowsky. 1973. Temperature function integration and its importance in the storage and distribution of flesh foods above the freezing point. *Food Technol. Aust.* 25: 66–73.
- Olsson, S. 1995. Production equipment for commercial use. *In*: Ledward, D.A, D.E. Johnston, R.G. Earnshaw, A.P.M. Hastings (eds). *High Pressure Processing of Foods*. Nottingham University Press, Nottingham. pp. 167–180.
- Oxen, P. and D. Knorr. 1993. Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivation of *Rhodotorula rubra*. *Food Sci. Technol.-Lebensm. Wiss. Technol.* 26: 220–223.
- Pagán, R., S. Jordan, A. Benito, B.M. Mackey. 2001. Enhanced acid sensitivity of pressuredamaged *Escherichia coli* O157 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1983–1985.
- Pagán, R., and B.M. Mackey. 2000. Relationship between membrane damage and cell death in pressure-treated *Escherichia coli* cells: differences between exponential- and stationary-phase cells and variation among strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2829–2834.

- Palaniappan, S. 1996 High isostatic pressure processing of foods. *In: Chandarana, P.I. (ed). New Processing Technologies Yearbook. Nat. Food Proc. Assoc., Washington, DC. pp:51–66.*
- Palou, E., A. Lopez-Malo, J. Welti-Chanes. 2002. Innovative fruit preservation using high pressure. *In: Welti-Chanes J., G.V. Barbosa-Canovas, J.M. Aguilera, (eds). Engineering and Food for the 21st Century. Food Preservation Technology Series, CRC Press, Boca Raton. pp. 715–726.*
- Patras, A., N.P. Brunton, F. Butler, and G. Downey. 2009. Effect of thermal and high pressure processing on antioxidant activity and instrumental colour of tomato and carrot purees. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 10(1): 16–22.*
- Patras, A., N. Brunton, C. O'Donnell, and B.K Tiwari. 2010. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends Food Sci. Technol. 21: 3–11.*
- Patterson, M, and D. Kilpatrick. 1998. The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry. *J Food Protect. 61(4): 432–436.*
- Patterson, M.F., M. Quinn, R. Simpson, and A. Gilmour. 1995. Effects of high pressure on vegetative pathogens. *In: Ledward, D.A., D.E. Johnston, R.G. Earnshaw, and A.P.M. Hasting (eds). High Pressure Processing of Foods. Nottingham University Press, Nottingham. pp: 47–63.*
- Pauling, L. 1964. *College Chemistry: An introductory textbook of general chemistry. 3a. ed. Freeman and company, San Francisco. 832 p.*
- Paull, R. E. 1982. Postharvest variation in composition of soursop (*Annona muricata* L.) fruit in relation to respiration and ethylene production. *J. Am. Soc. Hortic. Sci. 107: 582–585.*
- Paull, R.E. 1990. Chilling injury of crops of tropical and subtropical origin. *In: Wang C.Y. (ed.). Chilling Injury of Horticultural Crops. CRC Press. Boca Raton, FL. pp: 17–36.*
- Paull, R.E. 1998. Soursop. *In: Shaw P.E., H.T. Chan, and S. Nagy, (eds). Tropical and Subtropical Fruits. Agscience, Auburndale, FL, USA. pp: 386–400.*
- Paull, R.E., and O. Duarte. 2011. *Tropical Fruits. Vol. 1. CABI Publishing. Oxfordshire, UK.*
- Peleg, M., and C.M. Pechina. 2000. Modeling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 40(2): 159–172.*
- Pérez-Rodríguez F and Valero A. (2013). Predictive Models: Foundation, Types, and Development. *In: Pérez-Rodríguez F and Valero A (eds) Predictive Microbiology in Foods. SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition, vol 5. New York: Springer, pp. 25–55.*
- Peters, M., N. Badrie, and E. Comissiong. 2000. Processing and quality evaluation of soursop (*Annona muricata* L) nectar. *J. Food Qual. 24: 361–374.*
- Pflug, I.J., and G.W. Gould. 2000. Heat Treatment. *In: Lund B.M, A.C. Baird-Parker, G.W. Gould (eds). The microbiological safety and quality of food. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. pp: 36–64.*

- Pflug, L.J., and T.E. Odlaug. 1978. A review of z- and F-values used to ensure the safety of low-acid canned food. *Food Technol.* 32(6): 63–70.
- Pinner, R.W., A. Schuchat, B. Swaminathan, P.S. Hayes, K.A. Deaver, R.E. Weaver, B.D. Plikaytis, M. Reeves, C.V. Broome, and J.D. Wenger. 1992. Role of foods in sporadic listeriosis, II: microbiological and epidemiologic investigation. The Listeria Study Group. *J. Am. Med. Assoc.* 267: 2046–2050.
- Pirie, J.H.H. 1927. A new disease of veldt rodents “Tiger Rover Disease”. *Publications of the South African Institute of Medical Research.* 3: 163–186.
- Plesofsky-Vig, N., and R. Brambl. 1985. Heat shock response of *Neurospora crassa*: protein synthesis and induced thermotolerance. *J. Bacteriol.* 162: 1083–1091.
- Rahn, O. 1945a. Physical methods of sterilization of microorganisms. *Bact. Rev.* 9: 1–45.
- Rahn, O. 1945b. Injury and death of bacteria by chemical agents. *In: Luyet, B.J. (ed). Biodynamica Monograph No. 3 Biodynamica, Normand, MO.* 183 pp.
- Ramesh, M.N. 2007. Pasteurization and food preservation. *In: Rahman, M.S. (ed). Handbook of Food Preservation, second ed. CRC Press, Boca Raton, FL.* pp. 571–585.
- Rasmussen, O.F., P. Skouboe, L. Dons, L. Rossen, and J.E. Olsen. 1995. *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. *Microbiol.* 141: 2053–2061.
- Ratkowsky, D.A., J. Olley, T.A. McMeekin, and A. Ball. 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J. Bacteriol.* 149(1): 1–5.
- Rawson, A., A. Patras, B.K. Tiwari, F. Noci, T. Koutchma, and N. Brunton. 2011. Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Res. Int.* 44: 1875–1887.
- Reed, R.W. 1958. Listeria and Erysipelothrix. *In: Dubos, R.J. (ed). Bacterial and Mycotic Infections in Man. 3rd ed. J. B. Lippincott, Philadelphia.* pp: 453–462.
- Reid, M.S. 2002. Maturation and Maturity Indices. *In: Kader, A.A., (ed). Post-harvest Technology of Horticultural Crops. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources Publication 3311. Oakland.* pp: 55–63.
- Riemann, H., W.H. Lee, and C. Genigeorgis. 1972. Control of *Clostridium botulinum* and *Staphylococcus aureus* in semipreserved meat products. *J. Milk Food Technol.* 35: 514–523.
- Roberts, T.A. 1989. Combinations of antimicrobials and processing methods. *Food Tech.* 43:156–163.
- Roels, J.A., and V.W.F. Andkossen. 1978. On the modeling of microbial metabolism. *In: Bull, M.J. (ed). Progress in industrial microbiology. vol. 14. Elsevier, Amsterdam.* pp: 95–203.
- Ross, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J. Appl. Microbiol.* 81(5): 501–508.



- Ross, T., P. Dalgaard, and S. Tienungoon. 2000. Predictive modeling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 231–245.
- Ross, T., and T.A. McMeekin. 1994. Predictive microbiology (review). *Int. J. Food Microbiol.* 23: 241–264.
- Ryser, E.T. and E.H. Marth. 1991. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. Marcel Dekker, Inc. New York. pp: 249–254.
- Saguy, I., I.J. Kopelman, and S. Mizrahi. 1978. Simulation of ascorbic acid stability during heat processing and concentration of grapefruit juice. *J. Food Process Eng.* 2: 213–225.
- Sanusi, S.B., and M.F.A. Bakar. 2018. Soursop-*Annona muricata*. In: Rodrigues S., E. de Oliveira S., E. Sousa B (eds). *Exotic Fruits*. Academic Press, London. pp: 391–395.
- Seeliger, H.P.R., and D. Jones. 1986. Genus *Listeria* Pirie. In: Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, Williams & Wilkins, Baltimore. pp: 1235–1245.
- Selman, J. 1992. New technologies for the food industry. *Food Sci. Technol. Today.* 6: 205–209.
- Sharpe, K., and R.M. Bektash. 1977. Heterogeneity and the modelling of bacterial spore death: the case of continuously decreasing death rate. *Can. J. Microbiol.* 23: 1501–1507.
- Shelef, L.A. 1989. Listeriosis and its transmission by food. *Prog. Food and Nutr. Sci.* 13: 363–382.
- SIAP (Servicio de Información Agrícola y Pesquera). 2019. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119> (acceso 22 diciembre 2019).
- Smelt, J.P.P.M. 1998. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Food Sci. Technol.* 9: 152–158.
- Somoike, K., T. Setoyama, Y. Kuma, and S. Kobayashi. 1992. Effect of pressure and temperature on the death rates of *Lactobacillus casei* and *Escherichia coli*. *High Press. Biotechnol.* 224: 297–301.
- Spencer, R. and C.R. Baines. 1964. The effect of temperature on the spoilage of wet fish. I. Storage at constant temperatures between  $-1^{\circ}\text{C}$  and  $25^{\circ}\text{C}$ . *Food Technol.* 18: 769–772.
- Sutherland, J., and A. Bayliss. 1994. Predictive modelling of growth of *Yersinia enterocolitica*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *Int. J. Food Microbiol.* 21(3): 197–215.
- Syed, Q.A., M. Buffa, B. Guamis, and J. Saldo. 2016. Factors affecting bacterial inactivation during high hydrostatic pressure processing of foods: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56(3): 474–483.
- Takahshi, K., H. Ishii, and H. andlshikawa. 1991. Sterilization of microorganisms by hydrostatic pressure at low temperature. In: Hayashi, R. (ed). *High Pressure Science of Food*. San-Ei Publishing Co., Kyoto. pp:225–232.
- te Giffel, M.C. and M.H. Zwietering. 1999. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 46: 135–149.

- Ting, E., V.M. Balasubramaniam, and E. Raghubeer. 2002. Determining thermal effects in highpressure processing. *Food Technol.* 56(2): 31–35.
- Ting, E.Y., and R.G. Marshall. 2002. Production issues related to UHP food. *In: Welti-Chanes J., G.V. Barbosa-Canovas, J.M. Aguilera (eds). Engineering and Food for the 21st Century. Food Preservation Technology Series, CRC Press, Boca Raton. pp. 727–738.*
- Tovar-Gómez, B., M. Mata-Montes de Oca, H.S. García-Galindo, y E. Montalvo-González. 2011. Efecto de emulsiones de cera y 1-metilciclopropeno en la conservación poscosecha de guanábana. *Revista Chapingo Serie Horticultura.* 17: 53–61.
- Townsend, C.T., J.R. Esty, and F.C. Baselt. 1938. Heat resistance studies on spores of putrefactive anaerobes in relation to determination of safe processes for canned foods. *Food Res.* 3: 323–346.
- Tribst, A.A.L., A.S. Sant’Ana, and P.R. Massaguer. 2009. Microbiological quality and safety of fruit juices—past, present and future perspectives. *Crit. Rev. Microbiol.* 35 (4): 310–339.
- Tucker, G.S. 1991. Development and use of numerical techniques for improved thermal process calculations and control. *Food Control.* 2:15–24.
- UK Department of Health. 1989. *Chill and Frozen: Guidelines on Cook-Chill and Cook-Freeze Catering Systems.* HMSO, London. 31 pp.
- Umme, A., S.S Bambang, Y. Salmah, and B. Jamilah. 2001. Effect of pasteurization on sensory quality of natural soursop puree under different storage conditions. *Food Chem.* 75: 293–301.
- Umme, A., Y. Salmah, B. Jamilah, and B.A. Asbi. 1999. Microbial and enzymatic changes in natural soursop puree during storage. *Food Chem.* 65: 315–322.
- Valero, A. 2006. Aplicaciones y modelos predictivos en evaluación de riesgo de *Listeria monocytogenes* en alimentos mínimamente procesados. Memoria presentada para optar al grado de doctor por el Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba, España.
- Valero, D., and M. Serrano. 2010. *Postharvest Biology and Technology for Preserving Fruit Quality.* CRC Press. Boca Raton, FL, USA. 287 pp.
- Van Zuijlen, A., P.M. Periago, A. Amézquita, A. Palop, S. Brul, and P.S. Fernández. 2010. Characterization of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores; putative indicator microorganism for optimisation of thermal processes in food sterilisation. *Food Res Int.* 43: 1895–1901.
- Whiting, R.C., and R.L. Buchanan. 1993. A classification of models for predictive microbiology. *Food Microbiol.* 10: 175–177.
- Whiting, R.C., and R. Buchanan. 1994. Microbial modelling. *Food Technol.* 48: 113–120.
- Wills, R.B.H., W.B. Mcglasson, D. Graham, and D.C. Joyce. 2007. *Postharvest: An Introduction to the Physiology and Handling of Fruit, Vegetables and Ornamentals.* New South Wales University Press. Wallingford, UK. 227 p.

- Withell, E.R. 1942. The significance of the variation in shape of time-survivor curves. *J. Hyg.(Lond.)*. 42(2):124–183.
- Worrell, D.B., C.M.S Carrington, and D.J. Huber. 1994. Growth, maturation and ripening of soursop (*Annona muricata* L.) fruit. *Scient. Hortic.* 57: 7–15.
- Xiong, R., G. Xie, A.E. Edmondson, and M.A. Sheard. 1999. A mathematical model for bacterial inactivation. *Int. J. Food Microbiol.* 46: 45–55.
- Zayas, J.C. 1966. Las frutas anonáceas. Ediciones Fruticuba. Havana. 63 p.
- Zunabovic, M., K.J. Domig, W. 2011. Kneifel. Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments – A review. *Food Sci. Technol.-Lebensm. Wiss. Technol.* 44:351–362.
- Zurera-Cosano, G., R.M. García-Gimeno, R. Rodríguez-Pérez, and C. Hervás-Martínez. 2006. Performance of response surface model for prediction of *Leuconostoc mesenteroides* growth parameters under different experimental conditions. *Food Control.* 17(6): 429–438.
- Zwietering, M.H., I. Jongenburger, F.M. Rombouts, and K. Van't Reit. 1990. Modelling of bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol.* 56: 1875–188

**CAPÍTULO I. EFECTO DE TRATAMIENTOS TÉRMICOS MODERADOS SOBRE LA  
INACTIVACIÓN DE UNA CEPA DE *Listeria monocytogenes* Y PROPIEDADES  
FISICOQUÍMICAS DE PULPA DE GUANÁBANA**

Almadalia Velasco-Hernández<sup>1</sup>, Crescenciano Saucedo-Veloz<sup>1</sup>, Martha Elva Ramírez-Guzmán<sup>1</sup>, Sergio Humberto Chávez-Franco<sup>1</sup>, Salvador Valle-Guadarrama<sup>2</sup> and Daniela Saucedo-Reyes<sup>1\*</sup>

## 1.1 RESUMEN

La guanábana (*Annona muricata* L.) es una fruta tropical de importancia comercial fresco o procesado en forma de pulpa pasteurizada o congelada utilizada para preparar jugos, bebidas, néctares, helados, paletas y postres. Además de la conservación de la calidad, otra de las preocupaciones del procesamiento en pulpas de frutas es la inocuidad del producto. Diversos estudios muestran la asociación entre el procesamiento de pulpas y el desarrollo de diversos microorganismos; sin embargo, pocos se han enfocado a la asociación entre *L. monocytogenes* y pulpas de frutas ácidas. El objetivo fue evaluar el efecto de tratamientos térmicos moderados sobre la inactivación de *L. monocytogenes* y la calidad fisicoquímica en pulpa de guanábana para determinar las mejores condiciones de procesamiento que permitan mantener la calidad y conseguir un nivel de inocuidad adecuado. Se obtuvieron cinéticas de inactivación térmica de *L. monocytogenes* inoculada en pulpa de guanábana a cinco niveles de temperatura (50, 52.5, 55, 57.5, y 60 °C) y diferentes tiempos de exposición (0 – 60 min). Las curvas de inactivación no siguieron una relación log-lineal y, en consecuencia, se ajustaron a la ecuación modificada de Gompertz. Los resultados indicaron que la ecuación modificada de Gompertz proporcionó una bondad de ajuste aceptable. Reducciones 5- $\log_{10}$  se lograron a 50°C/60 min, 52.5 °C/16 min, 55 °C/10 min, 57.5 °C/5 min, y 60°C/1.25 min. Estos tratamientos 5- $\log_{10}$  aplicados a la pulpa de guanábana indicaron que la pulpa de guanábana presentó cambios en los parámetros de color y disminución del contenido de azúcares totales, azúcares reductores, ácido ascórbico, fenoles totales y pH.

Palabras clave: pulpa de guanábana, *Listeria monocytogenes*, tratamiento térmico, cinética de inactivación.

## 1.2 ABSTRACT

Soursop (*Annona muricata* L.) is a commercially important tropical fruit, whether fresh or processed as a pasteurized or frozen pulp used to prepare juice, drinks, nectar, ice cream, popsicles, and desserts. Besides preserving quality, another preoccupation in the processing of fruit pulps is product safety. Several studies show the association between pulp processing and the development of various microorganisms; however, few have focused on the association between *L. monocytogenes* and the pulp of sour fruits. The objective was to evaluate the effect of moderate thermal treatments on the inactivation of *L. monocytogenes* and the physicochemical properties in soursop pulp in order to determine the best processing conditions that will allow to maintain quality as well as to achieve an adequate level of safety. Thermal inactivation kinetics were obtained for *L. monocytogenes* inoculated in soursop pulp at five levels of temperature (50, 52.5, 55, 57.5, and 60 °C) and different exposure times (0–60 min). The survival curves did not suggest a log-linear relationship, and were, consequently, fitted to the modified Gompertz equation. The results indicated that the modified Gompertz equation provided an acceptable goodness of fit. Five- $\log_{10}$  cycles reductions of *L. monocytogenes* were achieved at 50 °C/60 min, 52.5 °C/16 min, 55 °C/10 min, 57.5 °C/5 min, and 60 °C/1.25 min. These 5- $\log_{10}$  treatments applied to the soursop pulp indicated that the soursop pulp showed changes in the color parameters and a decrease in the content of total sugars, reducing sugars, ascorbic acid, total phenols, and pH.

Key words: soursop pulp, *Listeria monocytogenes*, thermal treatment, inactivation kinetics.

## 1.3 INTRODUCCIÓN.

Dentro del grupo de las anonáceas, la guanábana (*Annona muricata* L.) sobresale por producir frutos altamente apreciados por su agradable sabor agrídulce, textura suave y aroma delicado, además de su alto contenido de compuestos antioxidantes que le proporcionan un alto valor

agregado (Baskaran et al., 2016; Jiménez et al., 2014). Fisiológicamente, los frutos son altamente perecederos debido a su elevada velocidad de respiración y producción de etileno, y por lo tanto pueden durar 3–4 días a 24 °C y 1–2 semanas a 13 °C (Pareek et al., 2011). Por esta razón, los frutos se comercializan principalmente como un producto procesado, ya sea pulpa congelada o pasteurizada, la cual se utiliza para la elaboración de jugos, néctares, helados, paletas y en repostería (Jiménez et al., 2014; Leite et al., 2016). Además, la dilución de la pulpa (adición de agua) es una práctica común justificada por algunos productores como una forma para mejorar la eficiencia del despulpado. La cantidad de agua a adicionar es determinada mediante la consistencia final de la pulpa y textura deseada dependiendo del uso final previsto (Francis and Bellot, 2003).

Además de la conservación de la calidad organoléptica, nutricional y valor nutracéutico, otra de las preocupaciones del procesamiento de pulpas ácidas se relaciona con la inocuidad del producto. En este sentido, hay reportes (De Oliveira et al., 2018; Tribst et al., 2009) de los brotes más relevantes que involucran patógenos transmitidos por los alimentos y microorganismos de descomposición asociados con jugos y pulpa de frutas, pero existen pocos estudios relacionados con el crecimiento y sobrevivencia de *L. monocytogenes* en pulpas de frutas ácidas, como la guanábana (Caggia et al., 2009; Von Breymann et al., 2013).

La contaminación por *L. monocytogenes* ocurre durante el manejo postcosecha de los frutos y en su preparación para el procesamiento, por lo que resulta difícil evitar la contaminación cruzada; además, resulta difícil mantener las plantas de procesamiento libres de este microorganismo por su capacidad de formar biofilms (Carpentier y Cerf, 2011; Ferreira et al., 2014). De acuerdo con Von Breymann et al. (2013), *L. monocytogenes* tiene habilidad para sobrevivir y desarrollarse en pulpas de frutas al tolerar condiciones de pH bajo y baja actividad de agua. Asimismo, se ha demostrado que es tolerante a un amplio rango de tratamientos de pasteurización (Mazzotta, 2001)

y puede crecer bajo condiciones de congelación (Vitas et al., 2004); por lo cual, comercialmente, la conservación de pulpa de frutas se complementa con la adición de aditivos químicos como el benzoato de sodio o sorbato de potasio (Von Breymann et al., 2013). Sin embargo, la preferencia al manejo de pulpa de fruta libre de aditivos, conduce a la necesidad de realizar investigaciones que asocien las características fisicoquímicas de la pulpa y el tratamiento por aplicar para el control de *L. monocytogenes*. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de tratamientos térmicos moderados sobre la inactivación de *L. monocytogenes* y la calidad fisicoquímica de pulpa de guanábana para determinar las mejores condiciones de procesamiento que permitan mantener la calidad y conseguir un nivel de inocuidad adecuado.

## **1.4 MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **1.4.1 Proceso para la pulpa.**

Se usaron frutos de guanábana en madurez de consumo (pH = 3.74, firmeza = 8.2 N, sólidos solubles totales de 8.1 °Bx y acidez titulable de 0.74 % de ácido cítrico), los cuales se adquirieron de comerciantes ubicados en la Central de Abasto de la Ciudad de México. Los frutos se lavaron y se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 0.01%. Después, la cáscara y las semillas se removieron bajo condiciones asépticas. Para facilitar la manipulación de la pulpa durante las pruebas experimentales, se le agregó agua en una relación 1:1 para obtener una pulpa fluida que es fácil de filtrar (Francis y Bellot, 2003). La mezcla se homogeneizó en un mezclador de vidrio (Osterizer, Mod. 6644-13), se filtró (tamiz No. 45, Serie ASTM E-11, 0.355 mm) y se mantuvo a -63 °C hasta que se usó para los estudios de inactivación y evaluación de calidad de guanábana, respectivamente.

### **1.4.2 Cepa bacteriana y preparación del cultivo celular.**

Una cepa de *L. monocytogenes*, ATCC 7644, se utilizó para este estudio. La cepa se obtuvo de la colección de cepas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y se mantuvo en agar cistina tripticasa (CTA; Bioxon, Becton Dickinson, Mexico City, Mexico) a 5 °C.

Para reproducir las células, se tomó una alícuota con un asa estéril y se transfirió a 100 mL de caldo infusión cerebro-corazón estéril (BHI broth, BD/Bioxon, Becton Dickinson, Mexico City, Mexico). Inmediatamente, las células se incubaron a 37 °C durante 24 h bajo agitación continua a 200 rpm para obtener células en fase de crecimiento estacionario. Luego, las células se centrifugaron dos veces a 4000 x g durante 15 min a 4 °C (HermLe, Z 446 K, Wehingen, Germany) y se re-suspendieron en 50 mL de BHI estéril.

Los cultivos iniciales se colocaron en crioviales de plástico estériles de 2 mL conteniendo BHI suplementado con 20% de glicerol estéril en una relación 1:1. Posteriormente, las muestras se almacenaron a -63 °C hasta que se usaron para los estudios de inactivación por calor. La concentración estimada de *L. monocytogenes* fue 10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup>.

### **1.4.3 Tratamientos térmicos.**

Los tratamientos térmicos mediante capilares se desarrollaron de acuerdo a Vega et al. (2016). Subsecuentemente, 9 mL de pulpa estéril (pH=3.75) se inocularon con 1 mL de la suspensión celular de *L. monocytogenes* previamente descongelada y aclimatada a temperatura ambiente. La pulpa inoculada se homogeneizó en un agitador vórtex (modelo MX-S, 60W, Science Med, Helsinki, Finland). Tubos capilares de vidrio (intraMARK, BLAUBRAND®, Wertheim, Germany), previamente esterilizados a 250 °C durante 24 h y atemperados, se llenaron con 100 µL de pulpa inoculada. Ambos extremos de los tubos se sellaron inmediatamente, un extremo con grasa de silicona de alto vacío (Dow Corning®, Midland, USA) y el otro con flama. Los tubos se



sellaron cuidadosamente para evitar el calentamiento de la pulpa inoculada. Los tratamientos térmicos se llevaron a cabo por inmersión de los capilares en un baño de agua en recirculación (Tempstir<sub>tm</sub>, Precision Scientific Company, Tamil Nadu, India) a temperaturas controladas:  $50.0 \pm 1$  °C,  $52.5 \pm 1$  °C,  $55.0 \pm 1$  °C,  $57.5 \pm 1$  °C, y  $60.0 \pm 1$  °C, a diferentes intervalos de tiempos (0–60 min), e inmediatamente se enfriaron en un baño de agua con hielo. El tiempo necesario para alcanzar las temperaturas de tratamiento (come-up time) fue de aproximadamente 3 s y se excluyó. Para cada combinación de temperatura y tiempo, se utilizó un set de 4 capilares. Un set de tubos capilares sin tratar se utilizó como control.

#### **1.4.4 Enumeración de *L. monocytogenes*.**

Diluciones decimales en serie de las muestras tratadas y no tratadas se realizaron en agua de peptona estéril al 0.1% (w/v) (PW, BD/Difco Laboratories, Sparks, Md, USA.). Alícuotas de 0.1 mL de la solución diluida se colocaron en placas Petri, en duplicado, y el medio de enumeración que se usó fue agar triptona y soja estéril (TSA, BD/Becton Dickinson, Sparks, Md, USA.). Las diluciones seleccionadas se incubaron a 37 °C durante 48 h. Posteriormente, se realizó el conteo. La reducción de células viables se expresó como el logaritmo decimal del cociente de las células tratadas ( $N$ ) y no tratadas ( $N_0$ ).

#### **1.4.5 Modelación matemática y validación del modelo predictivo.**

La ecuación modificada de Gompertz (ecuación (1.1)) (Linton et al.,1995, 1996) se ajustó a las curvas de inactivación por calor de *L. monocytogenes* en pulpa de guanábana.

$$\text{Log} \frac{N}{N_0} = Ce^{-e^{BM}} - Ce^{-e^{-B(t-M)}} \quad (1.1)$$

donde  $N$  y  $N_0$  representan la cuenta microbiana final e inicial, respetivamente;  $B$  es la velocidad de muerte relativa en  $M$  [ $\text{Log}_{10}$  (UFC  $\text{mL}^{-1}$ )  $\text{min}^{-1}$ ];  $C$  es la diferencia en el valor de la asíntota

superior e inferior [ $\text{Log}_{10} (\text{UFC mL}^{-1})$ ];  $M$  es el tiempo en el cual la velocidad absoluta de muerte es máxima (min); el signo menos antes de  $C$  significa la inactivación de microorganismos, y  $t$  es el tiempo (min).

A su vez, mediante los parámetros  $B$  y  $C$  de la ecuación modificada de Gompertz, se calculó la velocidad máxima de muerte exponencial,  $\mu_{\max}$  (ecuación (1.2)) (McMeekin et al., 1993):

$$\mu_{\max} = \frac{BC}{e} \quad (1.2)$$

La bondad de ajuste se evaluó a partir del coeficiente de correlación ajustado ( $R^2_{\text{adj}}$ ) y la raíz del error cuadrático medio ( $RMSE$ ) (Ly-Nguyen et al., 2003), descritos por las ecuaciones (1.3) y (1.4), respectivamente.

$$R^2_{\text{adj}} = 1 - \frac{(n-1) \left( 1 - \frac{SQQ_{\text{regression}}}{SQQ_{\text{total}}} \right)}{(n-p)} \quad (1.3)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{SQQ_{\text{residual}}}{(n-p)}} \quad (1.4)$$

donde  $n$  es el número de observaciones,  $SQQ$  es la suma de cuadrados, y  $p$  es el número de parámetros en el modelo.

La capacidad de predicción del modelo experimental basado en la ecuación modificada de Gompertz (ecuación (1.1)) se determinó mediante el cálculo del factor de ajuste ( $A_f$ ), el cual es el valor absoluto de la relación entre las predicciones y los datos observados (ecuación (1.5)), y el factor de exactitud ( $B_f$ ), que representa el promedio general de la relación entre las predicciones y los datos observados (ecuación (1.6)) (Ross, 1996), usando un grupo de datos no utilizados en la modelización.

$$A_f = 10^{\frac{1}{n} \left| \sum \text{Log}_{10} \left( \frac{X_p}{X_o} \right) \right|} \quad (1.5)$$

$$B_f = 10^{\frac{1}{n} \sum \text{Log}_{10} \left( \frac{X_p}{X_o} \right)} \quad (1.6)$$

donde  $n$  es el número total de observaciones,  $X_p$  es el valor predicho, y  $X_o$  es el valor observado.

#### **1.4.6 Análisis microbiológico y fisicoquímico.**

Para los estudios del efecto de los tratamientos térmicos moderados sobre la calidad microbiológica y propiedades fisicoquímicas de la pulpa de guanábana, se seleccionaron las temperaturas y tiempos de exposición que cumplieron con el criterio microbiológico 5- $\log_{10}$  del microorganismo en estudio; criterio establecido por la FDA (2004) para productos pasteurizados. Para hacer esto, 200 mL de pulpa se colocaron en frascos de vidrio estériles y se sumergieron en un baño de agua en recirculación (Tempstir<sub>tm</sub>, Precision Scientific Company, Tamil Nadu, India), y se sometieron a los tratamientos térmicos seleccionados. Posteriormente, los frascos se retiraron e inmediatamente se enfriaron en un baño de agua con hielo. La pulpa no tratada se usó como control.

##### **1.4.6.1 Análisis microbiológico.**

Después de cada tratamiento térmico, las muestras de pulpa se analizaron para el recuento de hongos y levaduras, coliformes totales, mesófilos aerobios y *E. coli*, mediante el método de vertido en placa. Las muestras se diluyeron en serie con agua de peptona estéril al 0.1% (PW, BD/Difco Laboratories, Sparks, Md., USA.) y alícuotas de 0.1 mL de la solución diluida se colocó en placas, en duplicado, vertiendo agar de papa dextrosa (PDA agar, BD/Difco Laboratories, Sparks, Md., USA.) para el conteo de hongos y levaduras; agar bilis rojo violeta (RBVA agar, BD/Difco Laboratories, Sparks, Md., USA.) para coliformes totales; agar nutriente (NA agar, BD/Difco Laboratories, Sparks, Md., USA.) para mesófilos aerobios; y agar de triptona bilis X-glucorónido (TBX agar, Sigma-Aldrich) para *E. coli*. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h para

mesófilos aerobios, coliformes totales y *E.coli*, y a 25 °C durante 5 días para hongos y levaduras. Posteriormente, se hizo el conteo (UFC mL<sup>-1</sup>). Los análisis se repitieron tres veces en ensayos separados.

#### 1.4.6.2 Medición de color.

Los parámetros de color,  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  se midieron en la pulpa tratada y no tratada usando un colorímetro D-25 PC2 (Hunter Lab, VA, USA). La muestra se colocó en una celda de vidrio óptico de 90 mL (Hunter Lab, VA, USA).  $L^*$  representa la luminosidad de las muestras (0 = negro a 100 = blanco) y los valores de  $a^*$  y  $b^*$  indican la variación en el tono desde verde a rojo (-60 a +60) y desde azul a amarillo (-60 a +60), respectivamente (Pinheiro et al., 2013). La diferencia total de color ( $\Delta E^*$ ) y el índice de oscurecimiento ( $BI$ ) se calcularon usando las ecuaciones (1.7) y (1.8) respectivamente (Ferrari et al., 2010).

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1.7)$$

donde  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$ , y  $\Delta b^*$ , son las diferencias entre la muestra tratada y el control en  $L^*$ ,  $a^*$ , y  $b^*$ , respectivamente.

$$BI = [100(x - 0.31)]/0.172 \quad (1.8)$$

donde  $x = (a^* + 1.75 L^*)/(5.645 L^* + a^* - 3.012 b^*)$

#### 1.4.6.3 Sólidos solubles totales, pH y acidez titulable.

Los sólidos solubles totales (TSS), pH y acidez titulable se determinaron mediante metodologías estándar (AOAC, 1990). TSS se cuantificaron usando un refractómetro (Atago PAL-1, Tokio, Japan). El pH se midió con un potenciómetro (HI 2210, Hanna Instruments, Romania, EU). La acidez titulable se determinó mediante el método de titulación con NaOH 0.1 N usando fenolftaleína como indicador.

#### **1.4.6.4 Ácido ascórbico.**

El contenido de ácido ascórbico se determinó por el método de titulación (AOAC, 2000). Tres mL de muestra se diluyeron con 30 mL de ácido oxálico 0.5 g/100 mL. Una alícuota de 5 mL se tituló usando una solución de 2,6-diclorofenol indofenol. los resultados se expresaron como mg de ácido ascórbico en 100 mL de pulpa ( $\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ ).

#### **1.4.6.5 Azúcares totales.**

Los azúcares totales ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) se cuantificaron usando el método de antrona (Witham et al., 1971). Para la extracción de azúcar, 1 mL de pulpa se mezcló con 60 mL de alcohol etílico al 99.9% (J. T. Baker) y agua (8:2 v/v). La mezcla se hirvió hasta obtener 20 mL. 1 mL del extracto se evaporó a 60 °C durante 15 min. El residuo se disolvió inmediatamente con 60 mL de agua destilada. Posteriormente, 1 mL de esta solución se mezcló con 2 mL de agua destilada y 6 mL de solución de antrona al 0.4% (0.4 g de antrona en 100 mL de ácido sulfúrico al 98.8%). Enseguida, la mezcla se colocó en agua hirviendo durante 3 min, se enfrió en un baño de agua con hielo, y se midió la absorbancia a 600 nm (Spectronic 20, Milton Roy, Houston, TX, USA) usando una mezcla de 3 mL de agua destilada y 6 mL de antrona al 0.4% como blanco. Los azúcares totales se calcularon por interpolación de los valores en una curva de calibración preparada con glucosa.

#### **1.4.6.6 Azúcares reductores.**

La extracción de azúcar se preparó como se describió en la sección previa. Los azúcares reductores se cuantificaron según lo descrito por Nelson (1944) y Somogy (1952). Para ello, 1 mL del extracto se evaporó a 60 °C durante 15 min. El residuo se disolvió inmediatamente con 60 mL de agua destilada. Luego, 1 mL de esta solución se mezcló con 1 mL del reactivo Nelson-Somogy. Este reactivo se preparó mezclando carbonato de sodio anhidro al 2.5%, tartrato de sodio y potasio al 2.5%, bicarbonato de sodio al 2%, sulfato de sodio anhidro al 2% y sulfato de cobre al 15%.

Posteriormente, la mezcla se colocó en agua a 80 °C durante 15 min, se enfrió con agua y hielo, y enseguida se adicionó 1 mL del reactivo de arseniomolibdato (molibdato de amonio al 5.5%, arseniato de sodio al 12% y ácido sulfúrico al 98.8%). De inmediato, se agregaron 7 mL de agua destilada y se midió la absorbancia a 540 nm (Spectronic 20, Milton Roy, Houston, TX, USA) usando una mezcla de 8 mL de agua destilada, 1 mL del reactivo Nelson-Somogy y 1 mL del reactivo de arseniomolibdato como un blanco. Los azúcares reductores se calcularon por interpolación de los valores en una curva de calibración preparada con glucosa. Los resultados se expresaron como mg de glucosa en 1 mL de pulpa ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).

#### **1.4.6.7 Contenido de fenoles totales.**

El contenido de fenoles totales (TPC) se determinó de acuerdo al método descrito por Waterhouse (2002), con algunas modificaciones. Para ello, 1 mL de pulpa de guanábana se mezcló con 10 mL de metanol-agua (8:2 v/v) y se dejó reposar durante 24 h. Enseguida, 200  $\mu\text{L}$  del extracto se mezclaron con 1.5 mL de agua destilada y 0.1 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (1:1 (v/v)). Después de 3 min, se añadieron 0.2 mL de una solución de carbonato de sodio (20% (w/v)). La mezcla se revolvió y se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad por 1 h. La absorbancia se midió a 765 nm usando un espectrofotómetro (Spectronic® Genesys™ 5, Spectronic Instruments Inc., Rochester, NY, USA). El TPC se calculó por interpolación de los valores en una curva de calibración preparada con ácido gálico. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (GAE) en 100 mL de pulpa ( $\text{mg GAE } 100 \text{ mL}^{-1}$ ).

#### **1.4.7 Análisis estadístico.**

El análisis de varianza (ANOVA) se usó para evaluar los efectos de la intensidad de temperatura y tiempo en la pulpa de guanábana utilizando  $n = 3$  para los estudios en la inactivación de *L. monocytogenes* y  $n = 5$  para las determinaciones fisicoquímicas (color, pH, acidez titulable,

TSS, ácido ascórbico, azúcares totales, azúcares reductores y TPC) en cada tratamiento 5-Log<sub>10</sub>. La prueba de múltiples rangos (MRT) y la distribución de Fisher (LSD) se calcularon para comparar los tratamientos ( $p < 0.05$ ) y contraste de igualdad de varianzas. Los análisis estadísticos se hicieron usando el software Statgraphics Centurion XV (Statpoint Technologies Inc, Warrenton, VA, USA), y los ajustes del modelo matemático con el programa GraphPad PRISM (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

## 1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 1.5.1 Inactivación de *L. monocytogenes*.

Curvas de sobrevivencia se obtuvieron graficando el logaritmo de la fracción sobreviviente de células de *L. monocytogenes* inoculadas en la pulpa de guanábana después de las temperaturas aplicadas (50.0, 52.5, 55.0, 57.5 y 60.0 °C) y tiempos de exposición (0–60 min) (Figura 1.1), donde se observó que el aumento de la temperatura condujo a una disminución de la fracción sobreviviente del microorganismo en tiempos cada vez más cortos. De acuerdo al criterio de seguridad dado por la FDA (2004) y la NACMCF (2006) para productos pasteurizados, reducciones 5-log<sub>10</sub> de *L. monocytogenes* en pulpa de guanábana se lograron a: 1) 50.0 °C, 60 min (Figura 1.1(a)); 2) 52.5 °C, 16 min (Figura 1.1(b)); 3) 55.0 °C, 10 min (Figura 1.1(c)); 4) 57.5 °C, 5 min (Figura 1.1(d)); and 5) 60.0 °C, 1.25 min (Figura 1.1(e)). Algunos autores han demostrado la efectividad de tratamientos térmicos moderados para inactivar *L. monocytogenes* en diferentes sustratos de frutas. Benlloch-Tinoco et al. (2014) encontraron que para lograr una reducción de 5-log<sub>10</sub> de *L. monocytogenes* en puré de kiwi (pH = 3.39) al someterlo a 55 °C, se requirieron tiempos superiores a 5.92 min. Siguemoto et al. (2018) reportaron que el criterio de seguridad dado por la FDA (reducción 5-log<sub>10</sub>) y la NACMCF (2006) se cumplió con un tratamiento térmico a 55 °C durante 180 s (3 min) en jugo de manzana (pH = 3.5). Además, Hassani et al. (2005) reportaron

que  $5\text{-log}_{10}$  de *L. monocytogenes* fueron inactivados en un medio de referencia ( $\text{pH} = 4$ ) cuando este se sometió a  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1.4 min. Al respecto, se ha reportado que la destrucción de los microorganismos mediante tratamiento térmico puede ser afectada no solo por la temperatura sino también por las características del sustrato, por ejemplo, el  $\text{pH}$ , la actividad del agua o la presencia de conservantes químicos (Mañas et al., 2003; Murphy et al., 2002; Peleg and Cole, 1998;).

Los estudios sobre la inactivación térmica de microorganismos por el método capilar se han reportado como un procedimiento preciso para medir la resistencia al calor con la ventaja de que los tiempos necesarios para alcanzar las temperaturas de tratamiento (come-up time) son más cortos en comparación con otros métodos que podrían reducir el tiempo lag térmico, y el uso de volúmenes más bajos de suspensiones con alta concentración del microorganismo. Mediante este método, se han observado comportamientos tanto lineales como no lineales en las curvas de sobrevivencia atribuidos a las diferencias, por ejemplo, en la composición de sustratos alimentarios ( $\text{pH}$ , contenido sólido, actividad del agua, entre otros), cepa utilizada, rango de temperatura y método de calentamiento (Fernández et al., 1999; Fujikawa et al., 2000, 2001; Vega et al., 2016). En el caso del comportamiento de inactivación lineal, Fairchild y Foegeding (1993) estudiaron la resistencia al calor de *L. monocytogenes* y *L. innocua* M1 en leche descremada; los valores  $D$  se determinaron en un rango de 38.5 s a  $61.8\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta 1.4 s a  $69.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y valores  $z$  de  $5.5$  y  $5.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Las resistencias térmicas fueron similares entre ellos y los hombros no se observaron en las curvas de sobrevivencia. En el caso de un comportamiento no lineal, desviaciones de la linealidad se han observado frecuentemente en los estudios de inactivación térmica de microorganismos tales como curvas con hombros y/o colas. Linton et al. (1996) explicaron que una región del hombro puede ser más pronunciada en los sistemas alimentarios con alto contenido de  $\text{NaCl}$  o  $\text{pH}$  casi neutro. Por lo tanto, un aumento de la temperatura, o una



reducción del pH o NaCl a bajas temperaturas podrían ser estrategias adecuadas para disminuir los hombros asociados con las curvas de sobrevivencia. En las curvas de inactivación obtenidas (Figura 1.1), los hombros fueron más cortos a temperaturas más altas. Garre et al. (2017), Geeraerd et al. (2005) y Mossel et al. (1995) describieron el efecto del hombro bajo la hipótesis de la presencia de una sustancia teórica  $C_c$  alrededor o en cada célula, que inhibe la inactivación microbiana; además, esta sustancia teórica se destruye gradualmente. Por otra parte, la generación de proteínas de choque térmico en las células microbianas durante el calentamiento podría estar relacionada con la formación de colas, que posiblemente sea el efecto de una subpoblación termo-resistente (Fujikawa et al., 2001). Vega et al. (2016) estudiaron las curvas de inactivación isotérmica de *L. innocua* CECT 910 en una bebida vegetal por el método capilar donde las células fueron expuestas a tres niveles de pH (4.25, 4.75 y 5.20), cuatro niveles de temperatura (50, 55, 60, 65 °C) y diferentes tiempos de exposición (0–75 min). La ecuación modificada de Gompertz proporcionó la mejor bondad de ajuste para describir las curvas de sobrevivencia no lineales con hombros y colas, y la temperatura y el tiempo fueron los factores más influyentes que afectaron la carga microbiana final en el caso del nivel de temperatura más alto (65 °C), y el tiempo en el caso del nivel de temperatura más bajo (50 °C) probado. Fujikawa et al. (2000, 2001) estudiaron la inactivación térmica de las esporas de *Aspergillus niger* a temperaturas que variaron de 55 a 66 °C mediante el método capilar, y reportaron curvas de inactivación con hombro, declive lineal rápido y/o cola inclinada. Los autores indicaron que los hombros fueron más cortos a temperaturas más altas, y la región de la cola descrita como pendiente, dependió de la temperatura.

### **1.5.2 Ajuste del modelo matemático.**

La Figura 1.1 muestra que las curvas de inactivación de *L. monocytogenes* en pulpa de guanábana tratada térmicamente se desviaron notoriamente de la linealidad, presentando un

comportamiento de tipo sigmoidal. Por ende, las curvas de inactivación se ajustaron mediante el modelo no lineal ecuación modificada de Gompertz (ecuación (1.1)), versátil para el ajuste de curvas de inactivación no lineales (Saucedo-Reyes et al., 2017; Vega et al., 2016). La ecuación modificada de Gompertz puede ser usada para modelar curvas de sobrevivencia de tipo sigmoidal de *L. monocytogenes* inoculada en productos alimenticios pasteurizados térmicamente (Linton et al., 1995, 1996). En estudios térmicos, es probable que la ecuación modificada de Gompertz proporcione una estimación más precisa de la resistencia de un microorganismo que el modelo de primer orden (Bhaduri et al., 1991).

Existen evidencias suficientes sobre la termoresistencia de *L. monocytogenes* en diferentes sustratos. Algunos autores han encontrado curvas de sobrevivencia no lineales, y la distribución de Weibull (Char et al., 2010; Fernández et al., 2007; Siguemoto et al., 2018), la ecuación modificada de Gompertz (Chhabra et al., 1999; Huang, 2009; Linton et al., 1995, 1996), y otras funciones no lineales (Cole et al., 1993; Xiong et al., 1999), han demostrado que se ajustan a las curvas de sobrevivencia de *L. monocytogenes* de manera adecuada. Otros estudios han reportado que cuando las curvas de sobrevivencia tienen una tendencia lineal, una cinética de primer orden sigue siendo la forma más utilizada para describir el comportamiento cinético bajo tratamiento térmico (Awuah et al., 2007; Hassani et al., 2005).

Algunas aplicaciones computacionales usadas para los procedimientos de regresión en la inactivación térmica de *Listeria* spp., donde una región de “hombro” y/o “cola” han sido ampliamente reportados con una bondad de ajuste aceptable son: SAS (Statistical Analysis System) en Stephens et al. (1994), JMP (Statistical Analytical Systems, Cary, NC) en Linton et al. (1995, 1996), el paquete SPSS 6.1.2 en Xiong et al. (1990), GraphPad PRISM en Hassani et al. (2005), el lenguaje de programación FORTRAN 77 (Fortran 5.1, Microsoft Corporation ®, 1990)

en Gil et al. (2006), Statistica © 6.0 (Statsoft, USA) y Microsoft® Excel 2000 (Microsoft Corporation, USA) en Miller et al. (2009), la herramienta GInaFit y Statgraphics Centurion XV (Statpoint Inc.) en Vega et al. (2009). Bioinactivation FE es un software reciente propuesto por Garre et al. (2017, 2018a, 2018b, 2018c, 2018d, 2019) que también puede ser usado para modelar inactivación microbiana bajo condiciones dinámicas o isotérmicas y para predicciones. Este software es una aplicación web fácil de usar para usuarios sin experiencia en programación y donde están disponibles modelos matemáticos lineales y no lineales, y se puede desarrollar la discriminación entre estos.

En este estudio, el programa GraphPad PRISM fue efectivo para el ajuste del modelo modificado de Gompertz (ecuación (1.1)) a los datos cinéticos de inactivación. Usando  $R^2_{adj}$  y RMSE como criterio para determinar la bondad de ajuste, la ecuación modificada de Gompertz fue apropiada para representar los datos de inactivación térmica como lo muestran los valores altos de  $R^2_{adj}$  obtenidos, que oscilan entre 99.2 y 99.9%, y los valores bajos de RMSE (Cuadro 1.1). Por su parte, Xiong et al. (1999) reportaron que el ajuste del modelo modificado de Gompertz fue apropiado para describir curvas no lineales al modelar la inactivación térmica (50–60 °C) de *L. monocytogenes* Scott A en fórmula infantil.

Así mismo, mediante el ajuste de la ecuación modificada de Gompertz a los datos experimentales, se obtuvieron los parámetros  $C$ ,  $B$  y  $M$  (Cuadro 1.1). El parámetro  $C$  superó las cinco reducciones del ciclo logarítmico en todas las condiciones ensayadas, lo que sugiere que los tratamientos ensayados fueron efectivos para disminuir significativamente las células de *L. monocytogenes* en la pulpa de guanábana. El Cuadro 1.1 muestra que los parámetros  $C$  y  $B$  aumentaron, mientras que el parámetro  $M$  disminuyó significativamente al incrementar la temperatura. Los parámetros  $C$  y  $B$  se usaron para calcular la velocidad máxima de muerte

(ecuación (1.2)). Los valores de la velocidad máxima de muerte ( $\mu_{max}$ ) obtenidos (Cuadro 1.1) incrementaron a medida que se aumentó la temperatura de calentamiento, lo que sugiere que, al aumentar la temperatura, la población microbiana murió más rápidamente. Linton et al. (1996) evaluaron la resistencia al calor de *L. monocytogenes* en fórmulas infantiles a 50, 55 y 60 °C; valores de pH de 5.0, 6.0 y 7.0; y concentración de NaCl de 0%, 2% y 4%; y encontraron que a medida que la temperatura de calentamiento aumentaba de 50 °C a 60 °C, la muerte de las células microbianas se aceleraba, generando curvas de sobrevivencia con o sin regiones escasas de hombros o colas.

En los tratamientos por calor, la determinación del parámetro cinético secundario ( $z_T$ ) indica el incremento de temperatura necesaria para disminuir un ciclo logarítmico el valor del parámetro cinético primario.  $Z_T$  puede ser calculado como el valor inverso del gradiente para la relación lineal entre el logaritmo decimal del parámetro cinético primario y la temperatura aplicada. Por lo tanto, con la relación lineal del logaritmo decimal de cada parámetro estimado,  $C$ ,  $B$ ,  $M$ , and  $\mu_{max}$ , frente a la temperatura, Figura 2.2 (a) a (d), respectivamente, se determinaron los modelos secundarios (ecuaciones (1.8) a (1.11)) y el valor  $z_T$  para cada parámetro (Cuadro 1.2). Los coeficientes de determinación obtenidos por cada relación lineal fueron representativos en un nivel de confianza del 95%.

De acuerdo con la Figura 2.2, se pudo observar un efecto positivo de la temperatura en los parámetros  $\mu_{max}$ ,  $C$ , y  $B$ , y un efecto negativo en el parámetro  $M$ . El parámetro  $C$  mostró el valor  $z_T$  más alto de 209.083 °C debido a que el valor de la pendiente de la línea es pequeño en comparación con los otros valores (Cuadro 1.2). Por otro lado, en el caso de los parámetros  $\mu_{max}$ ,  $B$  y  $M$ , cuanto más pronunciada sea la línea, mayor será la pendiente y los valores  $z_T$  más bajos (Cuadro 1.2). Particularmente en el parámetro  $C$ , Linton et al. (1996) observaron que este valor se

aproximaba al valor de la fracción de sobrevivencia logarítmica cuando la curva de sobrevivencia comenzó a formar una región de colas, y representaba un área de la curva de sobrevivencia que se caracterizó por una disminución sustancial en la velocidad de muerte. Los valores del parámetro  $C$  determinados en este estudio fueron desde  $5.197 \pm 0.016$  a  $5.826 \pm 0.21$  (Cuadro 1.1), indicando que las curvas comenzaron a formar una cola en esos valores. Miller et al. (2009) estudiaron el efecto de los tratamientos térmicos (52.5–65 °C) sobre cepas de *L. innocua* (10528 y 2030c) en cultivo de caldo y dos fases de crecimiento (exponencial y estacionaria), y se utilizó el modelo de Gompertz y se determinó la influencia de la temperatura, fase de crecimiento y cepa de cultivo en los parámetros cinéticos. Como resultado, se observaron diferencias en los valores  $z$  influenciadas principalmente por la temperatura y los factores de fase de crecimiento; temperaturas más altas implicaron períodos de hombro estrechos, velocidades de inactivación más altas y una cola más evidente debido a una población residual probablemente resistente al calor. Vega et al. (2016), mediante una regresión lineal del logaritmo decimal del parámetro cinético primario ( $\mu_{\max}$ ) versus temperatura aplicada, determinaron un valor  $z_T$  de 7.11 °C.

### **1.5.3 Validación del modelo.**

La validación del modelo matemático experimental basado en la ecuación modificada de Gompertz y la integración las ecuaciones (1.8) a (1.11) (Cuadro 1.2) a la ecuación (1.1) se llevó a cabo mediante el cálculo del factor de ajuste ( $A_f$ ) (ecuación (1.5)), y el factor de exactitud ( $B_f$ ) (ecuación (1.6)). El factor de ajuste ( $A_f$ ) indica por cuánto las predicciones difieren de los datos observados. Idealmente, los modelos predictivos deberían tener un  $A_f = 1$ , pero típicamente, el factor de ajuste incrementará 0.10–0.15 por cada variable en el modelo (Ross et al., 2000). El factor de exactitud ( $B_f$ ) compara las predicciones del modelo.  $B_f = 1$  significa que los datos observados son igualmente distribuidos por encima y por debajo de las predicciones produciendo

una concordancia perfecta.  $B_f < 1$  significa que el modelo sub-predice, y cuando  $B_f > 1$  indica que el modelo sobre-predice la respuesta de la inactivación bacteriana. Un valor de  $B_f$  aceptable para un modelo predictivo puede ser 0.75–1.25 (Pérez-Rodríguez y Valero, 2013). Los valores  $A_f$  y  $B_f$  obtenidos para cada nivel de temperatura se muestran en el Cuadro 1.3. El valor  $A_f$  para la temperatura de 57.5 °C fue el más elevado, pero se encontró dentro del rango aceptable. Para la misma temperatura, de 57.5 °C, el valor  $B_f$  obtenido sobre-predijo la respuesta de la inactivación bacteriana; sin embargo, el valor  $B_f$  promedio fue cercano a 1. En este sentido, el modelo de Gompertz podría ser aceptable para predecir el comportamiento de *L. monocytogenes* inoculada en pulpa de guanábana tratada térmicamente a 50.0, 52.5, 55.0, 57.5, y 60.0 °C.

#### **1.5.4 Calidad microbiológica y propiedades fisicoquímicas.**

##### **1.5.4.1 Calidad microbiológica.**

Los resultados obtenidos equivalieron a menos de un coliforme por mL (NOM-113-SSA1-1994) y menos de 1 UFC mL<sup>-1</sup> de *E. coli*, tanto en la pulpa de guanábana no tratada como en las muestras de pulpa sometidas a los tratamientos térmicos 5-log<sub>10</sub> (50.0 °C/60 min, 52.5 °C/16 min, 55.0 °C/10 min, 57.5 °C/5 min y 60.0 °C/1.25 min). La pulpa no tratada estuvo por debajo ( $22.25 \pm 0.58$  UFC mL<sup>-1</sup>) del límite permisible ( $\leq 100$  UFC mL<sup>-1</sup>) de mesófilos aerobios y por arriba del nivel permisible de 25 UFC mL<sup>-1</sup> de hongos y levaduras ( $86.75 \pm 4.79$  UFC mL<sup>-1</sup>) de acuerdo con las especificaciones microbiológicas para jugos y néctares pasteurizados de la norma NOM-130-SSA1-1995. No se detectaron mesófilos aerobios, hongos y levaduras en las pulpas tratadas a 52.5, 55.0, 57.5, y 60.0 °C. Sin embargo, la pulpa tratada a 50 °C/60 min contenía mesófilos aerobios ( $< 100$  UFC mL<sup>-1</sup>), y hongos y levaduras ( $< 25$  UFC mL<sup>-1</sup>). A pesar de este conteo, la pulpa sometida a 50 °C/60 min estuvo dentro del rango aceptable para mesófilos aerobios, hongos y levaduras. La NOM-130-SSA1-1995 especifica que, para jugos y néctares pasteurizados, el límite

máximo permisible de mesófilos aerobios es 100 UFC mL<sup>-1</sup> y 25 UFC mL<sup>-1</sup> de hongos y levaduras. Por lo tanto, los tratamientos térmicos aplicados a la pulpa de guanábana fueron efectivos.

#### 1.5.4.2 Color.

Los parámetros de color,  $L^*$  (luminosidad),  $a^*$  (componente rojo), y  $b^*$  (componente amarillo) de pulpa de guanábana disminuyeron ( $p < 0.05$ ) al aumentar la temperatura de calentamiento, siendo el cambio de color no dependiente de la duración del tratamiento térmico (Cuadro 1.4). Esto sugiere que, al aumentar la temperatura de calentamiento, la pulpa es menos brillante (valores  $L^*$  más bajos), que la pulpa no tratada. Además, al aumentar la temperatura de procesamiento (de 50 a 60 °C), los valores de  $BI$  fueron más bajos, lo que sugiere que la pulpa fue más transparente, como lo mencionaron Chaikham and Apichartsrangkoon (2012) cuando estudiaron las propiedades físicas y bioquímicas de zumos de longan (*Dimocarpus longan*) pasteurizados y presurizados. Chaikham et al. (2017) reportaron que la luminosidad ( $L^*$ ) disminuyó en pulpa de litchi en almíbar tratada térmicamente (90 °C, por 5 min) en comparación con la pulpa fresca. Por otra parte, Anaya-Esparza et al. (2017a) reportaron que los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  disminuyeron en néctar de guanábana termosonicado (1.4 W/mL a 51 °C por 10 min) comparado con el néctar sin tratar. Umme et al. (2001) reportaron que el amarillamiento (valores  $b^*$ ) de puré de guanábana disminuyó después de la pasteurización y que calentar el puré podría haber destruido el pigmento amarillo del puré.

Un valor más alto que 3.0 en  $\Delta E$  ha sido considerado para indicar cambios perceptibles en color (Choi et al., 2002). En este sentido, el Cuadro 1.4 muestra que todas las pulpas tratadas térmicamente tuvieron  $\Delta E > 3.0$ , excepto para pulpa tratada a 50 °C por 60 min, el cual fue  $\Delta E = 2.79$ . Esto sugiere que esta pulpa no mostró cambios notables en color.

#### **1.5.4.3 Sólidos solubles totales, pH y acidez titulable.**

Los tratamientos térmicos aplicados a la pulpa de guanábana no tuvieron efectos significativos en el contenido de TSS y en la acidez titulable; sin embargo, el pH disminuyó en las pulpas tratadas con respecto a la pulpa no tratada (Cuadro 1.5). En relación a esto, Anaya-Esparza et al. (2017b) reportaron que un néctar de guanábana pasteurizado térmicamente (65 °C/30 min) tuvo un pH de 3.6 mientras que el pH del néctar fresco no pasteurizado fue de 3.7. Por otra parte, Baskaran et al. (2016) reportaron que al pasteurizar pulpa de saramuyo (*A. squamosa*) y guanábana a 85 °C durante 20 min no hubo cambios en la acidez titulable de ambas pulpas al compararlas con la pulpa fresca. Sin embargo, ellos reportaron que el contenido de TSS en la pulpa de guanábana aumentó con el tratamiento térmico, pero la temperatura de tratamiento fue mayor que las que se aplicaron en este estudio. En otro trabajo, Hoffmann et al. (2017), reportaron que pulpa de la fruta de butiá (*Butia odorata*) pasteurizada a 100 °C durante 15 min, mostró un mayor contenido de TSS que la pulpa no pasteurizada, lo cual podría estar asociado con la evaporación del agua de la pulpa durante el tratamiento térmico.

#### **1.5.4.4 Azúcares totales, azúcares reductores y ácido ascórbico.**

El contenido de azúcares totales y azúcares reductores en la pulpa de guanábana disminuyeron con cada uno de los tratamientos térmicos aplicados a esta (Cuadro 1.5). El contenido de ácido ascórbico en la pulpa sin tratar fue de 0.82 mg 100 mL<sup>-1</sup>, sin cambios significativos en las pulpas sometidas a 50.0 °C/60 min y 52.5 °C/16 min, pero con disminución significativa en las pulpas sometidas a 55.0 °C/10 min; 57.5 °C/5 min, y 60.0 °C/1.25 min, con valores determinados de 0.57 mg 100 mL<sup>-1</sup>, 0.49 mg 100 mL<sup>-1</sup>, y 0.45 mg 100 mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Baskaran et al. (2016) mencionaron que los azúcares totales y el contenido de ácido ascórbico disminuyeron en pulpa de *Annona. squamosa* al pasteurizarla a 85 °C durante 20 min. Anaya-Esparza et al. (2017b)



reportaron 50% de pérdidas de ácido ascórbico en néctar de guanábana pasteurizado a 65 °C durante 30 min, en comparación con el néctar fresco. En este estudio, la pulpa de guanábana perdió 45% de ácido ascórbico cuando se sometió a 60 °C /1.25 min. El ácido ascórbico es altamente termolábil y se degrada fácilmente con la aplicación de calor (Igual et al., 2010; Rawson et al., 2011).

#### **1.5.4.5 Contenido de fenoles totales.**

El TPC en la pulpa de guanábana no tratada fue de 37.72 mg GAE 100 mL<sup>-1</sup> (Cuadro 1.5). La pulpa tratada térmicamente a 50.0 °C/60 min no mostró cambios en el TPC, con respecto a la pulpa no tratada. El TPC disminuyó cuando la pulpa se sometió a 52.5 °C/16 min, 55.0 °C/10 min, 57.5°C/5 min, y 60.0 °C/1.25 min. El descenso en TPC podría deberse a la oxidación y polimerización de los compuestos fenólicos durante el procesamiento con calor (Tembo et al., 2017; Wang et al., 2000). Además, el método de cocción, el tiempo y la temperatura pueden influir en la estabilidad de los compuestos (Rickman et al., 2007). Hoffmann et al. (2017) evaluaron el impacto de un tratamiento térmico (100 °C/15 min) en pulpa de fruta de butiá (*Butia odorata*) y observaron una reducción del 5% en TPC después del procesamiento térmico. En puré de fresa, el procesamiento térmico (88 °C/2 min) redujo el TPC hasta un 24% (Terefe et al., 2013).

### **1.6 CONCLUSIONES.**

Reducciones 5-log<sub>10</sub> de *L. monocytogenes* en pulpa de guanábana se lograron a 50.0 °C/60 min, 52.5 °C/16 min, 55.0 °C/10 min, 57.5 °C/5 min y 60.0°C/1.25 min cumpliendo con el criterio de seguridad dado por la FDA (reducción 5-log<sub>10</sub>). Además, los resultados obtenidos a partir de los tratamientos térmicos 5-log<sub>10</sub> aplicados a la pulpa de guanábana indicaron que la pulpa mostró cambios en los parámetros de color y hubo una disminución en azúcares totales, azúcares reductores, ácido ascórbico, TPC, y pH. Las pulpas tratadas a 50.0 °C/60 min y 52.5 °C/16 min no

mostraron cambios significativos en contenido de ácido ascórbico con respecto al control. En adición, la pulpa sometida a 50.0 °C/60 min no mostró cambios significativos en TPC. Estos tratamientos térmicos podrían ser una opción para el procesamiento térmico de pulpa de guanábana sin afectar significativamente el contenido de ácido ascórbico y TPC. Además, ambos tratamientos resultaron ser seguros microbiológicamente.

### **1.7 AGRADECIMIENTOS.**

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca doctoral (243568) otorgada a A. Velasco-Hernández y al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México, por financiar la presente investigación. A Christian E. Aceves Ruiz del Centro de Idiomas del Colegio de Postgraduados por la traducción del artículo original al idioma Inglés.

### **1.8 REFERENCIAS.**

- Anaya-Esparza LM, Velázquez-Estrada RM, Sayago-Ayerdi SG, Sánchez-Burgos JA, Ramírez-Mares MV, García-Magaña ML And Montalvo-González E. (2017b). Effect of thermosonication on polyphenol oxidase inactivation and quality parameters of soursop néctar. *Food Science and Technology* 75: 545–551.
- Anaya-Esparza LM., Méndez-Robles MD., Sayago-Ayerdi SG., García-Magaña ML, Ramírez-Mares MV., Sánchez-Burgos JA and Montalvo-González E. (2017a) Effect of thermosonication on pathogenic bacteria, quality attributes and stability of soursop nectar during cold storage. *Journal of Food* 15(4): 592–600.
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). (1990). *Officials Methods of Analysis*, 15th ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemist.

- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). (2000). *Vitamins and Other Nutrients, Official Methods of Analysis*. 17th ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemist.
- Awuah GB, Ramaswamy H and Economides A. (2007). Thermal processing and quality: Principles and overview. *Chemical Engineering and Processing* 46: 584–602.
- Baskaran R, Ravi R and Rajarathnam S. (2016). Thermal processing alters the chemical quality and sensory characteristics of sweetsop (*Annona squamosa* L.) and soursop (*Annona muricata* L.) pulp and néctar. *Journal of Food Science* 81: 182–188.
- Benlloch-Tinoco M, Pina-Pérez MC, Martínez-Navarrete N and Rodrigo D. (2014). *Listeria monocytogenes* inactivation kinetics under microwave and conventional thermal processing in a kiwifruit puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 22: 131–136.
- Bhaduri S, Smith PW, Palumbo SA, Turner-Jones CO, Smith JL, Marmer BS, Buchanan RL, Zaika LL and Williams AC. (1991). Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in liver sausage slurry. *Food Microbiology* 8: 75–78.
- Caggia C, Scifò GO, Restuccia C and Randazzo CL. (2009). Growth of acid-adapted *Listeria monocytogenes* in orange juice and in minimally processed orange slices. *Food Control* 20: 59–66.
- Carpentier B and Cerf O. (2011). Review-Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology* 145: 1–8.
- Chaikham P and Apichartsrangkoon A. (2012). Comparison of dynamic viscoelastic and physicochemical properties of pressurised and pasteurised longan juices with xanthan addition. *Food Chemistry* 134(4): 2194–2200.

- Chaikham P, Rattanasena P, Phunchaisri C and Sudsanor P. (2017). Quality changes of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) in syrup due to thermal and high pressure processes. *Food Science and Technology* 75: 751–760.
- Char CD, Guerrero SN and Alzamora SM. (2010). Mild thermal process combined with vanillin plus citral to help shorten the inactivation time for *Listeria innocua* in orange juice. *Food and Bioprocess Technology* 3:752–761.
- Chhabra AT, Carter WH, Linton RH and Cousin MA. (1999). A predictive model to determine the effects of pH, milkfat, and temperature on thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 62: 1143–1149.
- Choi M, Kim G and Lee H. (2002). Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. *Food Research International* 35: 753–759.
- Cole MB, Davies KW, Munro G, Holyoak CD and Kilsby DC. (1993). A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Industrial Microbiology* 12: 232–239.
- Dalgaard P. (2000). Fresh and lightly preserved seafood. In: Man CMD and Jones AA (eds). *Shelf Life Evaluation of Foods*. 2nd Edition. Maryland: Aspen Publisher Inc, pp. 110–139.
- Dalgaard P. (2002). Modeling and prediction the self-life of seafood. In: Bremmer HA (ed). *Safety and Quality Issues in Fish Processing*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, pp. 191–219.
- De Oliveira ES, Tombini L, Tondo EC. (2018). Foodborne outbreaks in Brazil associated with fruits and vegetables: 2008-2014. *Food Quality and Safety* 2(4): 173–181.

- Fairchild TM and Foegeding PM. (1993). A Proposed Nonpathogenic Biological Indicator for Thermal Inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 59(4): 1247–1250.
- Fernández A, López M, Bernardo A, Condón S and Raso J. (2007). Modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in sucrose solutions of various water activities. *Food Microbiology* 24: 372–379.
- Fernández A, Salmerón C, Fernández PS and Martínez A. (1999). Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strains of *Bacillus cereus*. *Trends in Food Science & Technology* 10:158–162.
- Ferrari G, Maresca P and Ciccarone R. (2010). The application of high hydrostatic pressure for the stabilization of functional foods: Pomegranate juice. *Journal of Food Engineering* 100(2): 245–253.
- Ferreira V, Wiedmann M, Teixeira P and Stasiewicz MJ. (2014). Review-*Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of Food Protection* 77: 150–170.
- Food and Drug Administration (FDA), Center for Food Safety and Applied Nutrition, United States (FDA/CFSAN, US). (2004). Juice HACCP hazards and controls guidance. Guidance for industry. 1st ed. Available at: [www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ucm072557.htm](http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ucm072557.htm) (accessed 24 November 2018).
- Francis J and Bellot C. (2003). Tropical Fruits Newsletter. Special Issue Number 44/45. Inter-American Institute for Cooperation on Agriculture, IICA Office, Port-of-Spain, Trinidad and Tobago.

- Fujikawa H, Morozumi S, Smegare GH, and Teixeira AA. (2000). Comparison of Capillary and Test Tube Procedures for Analysis of Thermal Inactivation Kinetics of Mold Spores. *Journal of Food Protection* 63(10): 1404–1409.
- Fujikawa H, Morozumi S, Smegare GH, and Teixeira AA. (2001). Thermal Inactivation Patterns of *Aspergillus niger* Spores in Capillaries. *Biocontrol Science* 6(1): 17–20.
- Garre A, Clemente-Carazo M, Fernández PS, Lindqvist R, Egea JA (2018a). Bioinactivation FE: A free web application for modelling isothermal and dynamic microbial inactivation. *Food Research International* 112: 353–360.
- Garre A, Egea JA, Iguaz A, Palop A, and Fernández PS. (2018b). Relevance of the induced stress resistance when identifying the critical microorganism for microbial risk assessment. *Frontiers in Microbiology* 9: 1663.
- Garre A, Fernández PS, Lindqvist R, Egea JA. (2017). Bioinactivation: software for modelling dynamic microbial inactivation. *Food Research International* 93: 66–74.
- Garre A, González-Tejedor G, Aznar A, Fernández PS, Egea JA. (2019). Mathematical modelling of the stress resistance induced in *Listeria monocytogenes* during dynamic, mild heat treatments. *Food Microbiology* 84: 103238.
- Garre A, González-Tejedor G, Peñalver-Soto JL, Fernández PS, Egea JA. (2018c). Optimal characterization of thermal microbial inactivation simulating non-isothermal processes. *Food Research International* 107: 267–274.
- Garre A, Huertas JP, González-Tejedor GA, Fernández PS, Egea JA, Palop A, Esnoz A. (2018d). Mathematical quantification of the induced stress resistance of microbial populations during non-isothermal stresses. *International Journal of Food Microbiology* 266: 133–141.

- Geeraerd AH, Valdramidis VP, Van Impe JF. (2005). GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology* 102: 95–105.
- Gil MM, Brandão TRS, Silva CLM. (2006). A modified Gompertz model to predict microbial inactivation under time-varying temperature conditions. *Journal of Food Engineering* 76: 89–94.
- Hassani M, Álvarez I, Raso J, Condón S and Pagán R. (2005). Comparing predicting models for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* at different pH. *International Journal of Food Microbiology* 100: 213–222.
- Hoffmann JF, Zandoná GP, Silveira SP, Müller DC, Bonemann MF, Valmor RC and Clasen CF. (2017). Stability of bioactive compounds in butiá (*Butia odorata*) fruit pulp and nectar. *Food Chemistry* 237: 638–644.
- Huang L. (2009). Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in ground beef under isothermal and dynamic temperature conditions. *Journal of Food Engineering* 90: 380–387.
- Igual M, García-Martínez E, Camacho MM and Martínez-Navarrete N. (2010). Effect of thermal treatment and storage on the stability of organic acids and the functional value of grapefruit juice. *Food Chemistry* 118: 291–299.
- Jiménez VM, Gruschwitz M, Schweiggert RM, Carle R and Esquivel P. (2014). Identification of phenolic compounds in soursop (*Annona muricata*) pulp by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization mass spectrometric detection. *Food Research International* 65: 42-46.
- Leite JA, Luiz TF, Barbosa RF, Rabinovitch L, Quintanilla CJ, Gonsales RN, Cabral H and Pereira DEC. (2016). Bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Bacillus cereus*: Preliminary characterization and application of partially purified extract containing BLIS for

- inhibiting *Listeria monocytogenes* in pineapple pulp. *Food Science and Technology* 72: 261–266.
- Lima Tribst AA, de Souza Sant’Ana A and Rodriguez de Massaguer P. (2009). Review: Microbiological quality and safety of fruit juices—past, present and future perspectives. *Critical Reviews in Microbiology* 35(4): 310–339.
- Linton RH, Carter WH, Pierson M and Hackney CR. (1995). Use of a modified Gompertz equation to model nonlinear survival curves for *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection* 58: 946–954.
- Linton RH, Carter WH, Pierson MD, Hackney CR and Eifert JD. (1996). Use of a modified Gompertz equation to predict the effects of temperature, pH, and NaCl on the inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A heated in infant formula. *Journal of Food Protection* 59: 16–23.
- Ly-Nguyen B, Van Loey AM, Scout C, Eren Özcan S, Fachin D and Verlent I. (2003). Mild-heat and high-pressure inactivation of carrot pectin methylesterase: A kinetic study. *Journal Food Science* 68: 1377–1383.
- Mañas P, Pagán R, Alvarez I, Condón US. (2003). Survival of *Salmonella senftenberg* 775 W to current liquid whole egg pasteurization treatments. *Food Microbiology* 20: 593–600.
- Mazzotta AS. (2001). Thermal inactivation of stationary-phase and acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *Journal of Food Protection* 64: 315–320.
- McMeekin TA, Olley J, Ross T and Ratkowsky DA. (1993). Predictive microbiology: Theory and application. New York: John Wiley and Sons.



- Miller FA, Gil MM, Brandão TRS, Teixeira P, Silva CLM. (2009). Sigmoidal thermal inactivation kinetics of *Listeria innocua* in broth: Influence of strain and growth phase. *Food Control* 20: 1151–1157.
- Mossel DAA, Corry JEL, Struijk CB, Baird RM. (1995). *Essentials of the Microbiology of Foods*. John Wiley & Sons, West Sussex.
- Murphy RY, Duncan LK, Johnson ER, Davis MD, Smith JN. (2002). Thermal inactivation D- and z-values of *Salmonella* serotypes and *Listeria innocua* in chicken patties, chicken tenders, franks, beef patties, and blended beef and turkey patties. *Journal of Food Protection* 65(1): 53– 60.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF). (2006). Requisite scientific parameters for establishing equivalence of alternative methods of pasteurization. *Journal of Food Protection* 69(5): 1190–1216.
- Nelson NJA. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of the glucose. *Journal of Biological Chemistry* 153: 375–380.
- Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Secretaría de Salud, 25 Agosto 1995. Available at <https://www.sinec.gob.mx/SINEC/Vista/Normalizacion/DetalleNorma.xhtml?pidn=NTJXNkVvTUx5OFpGb2piNzU1cWRPZz09> (accessed 5 November 2019).
- Norma Oficial Mexicana NOM-130-SSA1-1995. Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierres herméticos y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Secretaría de Salud, 21 Noviembre 1997. Available at

<https://www.sinec.gob.mx/SINEC/Vista/Normalizacion/DetalleNorma.xhtml?pidn=VzVWakpMeHRZZ3dqQVhZQW1WOU5rUT09> (accessed 21 January 2019).

- Pareek S, Yahia EM, Pareek OP and Kaushik RA. (2011). Postharvest physiology and technology of *Annona* fruits. *Food Research International* 44: 1741–1751.
- Peleg M and Cole MB. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38(5): 353–380.
- Pérez-Rodríguez F and Valero A. (2013). Predictive models: Foundation, types, and development. In: Pérez-Rodríguez F and Valero A (eds). *Predictive Microbiology in Foods. SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition*. Vol. 5, New York: Springer, pp. 25–55.
- Pinheiro J, Alegria C, Abreu M, Gonçalves EM and Silva CLM. (2013). Kinetics of changes in the physical quality parameters of fresh tomato fruits (*Solanum lycopersicum*, cv. ‘Zinac’) during storage. *Journal of Food Engineering* 114: 338–345.
- Rawson A, Patras A, Tiwari BK, Noci F, Koutchma T and Brunton N. (2011). Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International* 44: 1875–1887.
- Rickman JC, Barrett DM and Bruhn CM. (2007). Nutritional comparison of fresh, frozen and canned fruits and vegetables. Part 1. Vitamins C and B and phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87(6): 930–944.
- Ross T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology* 81: 501–508.
- Ross T, Dalgaard P and Tienungoon S. (2000). Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *International Journal of Food Microbiology* 62: 231–245.

- Saucedo-Reyes D, Carrillo-Salazar JA, Román-Padilla L, Saucedo-Veloz C, Reyes-Santamaría MI, Ramírez-Gilly M, Tecante A. (2017). Modeling the pressure inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in sapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn) pulp. *Food Science and Technology International* 24(2): 117–131.
- Siguemoto ES, Wilhelms GJA, Martinez A and Rodrigo D. (2018). Inactivation kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in apple juice by microwave and conventional thermal processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 45: 84–91.
- Somogy M. (1952). Notes on sugar determinations. *Journal of Biological Chemistry* 195:19–23.
- Stephens PJ, Cole MB, and Jones MV. (1994). Effect of heating rate on the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology* 77: 702–708.
- Tembo DT, Holmes MJ and Marshall LJ. (2017). Effect of thermal treatment and storage on bioactive compounds, organic acids and antioxidant activity of baobab fruit (*Adansonia digitata*) pulp from Malawi. *Journal of Food Composition and Analysis* 58: 40–51.
- Terefe NS, Kleintschek T, Gamage T, Fanning KJ, Netzel G, Versteeg C and Netzel M. (2013). Comparative effects of thermal and high pressure processing on phenolic phytochemicals in different strawberry cultivars. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 19: 57–65.
- Umme A, Bambang SS, Salmah Y and Jamilah B. (2001). Effect of pasteurisation on sensory quality of natural soursop puree under different storage conditions. *Food Chemistry* 75: 293–301.
- Vega S, Saucedo D, Rodrigo D, Pina C, Armero C and Martinez A. (2016). Modeling the isothermal inactivation curves of *Listeria innocua* CECT 910 in a vegetable beverage under

- low-temperature treatments and different pH levels. *Food Science and Technology International* 22(6): 525–535.
- Vitas AI, Aguado V, Garcia-Jalon I. (2004). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology* 90: 349–356.
- Von Breymann J, Chaves C and Arias ML. (2013). Análisis de la calidad microbiológica y potencial presencia de *Listeria monocytogenes* en pulpas de guanábana (*Annona muricata*), mango (*Mangifera indica*) y maracuyá (*Passiflora edulis*) costarricenses. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 63: 53–57.
- Wang L, Kim D and Lee CY. (2000). Effects of heat processing and storage on flavanols and sensory qualities of green tea beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 4227–4232.
- Waterhouse AL. (2002). Determination of total phenolics, In: Wrolstad RE, Acree TE, An H, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Smith DM and Sporns P. (eds). *Current protocols in food analytical chemistry*. New-Jersey: John Wiley and Sons, Inc., pp. 11.1.1–11.1.8
- Witham HF, Blaydes DF and Devlin RM. (1971). *Experiments in Plant Physiology*. New York: Van Nostrand Reinhold C.
- Xiong R, Xie G, Edmondson AS, Linton RH and Sheard MA. (1999). Comparison of the Baranyi model with the modified Gompertz equation for modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Food Microbiology* 16: 269–279.

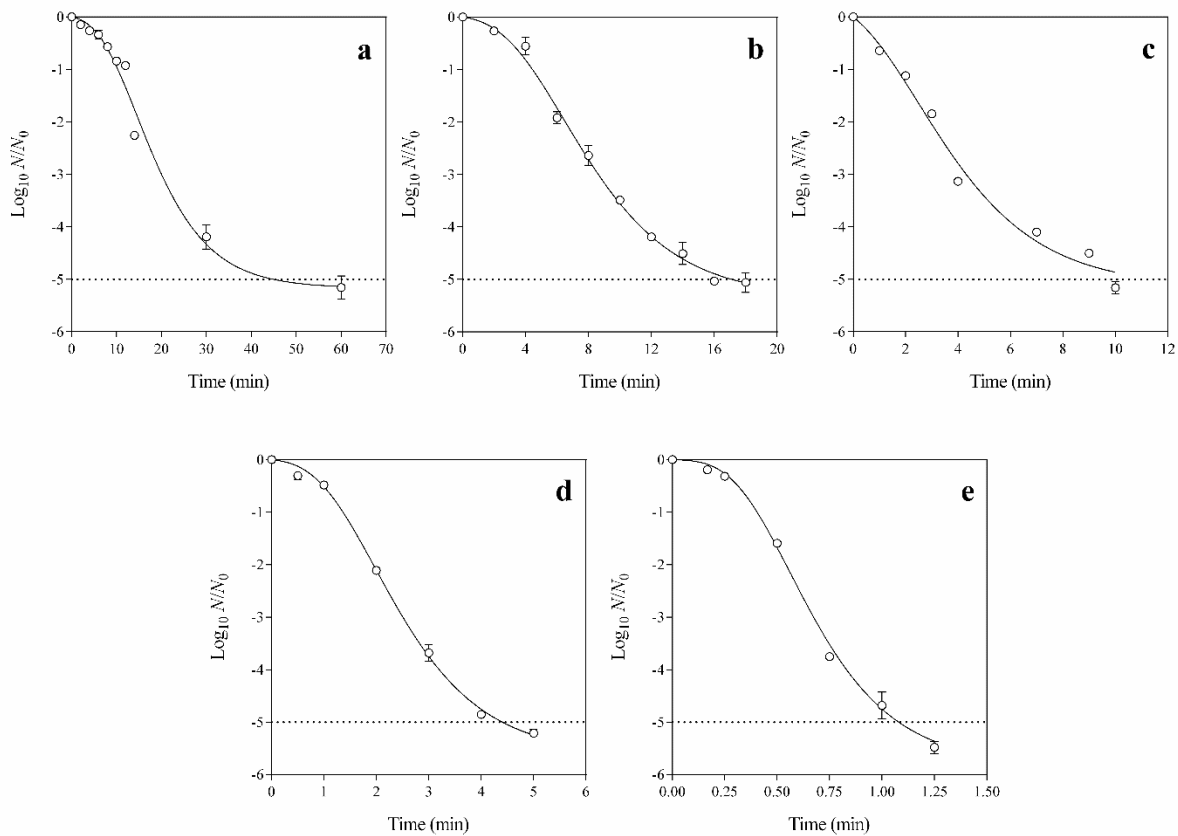


Figura 1.1 Curvas de sobrevivencia ( $\circ$ ) de *L. monocytogenes* inoculada en pulpa de guanábana tratada térmicamente a) 50.0 °C, b) 52.5 °C, c) 55.0 °C. d) 57.5 °C, e) 60.0 °C. Curvas ajustadas (—) usando la ecuación modificada de Gompertz (ecuación (1.1)). Los valores graficados y las barras del error representan la media de tres réplicas y la desviación estándar correspondiente.

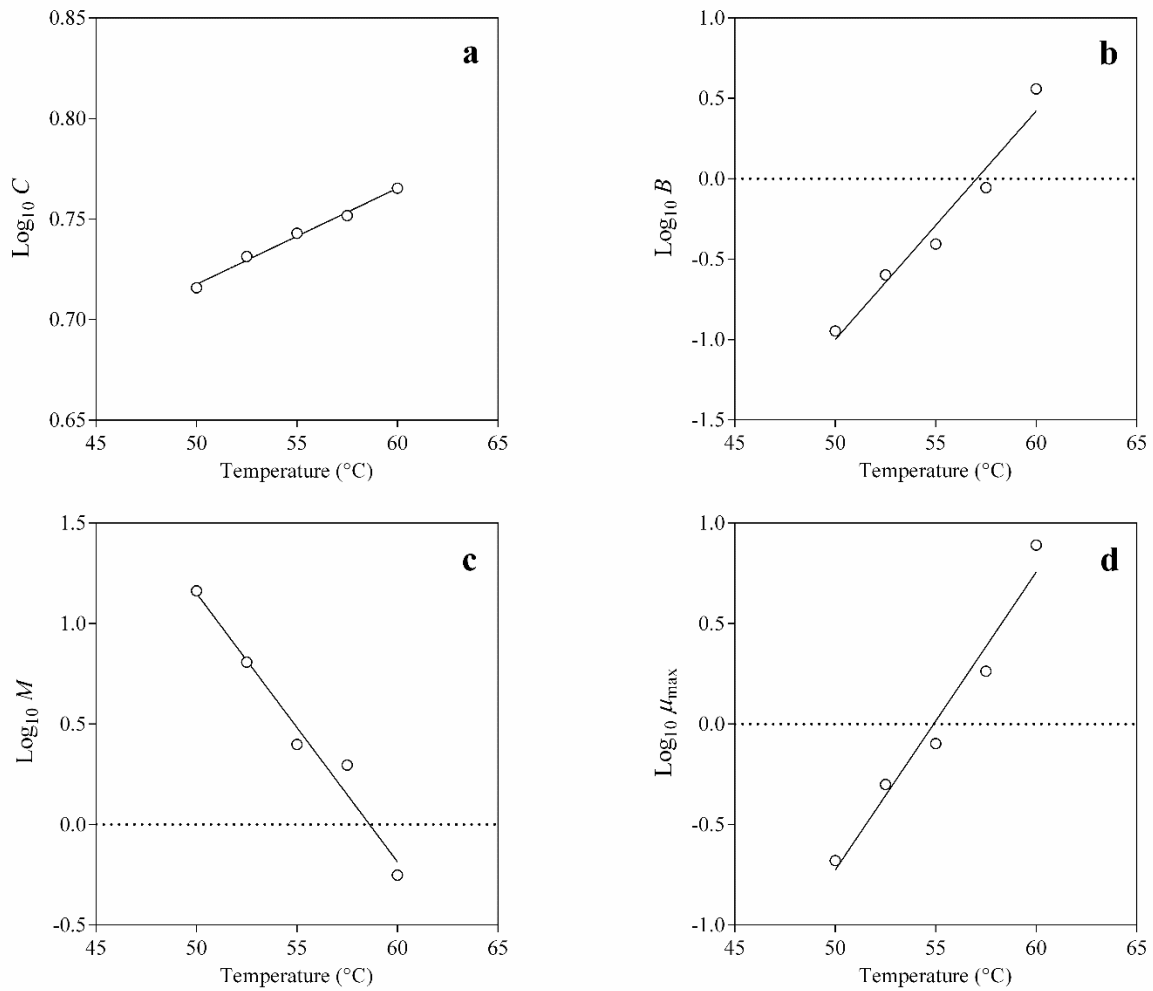


Figura 1.2 Relación entre la temperatura y los parámetros estimados de la ecuación modificada de Gompertz: a) parámetro  $C$ , b) parámetro  $B$ , c) parámetro  $M$ , d)  $\mu_{\max}$ . Los puntos ( $\circ$ ) representan los valores observados y las líneas continuas representan el ajuste del modelo.

Cuadro 1.1 Parámetros cinéticos primarios y bondad de ajuste determinados para curvas de inactivación de *L. monocytogenes* en pulpa de guanábana.

Parámetros de la ecuación modificada de Gompertz (ecuación (1.1))						
Temperatura (°C)	$C \pm sd$	$B \pm sd$	$M \pm sd$	$\mu_{\max} \pm sd$	$R^2_{adj}$	$RMSE$
	$\text{Log}_{10} (\text{CFU mL}^{-1})$	$\text{Log}_{10} (\text{CFU mL}^{-1}) \text{ min}^{-1}$	min	$\text{Log}_{10} (\text{CFU mL}^{-1}) \text{ min}^{-1}$		
50.0	$5.197 \pm 0.016$	$0.113 \pm 0.004$	$14.542 \pm 0.027$	$0.209 \pm 0.007$	0.993	0.253
52.5	$5.387 \pm 0.022$	$0.252 \pm 0.004$	$6.427 \pm 0.010$	$0.500 \pm 0.006$	0.996	0.175
55.0	$5.532 \pm 0.002$	$0.393 \pm 0.000$	$2.502 \pm 0.001$	$0.799 \pm 0.001$	0.992	0.244
57.5	$5.646 \pm 0.028$	$0.881 \pm 0.004$	$1.973 \pm 0.006$	$1.830 \pm 0.009$	0.999	0.123
60.0	$5.826 \pm 0.021$	$3.625 \pm 0.101$	$0.560 \pm 0.001$	$7.768 \pm 1.188$	0.997	0.165

*sd*, desviación estándar.

Cuadro 1.2 Modelos secundarios y valores  $z_T$  para *L. monocytogenes* en pulpa de guanábana.

Modelo secundario	$z_T$ (°C)	$R^2$	Ecuación
$\text{Log}_{10} C = 0.0048 T + 0.4784$	209.083	0.992	(1.8)
$\text{Log}_{10} B = 0.1423 T - 8.1148$	7.029	0.960	(1.9)
$\text{Log}_{10} M = -0.1337 T + 7.8332$	7.482	0.971	(1.10)
$\text{Log}_{10} \mu_{max} = 0.1482 T - 8.1347$	6.749	0.964	(1.11)

T, temperatura (°C).

Cuadro 1.3 Factor de ajuste ( $A_f$ ) y factor de exactitud ( $B_f$ ) de *L. monocytogenes* en pulpa de guanábana.

Temperatura (°C)	$A_f$	$B_f^a$
50.0	1.192	1.060
52.5	1.075	0.985
55.0	1.197	0.922
57.5	1.298	1.244
60.0	1.184	0.845
<i>Average</i>	<i>1.189</i>	<i>1.011</i>

<sup>a</sup>Los valores  $B_f$  están dentro del rango aceptable 0.75–1.25 (Dalgaard 2000, 2002; Ross et al., 2000).



Cuadro 1.4 Parámetros de color en pulpa de guanábana.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E^*$	$BI$
Control	-	39.16 <sup>a</sup>	-0.72 <sup>a</sup>	5.02 <sup>a</sup>	-	11.89 <sup>a</sup>
50.0	60	36.78 <sup>b</sup>	-1.02 <sup>a</sup>	3.82 <sup>b</sup>	2.79 <sup>a</sup>	8.54 <sup>ab</sup>
52.5	16	34.32 <sup>c</sup>	-1.00 <sup>a</sup>	3.06 <sup>bc</sup>	5.35 <sup>b</sup>	6.89 <sup>bc</sup>
55.0	10	32.70 <sup>d</sup>	-2.32 <sup>b</sup>	3.00 <sup>bc</sup>	7.06 <sup>c</sup>	4.21 <sup>cd</sup>
57.5	5.0	31.74 <sup>e</sup>	-2.44 <sup>b</sup>	2.34 <sup>c</sup>	8.10 <sup>c</sup>	1.72 <sup>d</sup>
60.0	1.25	30.60 <sup>f</sup>	-2.44 <sup>b</sup>	2.12 <sup>c</sup>	9.24 <sup>d</sup>	1.05 <sup>d</sup>

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0.05$ ). Los valores son el promedio de cinco análisis.

$L^*$ : luminosidad,  $a^*$ : componente rojo,  $b^*$ : componente amarillo,  $\Delta E$ : diferencia de color,  $BI$ : índice de oscurecimiento.

Cuadro 1.5 Determinaciones fisicoquímicas en pulpa de guanábana.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	pH	TSS (°Brix)	Acidez titulable (% ácido cítrico)	Ácido ascórbico (mg 100 mL <sup>-1</sup> )	Azúcares totales (mg mL <sup>-1</sup> )	Azúcares reductores (mg mL <sup>-1</sup> )	TPC (mg GAE * 100 mL <sup>-1</sup> )
Control	-	3.75 <sup>a</sup>	8.08 <sup>a</sup>	0.464 <sup>a</sup>	0.82 <sup>a</sup>	115.90 <sup>a</sup>	44.77 <sup>a</sup>	37.72 <sup>a</sup>
50.0	60	3.70 <sup>b</sup>	8.06 <sup>a</sup>	0.468 <sup>a</sup>	0.76 <sup>a</sup>	106.71 <sup>b</sup>	42.56 <sup>b</sup>	35.96 <sup>ab</sup>
52.5	16	3.71 <sup>b</sup>	8.06 <sup>a</sup>	0.468 <sup>a</sup>	0.76 <sup>a</sup>	97.52 <sup>c</sup>	40.82 <sup>c</sup>	34.17 <sup>b</sup>
55.0	10	3.70 <sup>b</sup>	8.08 <sup>a</sup>	0.470 <sup>a</sup>	0.57 <sup>b</sup>	88.97 <sup>d</sup>	37.48 <sup>d</sup>	34.12 <sup>b</sup>
57.5	5.0	3.69 <sup>c</sup>	8.06 <sup>a</sup>	0.472 <sup>a</sup>	0.49 <sup>c</sup>	86.34 <sup>e</sup>	35.69 <sup>e</sup>	34.09 <sup>b</sup>
60.0	1.25	3.69 <sup>c</sup>	8.04 <sup>a</sup>	0.468 <sup>a</sup>	0.45 <sup>c</sup>	83.53 <sup>f</sup>	32.99 <sup>f</sup>	31.54 <sup>c</sup>

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0.05$ ). Los valores son el promedio de cinco análisis.

TSS: sólidos solubles totales, TPC: contenido de fenoles totales.

## **CAPÍTULO II. DISTRIBUCIÓN EMPÍRICA DE LA FRACCIÓN SOBREVIVIENTE DE *Listeria monocytogenes* EN PULPA DE GUANÁBANA SOMETIDA A TRATAMIENTOS TÉRMICOS MODERADOS.**

### **2.1 RESUMEN**

Las concentraciones microbianas en los alimentos frecuentemente se consideran distribuidas de forma lognormal. Sin embargo, alternativas a esta distribución se han propuesto para representar datos de contaminación microbiana. El objetivo de este trabajo fue usar una estimación kernel para obtener la densidad empírica a partir de los datos de la fracción sobreviviente de *L. monocytogenes* inoculada en pulpa de guanábana, sometida a tratamientos térmicos moderados (50 °C/0–60 min, 52.5 °C/0–16 min, y 60.0 °C/0–1.25 min), y calcular la probabilidad de obtener reducciones 5-Log<sub>10</sub> de *L. monocytogenes* con los tratamientos térmicos probados. Dado que la FDA y la NACMCF requieren que los procesos de pasteurización garanticen al menos reducciones 5-log<sub>10</sub> del microorganismo en cuestión, es importante conocer la probabilidad de la reducción 5-log<sub>10</sub> lograda con los tratamientos térmicos evaluados en este estudio. La función de probabilidad por kernel, proporcionó una probabilidad de 11% de obtener una reducción 5-Log<sub>10</sub> de *L. monocytogenes* tratada a 50 °C/0–60 min y de 18% a 52.5 °C/0–16 min y 60 °C/0–1.25 min, respectivamente, por lo tanto, con estos valores de probabilidad, los tratamientos térmicos evaluados fueron microbiológicamente seguros, ya que cada probabilidad (11% y 18%) indica una reducción 5-Log<sub>10</sub> de *L. monocytogenes*.

Palabras clave: distribución empírica, densidad, *Listeria monocytogenes*, pulpa de guanábana, tratamiento térmico.

## 2.2 ABSTRACT

Microbial concentrations in food have been often considered to be lognormally distributed. However, alternatives to the lognormal distribution have been proposed to represent microbial contamination data. The objective of this work to use a kernel estimation to obtain the empirical density from the data of the survival fraction of *L. monocytogenes* inoculated in soursop pulp, subjected to moderate thermal treatments (50 °C/0–60 min, 52.5 °C/0–16 min, y 60.0 °C/0–1.25 min), and calculate the probability of getting 5-log<sub>10</sub> reductions of *L. monocytogenes* with thermal treatments tested. Since the FDA and NACMCF requires that thermal pasteurization processes guarantee at least a 5-log<sub>10</sub> reduction of the target microorganism, it is important to know the probability of 5-log<sub>10</sub> reductions of *L. monocytogenes* achieved with thermal treatments evaluated in this study. The kernel probability function provided a probability of 11% for a 5-log<sub>10</sub> reduction of *L. monocytogenes* treated at 50°C/0–60 min and 18% at 52.5°C/0–16 min and 60 °C/0–1.25 min, respectively, therefore, with these probability values, the thermal treatments evaluated were microbiologically safe, since each probability (11% y 18%) indicates a 5-Log<sub>10</sub> reduction of *L. monocytogenes*.

Key words: Empirical distribution, density, *Listeria monocytogenes*, soursop pulp, thermal treatment

## 2.3 INTRODUCCIÓN.

En la evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico (QMRA), los datos microbianos se utilizan como entrada en la evaluación de la exposición de dos maneras diferentes: como prevalencia y como concentración (Fischer et al., 2005; Havelaar et al., 2008; Rieu et al., 2007). Estas entradas están integradas con otros componentes de un modelo de exposición, lo que lleva a una salida final en forma de una dosis por porción de alimento, a la que están expuestos los

consumidores. Cuando se usan estimaciones sesgadas de prevalencia y concentración en QMRA, el manejo correcto de la salud pública por parte de las autoridades puede verse comprometido (Pouillot et al., 2013). Por lo tanto, en un enfoque estocástico para la evaluación de riesgos, las estimaciones puntuales de prevalencia o concentración no son deseadas. Así, para un lote de productos alimenticios, las concentraciones generalmente se ingresan como una distribución de probabilidad que representa la variabilidad dentro del lote de las concentraciones (Ribeiro, 2013).

Los recuentos microbianos obtenidos por enumeración se convierten comúnmente en logaritmos de base 10 antes de cualquier cálculo matemático (Niemelä, 2003) y las concentraciones microbianas en los alimentos frecuentemente se consideran distribuidas de forma lognormal, es decir, sus logaritmos de base 10 siguen una distribución normal (Busschaert et al., 2010; Crépet et al., 2007; Reinders et al., 2002). Sin embargo, se han discutido y propuesto algunas alternativas a la distribución lognormal para representar los datos de contaminación microbiana. Las distribuciones discretas, particularmente las generalizaciones de Poisson, como el Poisson-gamma (también llamado binomio negativo) y el Poisson-lognormal, se han indicado como alternativas, debido a su capacidad para modelar datos de conteo con sobredispersión (gran varianza) (Bassett et al., 2010; Gonzales-Barron et al., 2010). Otro modelo probabilístico que considera la variabilidad del producto (ingredientes o formulación) y del proceso considerando la distribución total (de mínimo a máximo con todos los percentiles) y la posibilidad de llevar a cabo un análisis de sensibilidad a través del uso de técnicas de simulación por computadora, es la simulación Monte Carlo, (Baert et al., 2009; Hoornstra et al., 2001).

El histograma tradicional, también es ampliamente utilizado entre los científicos para representar, al menos aproximadamente, la forma de la función de densidad de probabilidad. Sin embargo, la literatura en teoría estadística ha proporcionado estimaciones de densidad no

paramétricas, alternativas al histograma. El término “no paramétrico” es idealmente un procedimiento que es válido independientemente del tipo de distribución de la que se toma la muestra. Una de las estimaciones de densidad no paramétricas es la estimación kernel (Wegman, 1972), que se puede entender como una extensión de un histograma (Wilks, 2011). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue usar la estimación kernel y obtener la densidad empírica a partir de los datos de la fracción sobreviviente de *L. monocytogenes* en pulpa de guanábana sometida a tratamientos térmicos moderados (50 °C/0–60 min, 52.5 °C/0–16 min, y 60.0 °C/0–1.25 min) para calcular la probabilidad de obtener cinco reducciones logarítmicas (5-Log<sub>10</sub>) de *L. monocytogenes*, en cada nivel de temperatura y tiempos de exposición. Dado que la FDA y la NACMCF requieren que los procesos de pasteurización garanticen al menos reducciones 5-log<sub>10</sub> del microorganismo en cuestión, resulta importante conocer la probabilidad de la reducción 5-log<sub>10</sub> lograda con los tratamientos térmicos evaluados en este trabajo.

## **2.4 MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **2.4.1 Datos experimentales.**

Los datos experimentales de la fracción sobreviviente de células de *L. monocytogenes* [Log<sub>10</sub> (N/N<sub>0</sub>)] que se obtuvieron con los tratamientos térmicos, 50°C±1 °C /0–60 min; 52.5°C±1 °C /0–16 min; 60 °C±1 °C/0–1.25 min, aplicados a la pulpa de guanábana, se usaron para estimar la densidad y probabilidad empírica.

### **2.4.2 Análisis estadístico.**

Se estimó la densidad empírica y se calculó la probabilidad de obtener cinco reducciones logarítmicas (5-Log<sub>10</sub>) de *L. monocytogenes* en la pulpa de guanábana tratada térmicamente (50 °C/0–60 min, 52.5 °C/0–16 min, y 60.0 °C/0–1.25 min) usando el programa estadístico RStudio Versión 1.2.5033<sup>®</sup>. 2009-2019 RStudio, Inc.

#### **2.4.2.1 Estimación de la densidad.**

La densidad empírica se calculó mediante una función kernel. La función kernel produce una estimación de la función de densidad no paramétrica que se adapta a los datos. Esta función se define mediante una función de suavizado que determina la forma de la curva mediante un ancho de banda que controla la suavidad de la curva de densidad resultante (Wilks, 2011).

#### **2.4.2.2 Estimación de la probabilidad.**

La probabilidad empírica se obtuvo calculando el valor de una función de distribución acumulativa empírica (ecdf), mediante un estimador empírico de probabilidades, para cuantiles especificados por el usuario (D'Agostino, 1986). La ecdf es una estimación de la función de distribución acumulativa basada en una muestra aleatoria de  $n$  observaciones de la distribución.

### **2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

La figura 2.1 muestra la función de densidad de probabilidad empírica (epdf) de los datos experimentales de la fracción sobreviviente de células de *L. monocytogenes* [ $\text{Log}_{10} (N/N_0)$ ] en pulpa de guanábana tratada térmicamente, 50.0 °C/0–60 min (Figura 2.1(a)), 52.5 °C/0–16 min (Figura 2.1 (b)) y 60 °C/0–1.25 min (Figura 2.1 (c)), respectivamente. En estas figuras se observó que, hay más densidad en algunos rangos de las curvas ya que, los datos de la fracción sobreviviente de *L. monocytogenes* se obtuvieron con mayor frecuencia en esos rangos, resultando una distribución bimodal. Por otra parte, la función de probabilidad por kernel, proporcionó una probabilidad de 11% de obtener una reducción 5- $\text{Log}_{10}$  de *L. monocytogenes* tratada a 50°C/0–60 min y de 18% a 52.5°C/0–16 min y 60 °C/0–1.25 min, respectivamente. Por lo tanto, con el método de distribución empírica se pudo observar la distribución de la fracción sobreviviente de *L. monocytogenes* bajo los tratamientos térmicos evaluados y, además, se pudo calcular la probabilidad de obtener una reducción 5- $\text{Log}_{10}$  del microorganismo; complementando así, los

resultados que se obtuvieron con el modelo predictivo (ecuación modificada de Gompertz) que se usó para conocer la cinética de inactivación de *L. monocytogenes* bajo los tratamientos térmicos estudiados.

La simulación Monte Carlo, donde los parámetros de entrada se describen como distribuciones de frecuencia es también un análisis estocástico o probabilístico (van Gerwen y Gorris, 2004). La diferencia de la aplicación de una simulación Monte Carlo, comparado con el método de probabilidad empírica es que, la simulación Monte Carlo considera la posibilidad de llevar a cabo un análisis de sensibilidad, para establecer los factores que más influyen en el número final de microorganismos después de un proceso. Por ejemplo, en un estudio hecho por Sampedro et al (2011), se llevó a cabo una simulación Monte Carlo para predecir la carga final de células de *Salmonella typhimurium* tratadas por campos eléctricos pulsantes en una bebida a base de jugo de naranja y leche, según la influencia de la intensidad del campo eléctrico (15, 25, 35 y 40 kV/cm), el pH (3.5, 4 y 4.5) y la concentración de pectina (0.1, 0.3 y 0.6%). Las funciones de distribución de los parámetros de entrada (parámetros cinéticos primarios y el número inicial de microorganismos) se ingresaron con un software de simulación (@Risk, Palisade Corporation, NY) y se llevaron a cabo las simulaciones Monte Carlo para predecir el número final de microorganismos (parámetro de salida) bajo las diferentes condiciones del proceso (campo eléctrico, pH y concentración de pectina). Este estudio mostró que la simulación Monte Carlo permitió estimar el número final de *S. typhimurium* después del tratamiento con campos eléctricos pulsantes en la bebida a base de jugo de naranja y leche con características fisicoquímicas variables (pH y concentración de pectina). Además, el análisis de sensibilidad, permitió evaluar la influencia de cada una de las variables del proceso (número inicial de microorganismos, campo eléctrico, pH



y concentración de pectina) en el número final de células de *S. typhimurium*, siendo la carga microbiana inicial el parámetro más influyente.

## 2.6 CONCLUSIÓN.

Para este estudio, se observó una distribución bimodal de la fracción sobreviviente de *L. monocytogenes* bajo los tratamientos a 50°C/0–60 min, 52.5°C/0–16 min y 60 °C/0–1.25 min. La probabilidad de obtener reducciones 5-Log<sub>10</sub> fue 11% a 50°C/0–60 min y de 18 % a 52.5°C/0–16 min y 60 °C/0–1.25 min, respectivamente; por lo tanto, con estos valores de probabilidad, los tratamientos térmicos evaluados fueron microbiológicamente seguros, ya que cada probabilidad (11% y 18%) indica una reducción 5-Log<sub>10</sub> de *L. monocytogenes*.

## 2.7 REFERENCIAS.

- Baert K, Francois K, De Meulenaer B, and Devlieghere F. (2009). Risk assessment: A quantitative approach. In: Costa R and Kristbergsson K (eds.). *Predictive modeling and risk assessment* New York: Springer, pp. 21–22.
- Bassett J, Jackson T, Jewell and K, Jongenburger I, Zwietering M. (2010). Impact of microbial distributions on food safety. *ILSI Europe Report*, Belgium. 64 p.
- Busschaert P, Geeraerd AH, Uyttendaele M, and Van Impe JF. (2010). Estimating distributions out of qualitative and (semi)quantitative microbiological contamination data for use in risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* 138(3): 260–269.
- Crepet A, Albert I, Dervin C, and Carlin F. (2007). Estimation of microbial contamination of food from prevalence and concentration data: Application to *Listeria monocytogenes* in fresh vegetables. *Applied and Environmental Microbiology* 73(1): 250–258.

- D'Agostino RB. (1986). Graphical Analysis. In: D'Agostino RB, and Stephens MA (eds) *Goodness-of-Fit Techniques*. New York: Marcel Dekker, pp.7–62.
- Fischer ARH, de Jong AE, de Jonge R, Frewer LJ, and Nauta MJ. (2005). Improving food safety in the domestic environment: the need for a transdisciplinary approach. *Risk Analysis*. 25(3): 503–517.
- Food and Drug Administration (FDA), Center for Food Safety and Applied Nutrition, United States (FDA/CFSAN, US). (2004). Juice HACCP hazards and controls guidance. Guidance for industry. 1st ed. Disponible en: [www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ucm072557.htm](http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ucm072557.htm) (acceso 24 Noviembre 2018).
- Gonzales-Barron U, Kerr M, Sheridan JJ, and Butler F. (2010). Count data distributions and their zero modified equivalents as a framework for modelling microbial data with a relatively high occurrence of zero counts. *International Journal of Food Microbiology* 136(3): 268–277.
- Havelaar AH, Evers EG, and Nauta MJ. (2008). Challenges of quantitative microbial risk assessment at EU level. *Trends in Food Science & Technology* 19(1): S23–S33.
- Hoorstra E, Northolt MD, Notermans S, and Barendsz AW. (2001). The use of quantitative risk assessment in HACCP. *Food Control* 12: 229–234.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF). (2006). Requisite scientific parameters for establishing equivalence of alternative methods of pasteurization. *Journal of Food Protection* 69(5): 1190–1216.

- Niemelä SI. (2003). Measurement uncertainty of microbiological viable counts. *Accreditation and Quality Assurance* 8: 559–563.
- Pouillot R, Hoelzer K, Chen Y, and Dennis S. (2013). Estimating probability distributions of bacterial concentrations in food based on data generated using the most probable number (MPN) method for use in risk assessment. *Food Control* 29(2): 350–357.
- Reinders R, Evers E, de Jonge R, and Van Leusden F. (2002). Variation in the numbers of Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157 in minced beef. *RIVM report*, Bilthoven.
- Ribeiro D AS. (2013). The interpretation of quantitative microbial data: meeting the demands of quantitative microbiological risk assessment. PhD Thesis, Technical University of Denmark, Søborg, Denmark.
- Rieu E, Duhem K, Vindel E, and Sanaa M. (2007). Food safety objectives should integrate the variability of the concentration of pathogen. *Risk Analysis* 27(2): 373–386.
- Sampedro F, Rodrigo D, Martínez A. (2011). Modelling the effect of pH and pectin concentration on the PEF inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by using the Monte Carlo simulation. *Food Control* 22: 420–425.
- van Gerwen SJC and Gorris LGM. (2004). Application of microbiological risk assessment in the food industry via tiered approach. *Journal of Food Protection* 67: 2033–2040.
- Wegman EJ. (1972). Nonparametric Probability Density Estimation: I. A Summary of Available Methods. *Technometrics* 14(3): 533–546
- Wilks DS. (2011). Empirical Distributions and Exploratory Data Analysis. *International Geophysical* 100: 23–70.

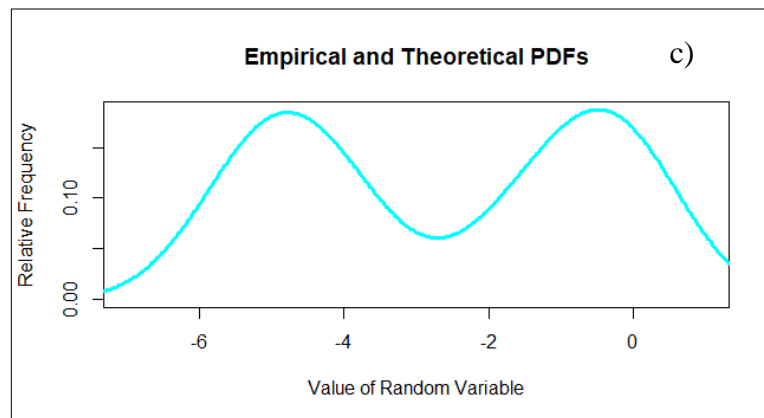
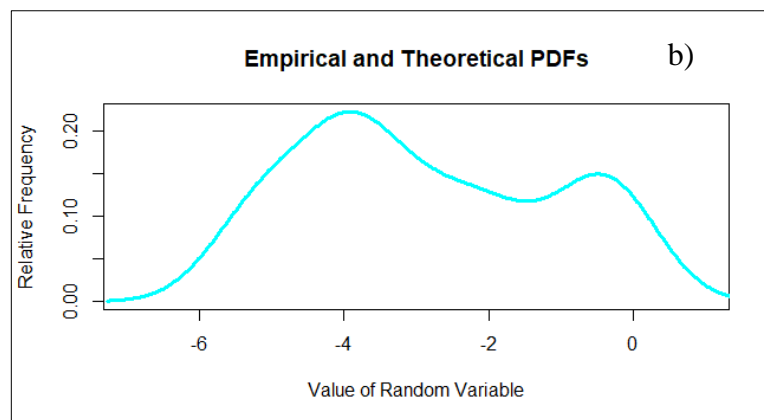
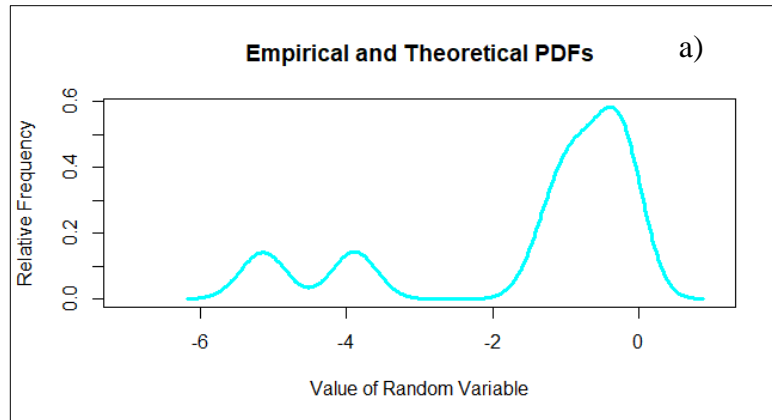


Figura 2.1 Funciones de densidad de probabilidad empírica de la fracción sobreviviente [ $\text{Log}_{10}(N/N_0)$ ] de las células de *L. monocytogenes* en pulpa de guanábana tratada térmicamente, a) 50 °C/0–60 min, b) 52.5 °C/0–16 min, c) 60 °C/0–1.25 min.

**CAPÍTULO III. EFECTO DE ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA SOBRE LA  
INACTIVACIÓN DE *Listeria monocytogenes* CECT 4032 Y CALIDAD  
ORGANOLÉPTICA DE PULPA DE GUANÁBANA.**

**3.1 RESUMEN**

Este trabajo tuvo como objetivo investigar el efecto de altas presiones hidrostáticas (200–300 MPa) y diferentes tiempos de exposición (0–7 min) sobre la inactivación de *L. monocytogenes* CECT 4032 y su efecto en la calidad organoléptica de pulpa de guanábana. Reducciones cercanas a  $5\text{-log}_{10}$  de *L. monocytogenes* en pulpa de guanábana se lograron a 250 MPa por 7 min y 300 MPa por 3.5 min. Las cinéticas de inactivación de *L. monocytogenes* se describieron mediante modelos modificados de Weibull, estos modelos proporcionaron una bondad de ajuste aceptable y sus parámetros dependieron de la presión aplicada. Bajo las condiciones de presión (200–300 MPa) y tiempo de exposición evaluados (0–7 min), la pulpa de guanábana no mostró cambios en el contenido de sólidos solubles totales, ácido ascórbico y capacidad antioxidante. Sin embargo, la pulpa mostró cambios en pH y en el contenido de fenoles totales. Los tratamientos con alta presión hidrostática evaluados preservaron el color de la pulpa de guanábana y únicamente la pulpa sometida a 200 MPa/5 min, 250 MPa/1.5 min y 300 MPa/2.5 min, mostraron cambios en los parámetros de color.

Palabras clave: Alta presión hidrostática, *Listeria monocytogenes*, cinética de inactivación, pulpa de guanábana, propiedades fisicoquímicas.

### 3.2 ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effect of high hydrostatic pressure (200–300 MPa) and different exposure times (0–7 min) on the inactivation of *L. monocytogenes* CECT 4032 and the physicochemical properties in soursop Pulp. Reductions close to 5- $\log_{10}$  of *L. monocytogenes* were achieved at 250 MPa for 7 min y 300 MPa por 3.5 min. The inactivation kinetics of *L. monocytogenes* were described using modified models of Weibull, these models provided an acceptable goodness of fit and their parameters depended on the applied pressure. Under the conditions of pressure and exposure time evaluated, the soursop pulp showed no change in the content of total soluble solids, ascorbic acid and antioxidant capacity. However, the pulp showed changes in pH and the content of total phenols. High hydrostatic pressure treatments evaluated preserved the color of the soursop pulp and only the pulp subjected to 200 MPa/5 min, 250 MPa/1.5 min y 300 MPa/2.5 min showed changes in the color parameters.

Key words: High hydrostatic pressure, *Listeria monocytogenes*, inactivation kinetics, soursop pulp, physicochemical properties.

### 3.3 INTRODUCCIÓN

El más utilizado y conocido entre los métodos tradicionales para la conservación de alimentos es el tratamiento térmico. La utilidad de este tratamiento se basa principalmente en la inactivación de microorganismos y enzimas para evitar la degradación de los alimentos durante el almacenamiento y comercialización. El tratamiento térmico favorece las reacciones de degradación de los compuestos en los alimentos, que promueven la salud, acelerados por la temperatura, por lo que afectan negativamente la calidad final de los alimentos (Patras et al., 2009a). La demanda de los consumidores de alimentos frescos mínimamente procesados, ha aumentado en los últimos tiempos. Por lo tanto, para cumplir con estos requisitos, se ha vuelto

necesario explorar y adoptar métodos de procesamiento alternativos, como el procesamiento de alta presión hidrostática (Kaushik et al., 2014).

El procesamiento de alta presión hidrostática es una tecnología no térmica que recientemente ha sido adoptada por la industria alimentaria. El potencial de mantener la calidad nutricional y sensorial mientras se inactivan los microorganismos patógenos y deteriorantes y se modifica la actividad de enzimas deteriorativas, hace que esta tecnología sea apropiada para satisfacer la creciente demanda de los consumidores de productos mínimamente procesados, más saludables y más seguros. La alta presión en muchas aplicaciones tiene poco o ningún efecto sobre los nutrientes y los compuestos bioactivos o sobre otros compuestos responsables del sabor y el color de las frutas (Rosenthal et al., 2018).

El procesamiento de alta presión es posterior al empaque en el que un producto guardado en un paquete flexible se coloca en una cámara de compresión. La cámara se sella y se llena con un fluido de transmisión de presión (comúnmente una mezcla de agua y aceite) y el sistema se presuriza mediante un mecanismo de bombeo e intensificación de presión. Comúnmente, las presiones entre 400 y 800 MPa por 1–15 min han resultado ser efectivas para preservar la calidad y lograr la estabilidad microbiana, proporcionando así una vida útil prolongada en condiciones refrigeradas (Patterson et al., 2006; Rastogi et al., 2007; Penchalaraju y Shireesha, 2013).

A partir de 1980 se intensificó y difundió la investigación sobre alta presión, comenzando en Japón y seguida por los Estados Unidos y los países europeos. El guacamole fue el primer producto procesado mediante alta presión fabricado en México y comercializado en los Estados Unidos por AVOMEX INTERNATIONAL SA de CV (Rosenthal et al., 2018).

Dentro del campo de la inocuidad y seguridad alimentaria, existe la necesidad de describir el comportamiento microbiano ya sea en medios de referencia o en los propios alimentos cuando son sometidos a diversas condiciones de presión o cualquier otra tecnología emergente, combinada o no con calor u otros factores de estrés (pH, antimicrobianos, actividad de agua) pues su comportamiento es distinto (FDA, 2000).

Se han utilizado modelos cinéticos predictivos para identificar la resistencia de los microorganismos y su comportamiento de inactivación. Varios estudios sobre el procesamiento térmico convencional han utilizado modelos cinéticos de primer orden para predecir la inactivación microbiana. Existe evidencia de que la inactivación de microorganismos mediante el procesamiento a alta presión, así como otros procesos no térmicos, puede no seguir una cinética de primer orden (Peleg y Cole 1998). Para describir curvas de sobrevivencia no lineal, se han propuesto varios modelos, como Weibull, modificado de Gompertz, logístico, bifásico y Baranyi (Moody et al., 2014; Muñoz-Cuevas et al., 2013; Saucedo-Reyes et al., 2017; Serment-Moreno et al., 2014; Tola y Ramaswamy, 2014; Zhao et al., 2014).

*L. monocytogenes* es un patógeno severo transmitido por los alimentos que es de gran preocupación para la industria procesadora de frutas. *Listeria* puede sobrevivir en el ambiente ácido (pH < 4.6) así como a baja temperatura (4 °C) (Parish y Higgins, 1989). Existe evidencia que la alta presión hidrostática es una posible alternativa a un proceso térmico para inactivar *L. monocytogenes* en algunos productos de frutas y verduras (Rosenthal et al., 2018). Por lo tanto, en este estudio, el objetivo fue investigar el efecto de alta presión hidrostática sobre la inactivación de *L. monocytogenes* y su efecto en la calidad organoléptica de pulpa de guanábana, para determinar las condiciones de procesamiento que permitan mantener la pulpa a un nivel de seguridad adecuado para su consumo.



## **3.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.4.1 Preparación de las muestras de pulpa de guanábana.**

Frutos de guanábana en madurez de consumo se compraron en la Central de Abasto de la ciudad de México. Los frutos se trasladaron al laboratorio de postcosecha del Colegio de Postgraduados, donde se lavaron con agua y se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 0.01%. Enseguida se despulparon manualmente, separando la cáscara y las semillas. Muestras de pulpa se sumergieron en nitrógeno líquido por 15 min. Luego, las muestras congeladas se liofilizaron (LABCONCO Corp. Kansas, MO, USA), por 72 h (vacío 16 Pa; colector  $-45^{\circ}\text{C}$ ). El porcentaje de materia seca fue 13%.

La pulpa liofilizada fue empaquetada en bolsas laminadas plástico-aluminio de alta barrera, las cuáles se enviaron por paquetería al Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), Valencia, España. La pulpa liofilizada se rehidrató agregando agua destilada en base al porcentaje de humedad, después se adicionó agua en una proporción 1:1 (pulpa:agua) para facilitar su manipulación en los análisis posteriores. Enseguida, se homogeneizó y se filtró con un tamiz (0.333 mm). La pulpa que se obtuvo se colocó en tubos cónicos falcon de 50 mL y se almacenaron a  $-40^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso. El pH (potenciometro GLP 21, Crison Instruments®, Alella, Barcelona, España) de la pulpa obtenida fue 3.91.

### **3.4.2 Preparación del cultivo.**

El presente estudio se llevó a cabo con una cepa liofilizada de *L. monocytogenes* CECT 4032, suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo. Para su rehidratación, la cepa liofilizada de *L. monocytogenes* se transfirió a 15 mL de Caldo de Triptona y Soya (TSB) estéril (Scharlab S.L., Sentmenat, España). Después de 30 min, 5 mL del cultivo se inocularon en 500 mL de TSB y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación constante (70 U/min) durante 21 h. Enseguida, las células se

centrifugaron dos veces a 5000 rpm por 15 min a 4 °C y se re-suspendieron en 50 mL de TSB. Luego, las células se colocaron en viales criogénicos de plástico estériles de 2 mL, conteniendo TSB suplementado con 20% de glicerol, en una relación 1:1. Por último, la muestra de 2 mL se almacenó a -80 °C hasta que se usó para los estudios microbiológicos. La concentración aproximada de *L. monocytogenes* fue  $4.23 \cdot 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>.

### **3.4.3 Inoculación de la pulpa de guanábana.**

Una muestra de 19 mL de pulpa de guanábana se descongeló e inmediatamente se esterilizó a 121 °C por 20 min. Después se aclimató a temperatura ambiente y se inoculó agregando 1 mL de la suspensión de *L. monocytogenes* previamente descongelada y aclimatada a temperatura ambiente. La pulpa inoculada se mezcló por 30 s con el objetivo de garantizar un contenido homogéneo del microorganismo.

### **3.4.4 Tratamientos con alta presión hidrostática.**

Viales estériles de 1.5 mL se llenaron completamente con la pulpa de guanábana inoculada con *L. monocytogenes* evitando burbujas de aire. Para cada condición de presión y tiempo, tres viales se colocaron en bolsas de plástico usadas para presurización. Las bolsas se termo-sellaron al vacío (termoselladora ROMAGSA) y entonces fueron sujetas a presurización. La unidad de presión hidrostática utilizada para este estudio (Procesador de Alimentos de Alta Presión; EPSI NV, Temse, Bélgica) es capaz de producir presiones nominales de hasta 680 MPa, y tiene una vasija cilíndrica de presión de 2.35 litros (diámetro interno de 100 mm y altura de 300 mm) rodeada de una doble cámara por la que fluye el líquido refrigerante y que la mantiene a la temperatura de trabajo deseada (Figura 3.2). La temperatura del líquido en la cámara de presión se puede ajustar entre -15 y 90 °C mediante un sistema de calefacción incorporado. El fluido de transmisión de presión fue una mezcla de agua destilada y glicol. El nivel de presión, el tiempo de presurización

y la temperatura se controlaron automáticamente. La velocidad de aumento de presión fue de aproximadamente 300 MPa/min y el tiempo de despresurización fue inferior a 1 min. El tiempo de tratamiento descrito en este estudio no incluyó el tiempo para alcanzar la presión de tratamiento ni el tiempo de despresurización (come-up and come-down times).

Las muestras fueron presurizadas a 200 MPa (0, 1, 3, 5 y 7 min), 250 MPa (0, 1.5, 2.5, 3 y 5 min) y 300 MPa (0, 1, 2, 2.5 y 3.5 min). La presión de la vasija fue a temperatura ambiente (~25 °C). Inmediatamente después de la presurización, los viales se transfirieron dentro de agua con hielo y se usaron para la enumeración de unidades formadoras de colonias (UFC mL<sup>-1</sup>). La pulpa inoculada con *L. monocytogenes*, no presurizada se usó como un control. Un lote de pulpa no inoculada con *L. monocytogenes* fue sometida a las mismas condiciones de presión y tiempo para las determinaciones fisicoquímicas de la pulpa de guanábana.

#### **3.4.5 Enumeración de *L. monocytogenes*.**

Las muestras tratadas con alta presión hidrostática y el control se diluyeron seriadamente en agua de peptona al 0.1% (w/v) estéril (Scharlau Chemie S. A., Barcelona, España). El medio de enumeración usado para las células viables fue Agar Triptona y Soja (TSA) estéril (Scharlab S.L., Sentmenat, España). Las diluciones seleccionadas se incubaron a 37 °C por 48 h y se usaron para la enumeración de UFC mL<sup>-1</sup>. La muestra no presurizada se usó para determinar UFC inicial por mililitro. La reducción de células viables se expresó como el logaritmo decimal del cociente de las células tratadas ( $N$ ) y no tratadas ( $N_0$ ).

#### **3.4.6 Modelación matemática.**

Dos modelos matemáticos se usaron para representar las curvas de sobrevivencia detectadas para las células de *L. monocytogenes* después de los tratamientos con alta presión hidrostática, el modelo propuesto por Mafart et al. (2002) [ecuación (3.1)] planteado a partir de la distribución de

frecuencias de Weibull y el modelo modificado de Weibull [ecuación (3.2)] propuesto por Albert y Mafart (2005).

$$\log_{10}(S) = \left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad (3.1)$$

Donde  $\log_{10}(S)$  representa la relación de reducción decimal. Parámetro  $\delta$ , el cual tiene dimensiones de tiempo, puede ser llamado tiempo de primera reducción decimal. Y  $p$  es un parámetro de forma.

$$\log_{10}(S) = \log_{10} \left[ (N_0 - N_{res}) * 10^{\left(-\left(\frac{t}{\delta}\right)^p\right)} + N_{res} \right] \quad (3.2)$$

Donde  $N_0$  y  $N_{res}$  representan valores desconocidos de la concentración bacteriana inicial (en el tiempo  $t=0$ ) y la concentración bacteriana residual (al final de la observación), respectivamente.  $\delta$  es el parámetro de escala ( $\text{min}^{-1}$ ) denotado como el tiempo de la primera reducción decimal para la parte de la población que no pertenece a  $N_{res}$ . Y  $p$  es el parámetro de forma, si  $p < 1$ , la curva no tiene punto de inflexión y, por lo tanto, no hay presencia de hombro. Si  $p > 1$ , la curva tiene un punto de inflexión y, por lo tanto, permite un efecto de hombro, con una cola si  $N_{res} \neq 0$  (Albert y Mafart, 2005).

### **3.4.7 Determinación de la calidad organoléptica en la pulpa de guanábana.**

#### **3.4.7.1 Medida instrumental de color.**

El color de la pulpa de guanábana se midió en un espectrofotómetro Konica Minolta CM-3500d (Konica Minolta Business Technologies, Inc., Japón) de acuerdo con lo descrito por Arancibia et al. (2011). La muestra se colocó en una celda de vidrio óptico de 6 cm de diámetro y 3.8 cm de altura, para medir la luz reflejada difusa desde el fondo de la celda utilizando una abertura de diafragma de 8 mm y una capa de muestra de 3.5 cm de espesor. Los resultados fueron dados

utilizando el sistema CIELAB para el iluminante D65 y un ángulo de visión de 10°. Los parámetros registrados fueron  $L^*$  (luminosidad),  $a^*$  (componente rojo),  $b^*$  (componente amarillo),  $C^*$  (croma) y  $h^*$  (tono). Para cada combinación de presión y tiempo de exposición se registraron seis mediciones.

#### **3.4.7.2 Medición del pH.**

El pH de la pulpa se midió con un potenciómetro GLP 21 (Crison Instruments, S.A., Alella, Barcelona, España) a temperatura ambiente (25 °C). El potenciómetro se calibró antes de tomar las lecturas utilizando buffers estándar de pH 4 y 7. Para cada tratamiento se hicieron cinco mediciones.

#### **3.4.7.3 Análisis de sólidos solubles totales (TSS).**

Los sólidos solubles se midieron usando un refractómetro digital (modelo RX-1000, Atago, Tokio, Japón) a temperatura ambiente (25 °C). Los resultados se expresaron como °Brix. Cinco mediciones se realizaron para cada tratamiento.

#### **3.4.7.4 Ácido ascórbico.**

El contenido de ácido ascórbico en la pulpa de guanábana se determinó por el método de titulación (AOAC, 2000). 3 mL de muestra se diluyeron con 30 mL de ácido oxálico (Scharlab S.L., Sentmenat, España) 0.5 g/100 mL. Una alícuota de 5 mL se tituló usando una solución de 2,6-diclorofenol indofenol (Scharlab S.L., Sentmenat, España). El contenido de ácido ascórbico se calculó por interpolación de los valores en una curva de calibración generada con ácido ascórbico. Los resultados se expresaron como mg de ácido ascórbico en 100 mL de pulpa (mg AA 100 mL<sup>-1</sup>). Para cada combinación de presión y tiempo se hicieron tres mediciones.

La curva de calibración se generó disolviendo 10 mg de ácido ascórbico en 100 mL de ácido oxálico 0.5 g/100 mL. Luego se realizó una dilución de concentración  $0.01 \text{ mg mL}^{-1}$ . Enseguida se tomaron alícuotas, se disolvieron con una solución de ácido oxálico 0.5 g/100 mL, y se generaron concentraciones en el intervalo comprendido entre 0.001–0.01 mg de ácido ascórbico/5 mL ácido oxálico. Posteriormente, las muestras se titularon con 2,6-diclorofenol indofenol registrando el gasto (mL). Por último, el gasto (mL) se graficó frente a la cantidad de ácido ascórbico (mg) en las muestras tituladas (Figura 3.3).

#### **2.4.7.5 Contenido de fenoles totales.**

El contenido de fenoles totales se determinó de acuerdo al método descrito por Waterhouse (2002) con algunas modificaciones. Para hacer esto, 1 mL de pulpa de guanábana se mezcló con 10 mL de metanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y agua destilada (8:2 v/v) y se dejó reposar durante 24 h. 200  $\mu\text{L}$  del extracto se colocaron en cubetas de 4 mL, se adicionaron 1.5 mL de agua destilada y 0.1 mL del reactivo Folin-Denis (1:1 (v/v)) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Después de tres minutos se adicionaron 0.2 mL de una solución de carbonato de sodio al 20% (w/v) (Panreac Química S. A., Barcelona, España) y se mezcló por inversión. La mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente y oscuridad por 1 h. La absorbancia se midió a 765 nm usando un espectrofotómetro modelo PG 1800 (Labolan S.L., España). El contenido de fenoles totales se calculó por interpolación de los valores en una curva de calibración (Figura 3.4) preparada con ácido gálico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) en el intervalo de concentraciones comprendido entre 10 y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (GAE) en 100 mL de pulpa ( $\text{mg GAE} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ). Las mediciones se hicieron por triplicado.

### 3.4.7.6 Capacidad antioxidante total.

El método usado para la determinación de capacidad antioxidante total fue el método TEAC, descrito por Re et al. (1999) y Zuleta et al. (2009), basado en la capacidad de los antioxidantes de una muestra para inhibir el radical ABTS ( $ABTS^{*+}$ ) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) comparado con un estándar antioxidante de referencia (Trolox<sup>®</sup>) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). El radical  $ABTS^{*+}$  se hizo mediante reacción química con persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Para este propósito, 440  $\mu$ L de  $K_2S_2O_8$  (140 mM) se adicionaron a 25 mL de ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] (7 mM) y la solución se dejó reposar durante 12-16 h en oscuridad a temperatura ambiente para conseguir la formación del radical. La solución de trabajo se preparó tomando un volumen de la solución anterior y diluyéndola en etanol absoluto (Scharlab S.L., Sentmenat, España) hasta que su absorbancia a  $\lambda=734$  nm fue  $0.70 \pm 0.02$ . La absorbancia se midió en un espectrofotómetro modelo PG 1800 (Labolan S.L., España). La reacción de inhibición del radical  $ABTS^{*+}$  tuvo lugar directamente en la propia cubeta de medición. Para esto, se añadieron 2 mL de la solución de trabajo del radical  $ABTS^{*+}$ , se midió la absorbancia inicial ( $A_0$ ) e inmediatamente se adicionaron 100  $\mu$ L de muestra o estándar. La absorbancia se midió a los 20 min ( $A_f$ ). El porcentaje de inhibición se calculó aplicando la ecuación (3.3):

$$\% \text{ inhibición} = (1 - A_f / A_0) * 100 \quad (3.3)$$

donde  $A_0$  es la absorbancia a tiempo inicial y  $A_f$  es la absorbancia obtenida al tiempo fijado de lectura.

Las muestras se diluyeron previamente en agua destilada (1/100) para obtener una medición correcta. Al mismo tiempo una curva de calibración (Figura 3.5) se preparó con trolox para un rango de concentración de 0–250  $\mu$ M, y el porcentaje de inhibición obtenido por la muestra se

interpoló para calcular la concentración en equivalentes de trolox ( $\mu\text{M TE}$ ). Las determinaciones se hicieron por triplicado.

### **3.4.8 Análisis estadístico.**

Los estudios de inactivación en *L. monocytogenes* de cada condición de presión y tiempo de exposición se llevaron a cabo con tres réplicas. El ajuste de los modelos matemáticos a los datos de inactivación se hizo usando el software GInaFiT (version 1.6) (Geeraerd et al., 2005) obteniendo mediante este software, los parámetros cinéticos de los modelos matemáticos. La bondad de ajuste de los modelos a los datos experimentales se estimó a partir del coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{\text{adj}}$ ) y la raíz del error cuadrático medio (RMSE), provistos mediante el software GInaFiT.

Para los valores de las determinaciones fisicoquímicas (color, pH, sólidos solubles totales, ácido ascórbico, contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante total), la prueba de Shapiro-Wilks (Shapiro y Wilks, 1965) se utilizó para verificar la normalidad de los datos, que rechazó la hipótesis de normalidad ( $p < 0.0001$ ). Por lo tanto, las diferencias entre tratamientos se probaron mediante comparaciones múltiples después de una prueba de Kruskal-Wallis a un nivel de  $p < 0.05$ . Los datos se analizaron utilizando el software Infostat v. 2019 (Di Rienzo et al., 2019).

## **3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.5.1 Inactivación de *L. monocytogenes* con alta presión hidrostática.**

El logaritmo decimal de la fracción sobreviviente de las células de *L. monocytogenes* CECT 4032 inoculadas en la pulpa de guanábana se representó frente al tiempo a los tres niveles de presión estudiados (200, 250 y 300 MPa) como se muestra en la Figura 3.1, observando que la inactivación de *L. monocytogenes* aumentó con el incremento de la presión. En las condiciones de tratamientos evaluados, a 200 MPa no se observó un nivel significativo de inactivación de *L.*



*monocytogenes* (Figura 3.1(a)), donde una inactivación de 1- $\log_{10}$  apenas se alcanzó hasta los 5 min de exposición. Sin embargo, una inactivación cercana a 5- $\log_{10}$  de *L. monocytogenes* se detectó a 250 MPa por 7 min y a 300 MPa por 3.5 min (Figura 3.1(b) y 3.1(c), respectivamente). También se observó que el tiempo de exposición del microorganismo bajo presión influyó en el nivel de inactivación, encontrándose que, a mayor presión, se logró una alta inactivación en tiempos de exposición más bajos (Figura 3.1(c)). Al respecto, Espina et al (2013), obtuvieron una reducción menor a 1 ciclo  $\log_{10}$  de *L. monocytogenes*, al evaluar el efecto de alta presión hidrostática (175 MPa/20 min) en *L. monocytogenes* EGD-e. tratada en una solución buffer de McIlvaine (compuesta de ácido cítrico e hidrógeno fosfato disódico) de pH = 4 y usando TSAYE (Agar Triptona y Soja con Extracto de Levadura al 0.6%) como medio de recuperación. Ali et al (2020), evaluaron el efecto de alta presión hidrostática en la inactivación de *L. innocua* ATCC 51742 inoculada en jugo de pasto de trigo, y reportaron que una reducción de 5- $\log_{10}$  del microorganismo se logró cuando aplicaron 500 MPa/60 s. Por otra parte, Alpas et al (2000), determinaron las interacciones entre alta presión hidrostática (207, 276 y 345 MPa), temperatura de presurización (25–50°C), tiempo (5 y 10 min) y pH (4.5–6.5) durante la presurización de *L. monocytogenes* CA y OH<sub>2</sub> inoculada en caldo de cultivo TSBY (Caldo de Triptona y Soja suplementado con levadura al 0.6%). Los autores reportaron que, a 207 y 276 MPa, las dos cepas de *L. monocytogenes* tenían menos de 1 ciclo log a 25°C incluso después de 10 minutos de presurización, y 2.40 ciclos log se obtuvieron con 345 MPa/10 min/25 °C. Considerando la adición de ácido cítrico al sustrato (pH=4.5) obtuvieron 4.95 ciclos log con 345 MPa/5 min/35 °C.

### **3.5.2 Modelación de las curvas de sobrevivencia.**

En la Figura 3.1 se observa que, después de los tratamientos con alta presión hidrostática, las curvas de inactivación de *L. monocytogenes*, no exhibieron un comportamiento lineal. Al respecto,

Possas et al. (2017) mencionaron que a pesar del creciente número de estudios publicados en los que se ha observado una cinética de inactivación lineal, los patrones de inactivación microbiana durante el procesamiento con alta presión hidrostática son con frecuencia no lineales. El comportamiento no lineal durante los tratamientos a presión se atribuye al daño acumulativo en las células microbianas (Tay et al., 2003). Una de las funciones no lineales más comúnmente aplicada para describir la cinética de inactivación microbiana bajo alta presión hidrostática ha sido el modelo de Weibull (Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, 2011; Possas et al., 2017; Serment-Moreno et al., 2014). En este estudio, las curvas de inactivación de *L. monocytogenes* se ajustaron usando el software GinaFit, que permite aplicar y comparar diferentes ecuaciones modelo en un conjunto definido de datos experimentales. Entre las ecuaciones de modelos disponibles en el software GinaFit, dos ecuaciones fueron adecuadas para representar las curvas de sobrevivencia detectadas para las células de *L. monocytogenes*, (1) el modelo propuesto por Mafart et al. (2002) (ecuación (3.1)) planteado a partir de la distribución de frecuencias de Weibull y (2) el modelo modificado de Weibull (ecuación (3.2)) propuesto por Albert y Mafart (2005).

El modelo propuesto por Mafart et al. (2002), (ecuación 3.1) se ajustó a la curva de sobrevivencia de *L. monocytogenes* inoculada en la pulpa que se sometió a 200 MPa. El modelo de Weibull (ecuación 3.1) es apropiado para describir curvas cóncavas hacia abajo ( $p > 1$ ) y curvas cóncavas hacia arriba ( $p < 1$ ) (Mafart et al., 2002). En este caso, en la pulpa que se sometió a 200 MPa, se obtuvo  $p = 3.01 \pm 0.26$  (Cuadro 3.1), lo que sugiere una curva cóncava hacia abajo. El tiempo en alcanzar la primera reducción logarítmica fue 4.89 min (Cuadro 3.1) y no hay presencia de cola como se observa en la Figura 3.1(a). El modelo de Weibull (ecuación 3.1) describió con éxito la curva de inactivación de *L. monocytogenes* con  $R^2_{\text{adj}} = 0.9960$  y un bajo valor de RMSE (0.0284) como se muestra en el Cuadro 3.1.

Por otra parte, el modelo modificado de Weibull (ecuación 3.2) proporcionó un buen ajuste a las curvas de sobrevivencia de *L. monocytogenes* sometida a 250 y 300 MPa. A 250 MPa, los valores fueron  $RMSE = 0.4731$  y  $R^2_{adj} = 0.9569$ , y a 300 MPa los valores fueron  $RMSE = 0.2129$  y  $R^2_{adj} = 0.9893$  (Cuadro 3.1), indicando un ajuste aceptable del modelo matemático (ecuación 3.2) a los datos de inactivación de *L. monocytogenes*, sometida a esas presiones. El parámetro  $p$  de la curva de inactivación de *L. monocytogenes* inoculada en la pulpa que se sometió a 250 MPa fue  $p = 2.01 \pm 0.71$  y a 300 MPa,  $p = 1.50 \pm 0.28$  (Cuadro 3.1). Por lo tanto, como los valores obtenidos fueron  $p > 1$ , indicaron que las curvas tuvieron un punto de inflexión, por consiguiente, presentaron un efecto de hombro, como lo mencionaron Albert y Mafart (2005). También, las curvas de sobrevivencia de *L. monocytogenes* a 250 y 300 MPa presentaron un efecto de cola ( $N_{res} \neq 0$ ), ya que, a 250 MPa,  $N_{res} = -4.92 \pm 0.52$  y a 300 MPa,  $N_{res} = -4.53 \pm 0.16$  (Cuadro 3.1). La presencia de un hombro en las curvas de inactivación, es caracterizada por una baja velocidad de inactivación celular al comienzo de los tratamientos de presión (Doona et al., 2012; Fletcher et al., 2008). Se han presentado algunas hipótesis para explicar el hombro en las curvas de inactivación, como la distribución no uniforme de presión en el producto y las diferentes sensibilidades a la presión del microorganismo objetivo (Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, 2011; Maresca y Ferrari, 2017). El efecto de cola en las curvas de sobrevivencia de *L. monocytogenes* se muestra en la Figura 3.1(b) y 3.1(c), al respecto, se ha reportado que un patrón en forma de cola es frecuente en los modelos de inactivación no lineal (Buzrul y Alpas, 2004; Hereu et al., 2012; Muñoz-Cuevas et al., 2013). La hipótesis más aceptada para explicar el efecto de cola es que son consideradas como un reflejo de la heterogeneidad de resistencia dentro de la población, ya sea inherente a las células bacterianas o adquiridas durante el tratamiento (Gayán et al., 2012; Mañas y Pagan, 2005). En el Cuadro 3.1 se muestra que los valores del parámetro de escala de tiempo ( $\delta$ ), disminuyeron con el

aumento de la presión, por lo tanto, el tiempo en lograr la primera reducción logarítmica de *L. monocytogenes* fue menor cuando el nivel de presión fue mayor (300 MPa). En consecuencia, una reducción 5- $\log_{10}$  de *L. monocytogenes* se logró en menor tiempo a 300 MPa.

### 3.5.3 Efecto de la alta presión hidrostática en color de la pulpa.

Los parámetros  $L^*$   $a^*$   $b^*$  de la pulpa de guanábana sin tratar fueron  $L^* = 71.12$ ,  $a^* = -1.81$ , y  $b^* = 8.99$  (Cuadro 3.2). Las pulpas sometidas a alta presión no mostraron cambios significativos en el valor  $L^*$ , excepto la pulpa tratada a 200 MPa/3 min, la cual mostró disminución en el valor  $L^*$  (70.84) y en la pulpa sometida a 250 MPa/1.5 min la luminosidad aumentó ( $L^* = 73.23$ ) (Cuadro 3.2). Al respecto, Mukhopadhyay et al. (2017) observaron un incremento en la luminosidad del puré de melón sometido a 300, 400 y 500 MPa a 8 °C y 15 °C por 5 min, indicando brillantez de la superficie del puré. Asimismo, Landl et al. (2010), reportaron una tendencia creciente de los valores  $L^*$  en puré de manzana tratado a 400 y 600 MPa/5 min/20 °C, y reportaron que el aumento podría ser causado por la disrupción celular de pigmentos en la superficie del puré durante el tratamiento con alta presión, lo que da como resultado un valor mayor de luminosidad. Los valores de  $a^*$  y  $b^*$  de la pulpa de guanábana no cambiaron con los tratamientos de alta presión, excepto en las pulpas sometidas a 200 MPa/5 min, 250 MPa/1.5 min y 300 MPa/2.5 min, en las cuáles, los valores  $a^*$  [verde ( $-a^*$ ) a rojo ( $+a^*$ )], fueron menos negativos y los valores de  $b^*$  [azul ( $-b^*$ ) a amarillo ( $+b^*$ )] fueron mayores con respecto a los valores  $b^*$  de la pulpa no tratada con alta presión (Cuadro 3.2). En relación con esto, Zheng et al. (2014) investigaron el efecto de alta presión hidrostática (500 MPa/2 min) en el color de jugo de litchi y reportaron que no se observaron cambios en los valores  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  durante el tratamiento del jugo con alta presión. Por otra parte, la pulpa de guanábana sin tratar mostró un valor de croma  $C^* = 9.17$ , y las pulpas sometidas a alta presión no mostraron cambios significativos en los valores  $C^*$ , excepto las pulpas tratadas a 200

MPa/5 min, 250 MPa/1.5 min y 300 MPa/2.5 min. Las pulpas sometidas a alta presión tampoco mostraron cambios significativos en el valor de tono ( $h^*$ ), excepto las pulpas que se sometieron a 250 MPa/1.5 min y 300 MPa/2.5 min. Al respecto, Ahmed et al. (2005) observaron que los parámetros de color tales como los valores  $C^*$  y  $h^*$  de pulpas de mango permanecieron casi constantes después del tratamiento de alta presión indicando la estabilidad de los pigmentos. También Oey et al. (2008), reportaron que el tratamiento de alta presión (a baja y moderada temperaturas) tiene un efecto limitado en los pigmentos (clorofila, carotenoides, antocianinas, etc.) responsables del color de frutas y vegetales, sin embargo, los componentes de color de las frutas procesadas pueden cambiar durante el almacenamiento debido a la inactivación incompleta de enzimas y microorganismos, lo que puede provocar reacciones químicas no deseadas en la matriz alimentaria. La Figura 3.5 muestra el diagrama de color y los respectivos parámetros definidos ( $L^*$   $a^*$   $b^*$ ).

#### **3.5.4 pH, sólidos solubles totales y ácido ascórbico.**

Los cambios de pH en la pulpa de guanábana después de los tratamientos de altas presiones hidrostáticas se muestran en el Cuadro 3.3. El pH de la pulpa no tratada fue 3.91 y las pulpas que se sometieron a presión por tiempos más prolongados (200 MPa/7 min, 250 MPa por 3 y 5 min, y 300 MPa por 2, 2.5 y 3.5 min) mostraron una disminución del pH (3.88 a 3.89). En relación con esto, Kaushik et al. (2014) evaluaron los efectos del procesamiento a alta presión en un rango de 100 a 600 MPa durante 1 s a 20 min, a temperatura ambiente ( $30 \pm 2$  °C), sobre las propiedades fisicoquímicas en pulpa de mango (*Mangifera indica* cv. Amrapali) y observaron una disminución máxima en el pH de 0.26 unidades a 100 MPa durante 20 minutos de tratamiento. Se ha reportado que el procesamiento a la alta presión cambia el pH de los alimentos, ya que, la ionización de moléculas como el H<sub>2</sub>O se encuentra bajo presión, lo que aumenta la concentración de iones H<sup>+</sup> y,

por lo tanto, disminuye el pH (Heremans, 2002). Por otra parte, la pulpa de guanábana sometida a los tres niveles de presión (200, 250 y 300 MPa) no mostró cambios significativos en el contenido de sólidos solubles totales y ácido ascórbico (Cuadro 3.3). Existe evidencia de que el ácido ascórbico se vio mínimamente afectado por el tratamiento a alta presión en pulpas, jugos y bebidas vegetales (Andrés et al, 2016; Barba et al., 2012; Barba, Esteve y Frígola, 2010; Bull et al., 2004; Kaushik et al., 2014).

### **3.5.5 Contenido de fenoles totales.**

Los valores de fenoles totales en la pulpa de guanábana tratada por alta presión hidrostática, se muestran en el Cuadro 3.3. El contenido de fenoles totales en la pulpa no tratada fue 44.36 mg GAE 100 mL<sup>-1</sup>. En las pulpas tratadas a 200 MPa por 1, 3 y 5 min, se observó que el contenido de fenoles totales disminuyó 35.39, 37.00, y 33.32 mg GAE 100 mL<sup>-1</sup> de pulpa, respectivamente. La pulpa tratada a 300 MPa/1 min, también mostró disminución en el valor de fenoles totales (35.28 mg GAE 100 mL<sup>-1</sup> de pulpa). Sin embargo, las pulpas tratadas a 250 MPa (1.5 a 5 min) y 300 MPa (2 a 3.5 min), que fueron los tratamientos de presión más elevados y tiempos de exposición más prolongados, no mostraron cambios en el contenido de fenoles totales. Al respecto, Kaushik et al. (2014) investigaron los efectos del procesamiento a alta presión, 100–600 MPa durante 1 s–20 min a temperatura ambiente ( $30 \pm 2$  °C), sobre el contenido de fenoles totales en pulpa de mango (*Mangifera indica* cv. Amrapali) y reportaron que para períodos más largos de presurización ( $\geq 10$  min), los valores de fenoles totales disminuyeron significativamente para una presión de 100 y 200 MPa, mientras que el contenido de fenoles totales para tratamientos de presión más alta, de 300 a 600 MPa fue comparable a la pulpa de mango no tratada. Barba et al. (2012) procesaron jugo de arándano mediante alta presión (600 MPa/42 °C/5 min) y observaron que la aplicación del tratamiento de alta presión no causó diferencias significativas en el contenido de fenoles totales

con respecto a la concentración en jugo sin procesar. Por otra parte, Vega-Galvéz et al. (2014) evaluaron los efectos de alta presión hidrostática a 300, 400 y 500 MPa/1, 3 y 5 min en el contenido fenólico total de pulpa de grosella (*Physalis peruviana* L.) y cuando analizaron las muestras inmediatamente después de los tratamientos, observaron que algunos tratamientos aumentaron, mientras que otros redujeron el contenido inicial de fenoles totales en la pulpa, concluyendo que el tratamiento con alta presión hidrostática, debido a cambios en la microestructura de la pulpa de la fruta, produce cambios en la distribución y agregación de compuestos fenólicos.

### **3.5.6 Capacidad antioxidante total.**

Los valores de la capacidad antioxidante total, medida con el método TEAC en pulpa de guanábana, se muestran en el Cuadro 3.3. No se observaron diferencias significativas en la capacidad antioxidante ( $\mu\text{M TE}$ ) entre la pulpa tratada con alta presión hidrostática y la pulpa no tratada. Acerca de esto, Fernández García et al. (2001) informaron que no hubo cambios en la capacidad antioxidante determinada inmediatamente después del tratamiento con alta presión (500–800 MPa/temperatura ambiente/5 min) en jugo de naranja-limón-zanahoria. También, Barba et al. (2012) reportaron que justo después del tratamiento con alta presión (600 MPa/42 °C/5 min), la actividad antioxidante no se modificó significativamente en jugo de arándano. Sin embargo, Błaszczak et al. (2017) reportaron que los valores de capacidad antioxidante total para los jugos de aronia (*Aronia melanocarpa*) después de ser tratados con alta presión hidrostática (200–600 MPa durante 15 min), fueron en promedio un 8% más bajos, en comparación con los valores determinados para los jugos no tratados. Por otra parte, existen evidencias que la capacidad antioxidante total aumentó en smoothies de soya (Andrés et al., 2016) después de ser tratados con alta presión hidrostática (550 y 650 MPa/3 min/20 °C), y en puré de zanahoria sometido a 500 y 600 MPa/15 min/20 °C (Patras et al., 2009b). Por lo general, los tratamientos con alta presión

hidrostática influyen en el rendimiento de extracción de algunos compuestos bioactivos, sin embargo, el efecto de la presión sobre la actividad antioxidante no es el mismo entre los productos alimenticios, depende del tiempo del tratamiento, la temperatura y la matriz de los alimentos (Keenan et al., 2012; Oey et al., 2008).

### 3.6 CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo mostraron que, reducciones cercanas a  $5\text{-log}_{10}$  de *L. monocytogenes* en pulpa de guanábana se lograron a 250 MPa por 7 min y a 300 MPa por 3.5 min. Para este caso, donde *L. monocytogenes* se inoculó en pulpa de guanábana y se sometió a alta presión hidrostática, sería conveniente evaluar tiempos de exposición más prolongados para lograr reducciones mayores a  $5\text{-log}_{10}$ . El modelo de Weibull permitió una descripción precisa de la cinética de inactivación de *L. monocytogenes*, y los parámetros del modelo,  $p$  y  $\delta$ , variaron con la presión aplicada.

La pulpa de guanábana sometida a alta presión hidrostática 200 MPa (0, 1, 3, 5 y 7 min), 250 MPa (0, 1.5, 2.5, 3 y 5 min) y 300 MPa (0, 1, 2, 2.5 y 3.5 min), no mostró cambios significativos en el contenido de sólidos solubles totales, ácido ascórbico y capacidad antioxidante. Bajo algunas condiciones de tratamiento a 200 MPa, el pH y el contenido de fenoles totales en la pulpa disminuyó, pero la pulpa sometida a 250 y 300 MPa no mostró cambios significativos en el contenido de fenoles totales. Los tratamientos con alta presión hidrostática evaluados preservaron el color de la pulpa de guanábana y únicamente la pulpa sometida a 200 MPa/5 min, 250 MPa/1.5 min y 300 MPa/2.5 min, mostraron cambios en los parámetros de color.



### 3.7 REFERENCIAS

- Ahmed J, Ramaswamy HS, and Hiremath N. (2005). The effect of high pressure treatment on rheological characteristics and colour of mango pulp. *International Journal of Food Science and Technology* 40(8): 885–895.
- Albert I, and Mafart P. (2005). A modified Weibull model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology* 100: 197–211.
- Ali N, Popovi V, Koutchma T, Warriner K, and Zhu Y. (2020). Effect of thermal, high hydrostatic pressure, and ultraviolet-C processing on the microbial inactivation, vitamins, chlorophyll, antioxidants, enzyme activity, and color of wheatgrass juice. *Journal of Food Process Engineering*. 43: e13036. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13036>
- Alpas H, Kalchayanand N, Bozoglu F, and Ray B. (2000). Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 60: 33–42.
- Andrés V, Mateo-Vivaracho L, Guillamón E, Villanueva MJ, and Tenorio MD. (2016). High hydrostatic pressure treatment and storage of soy-smoothies: Colour, bioactive compounds and antioxidant capacity. *Food Science and Technology-Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 69: 123–130.
- Arancibia C, Costell E, and Bayarri S. (2011). Fat replacers in low-fat carboxymethyl cellulose dairy beverages: Color, rheology, and consumer perception. *Journal of Dairy Science* 94: 2245–2258.

- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). (2000). Vitamins and other nutrients. Official methods of analysis, 17<sup>th</sup> ed. Washington, D.C, USA.
- Barba FJ, Jäger H, Meneses N, Esteve MJ, Frígola A, and Knorr D. (2012). Evaluation of quality changes of blueberry juice during refrigerated storage after high-pressure and pulsed electric fields processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 14: 18–24.
- Barba FJ., Esteve MJ, and Frígola A. (2010). Ascorbic acid is the only bioactive that is better preserved by high hydrostatic pressure than by thermal treatment of a vegetable beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 10070–10075.
- Bermúdez-Aguirre D, and Barbosa-Cánovas GV. (2011). An Update on High Hydrostatic Pressure, from the Laboratory to Industrial Applications. *Food Engineering* 3: 44–61.
- Błaszczak W, Amarowicz R, and Górecki AR. (2017). Antioxidant capacity, phenolic composition and microbial stability of aronia juice subjected to high hydrostatic pressure processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 39: 141–147.
- Bull MK, Zerdin K, Howe E, Goicoechea D, Paramanandhan P, Stockman R, Sellahewa J, Szabo EA, Johnson RL, and Stewart CM. (2004). The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5: 135–149.
- Buzrul S, and Alpas H. (2004). Modeling the synergistic effect of high pressure and heat on inactivation kinetics of *Listeria innocua*: A preliminary study. *FEMS Microbiology Letters* 238(1): 29–36.

Conover WJ. (1999). *Practical Nonparametric Statics*. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Doona CJ, Feeherry FE, Ross EW, and Kustin K. (2012). Inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* by high-pressure processing: Pressure and temperature variation. *Journal of Food Science* 77(8): M458–M465.

Di Rienzo JA., Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Cuadroda M, and Robledo CW. (2019). InfoStat Version 2019. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Cordoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Espina L, García-Gonzalo D, Laglaoui A, Mackey BM, and Pagán R. (2013). Synergistic combinations of high hydrostatic pressure and essential oils or their constituents and their use in preservation of fruit juices. *International Journal of Food Microbiology* 161: 23–30.

Farkas DF, and Hoover DG. (2000). High pressure processing. *Journal of Food Science* 65: 47–64.

Fernández García, A, Butz P, Bognàr A, and Tauscher B. (2001). Antioxidative capacity, nutrient content and sensory quality of orange juice and an orange–lemon–carrot juice product after high pressure treatment and storage in different packaging. *European Food Research Technology* 213 (4–5): 290–296.

Fletcher GC, Youssef JF, and Sravani G. (2008). Research Issues in Inactivation of *Listeria monocytogenes* Associated with New Zealand Greenshell Mussel Meat (*Perna canaliculus*) Using High-Pressure Processing. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 17:2: 173–194.

- Gayán E, Torres JA, and Paredes-Sabja D. (2012). Hurdle Approach to Increase the Microbial Inactivation by High Pressure Processing: Effect of Essential Oils. *Food Engineering Reviews* 4: 141–148.
- Geeraerd AH, Valdramidis VP, and Van Impe JF. (2005). GIInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology* 102: 95–105.
- Heremans K. (2001). The effects of high pressure on biomaterials. In Hendrickx MEG and Knorr D (eds). *Ultra high pressure treatments of foods*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 23–51.
- Hereu A, Dalgaard P, Garriga M, Aymerich T, and Bover-Cid S. (2012). Modeling the high pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* on RTE cooked meat products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 16: 305–315.
- Kaushik N, Kaur BP, Srinivasa Rao P, and Mishra HN. (2014). Effect of high pressure processing on color, biochemical and microbiological characteristics of mango pulp (*Mangifera indica* cv. Amrapali). *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 22: 40–50.
- Keenan DF, Rößlea C, Gormley R, Butler F, and Brunton NP. (2012). Effect of high hydrostatic pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit smoothies. *Food Science and Technology-Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 45: 50–57.

- Landl A, Abadias M, Sárraga C, Viñas I, and Picouet PA. (2010). Effect of high pressure processing on the quality of acidified Granny Smith apple purée product. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11: 557–564.
- Mafart P, Couvert O, Gaillard S, and Leguerinel I. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology* 72: 107–113.
- Mañas P, and Pagán R. (2005). Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology* 98: 1387–1399.
- Maresca P, and Ferrari G. (2017). Modeling of the microbial inactivation by high hydrostatic pressure freezing. *Food Control* 73: 8–17.
- Mujica-Paz, H, Valdez-Fragoso A, Samson CT, Welti-Chanes J, and Torres JA. (2011). High-pressure processing technologies for the pasteurization and sterilization of foods. *Food and Bioprocess Technology* 4 (6): 969–985.
- Mukhopadhyay S, Kimberly S, Dike U, Xuetong F, and Vijay J. (2017). Effect of high hydrostatic pressure processing on the background microbial loads and quality of cantaloupe puree. *Food Research International* 91: 55–62.
- Muñoz-Cuevas M, Guevara L, Aznar A, Martínez A, Periago PM, and Fernández PS. (2013). Characterisation of the resistance and the growth variability of *Listeria monocytogenes* after high hydrostatic pressure treatments. *Food Control* 29(2): 409–415.

- Muñoz M, De Ancos B, Sánchez-Moreno C, and Cano MP. (2007). Effects of High Pressure and Mild Heat on Endogenous Microflora and on the Inactivation and Sublethal Injury of *Escherichia coli* Inoculated into Fruit Juices and Vegetable Soup. *Journal of Food Protection* 70(7): 1587–1593.
- Oey I, Lille M, Van Loey A, and Hendrickx M. (2008). Effect of high pressure processing on colour, texture and flavour of fruit and vegetable-based food products: a review. *Trends in Food Science & Technology* 19: 320–328.
- Parish ME, and Higgins DP. (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. *Journal of Food Protection* 52 (3): 144–147.
- Patterson MF, Ledward DA, and Rogers N. (2006). High pressure processing. In: Brenan JC (ed). *Food Processing Handbook*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Publishing, pp. 173–197.
- Patras A, Brunton NP, Da Pieve S, and Butler F. (2009a). Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10: 308–313.
- Patras A, Brunton N, Da Pieve S, Butler F, and Downey G. (2009b). Effect of thermal and high pressure processing on antioxidant activity and instrumental colour of tomato and carrot purées. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10: 16–22.
- Peleg M, and Cole MB. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38 (5): 353–380.

- Penchalaraju M, and Shireesha B. (2013). Preservation of foods by high-pressure processing: A review. *Indian Journal of Scientific Research and Technology* 1(3): 30–38.
- Possas A, Pérez-Rodríguez F, Valero A, García-Gimeno RM. (2017). Modelling the inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure processing in foods: A review. *Trends in Food Science & Technology* 70: 45–55.
- Rastogi NK, Raghavarao KSMS, Balasubramaniam VM, Niranjana K, and Knorr D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47(1): 69–112.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, and Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourisation assay. *Free Radical Biology Medicine* 26: 1231–1237.
- Rosenthal A, Pokhrel PR, da Rocha FEH, Tiburski JH, Barbosa-Cánovas GV, and Welti-Chanes JS. (2018). High Pressure Processing of Fruit Products. In: Rosenthal A, Deliza R, Welti-Chanes J, Barbosa-Cánovas GV (eds). *Fruit Preservation*. New York: Springer-Verlag, pp: 351–398.
- Saucedo-Reyes D, Carrillo-Salazar JA, Román-Padilla L, Saucedo-Veloz C, Reyes-Santamaría MI, Ramírez-Gilly M, and Tecante A. (2017). Modeling the pressure inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in sapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn) pulp. *Food Science and Technology International* 24(2): 117–131.

- Serment-Moreno V, Barbosa-Cánovas G, Torres JA, and Welti-Chanes J. (2014). High-pressure Processing: Kinetic Models for Microbial and Enzyme Inactivation *Food Engineering Reviews* 6: 56–88.
- Shapiro SS., and Wilks MB. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*. 52: 591–611.
- Tay A, Shellhammer TH, Yousef AE, and Chism GW. (2003). Pressure death and tailing behavior of *Listeria monocytogenes* strains having different barotolerances. *Journal of Food Protection* 66 (11): 2057–2061.
- Food and Drug Administration (FDA), Center for Food and Safety and Applied Nutrition, United States (FDA/CFSAN, US). (2000). Kinetics of microbial inactivation for alternative Food Processing Technologies. Disponible en: <https://www.fda.gov> (Accessed: 10 October 2019).
- Vega-Gálvez A, López J, Torres-Ossandón MJ, Galotto MJ, Puente-Díaz L, Quispe-Fuentes I, and Di Scala K. (2014). High hydrostatic pressure effect on chemical composition, color, phenolic acids and antioxidant capacity of Cape gooseberry Pulp (*Physalis peruviana* L.). *Food Science and Technology-Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 58: 519–526.
- Waterhouse AL. (2002). Determination of total phenolics. In: Wrolstad RE, Acree TE, An H, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Smith DM, and Sporns P (eds). *Current protocols in food analytical chemistry*. Hoboken: John Wiley and Sons, Inc., pp. 11.1.1–11.1.8



Zhao L, Wang Y, Wang S, Li H, Huang W, and Liao X. (2014). Inactivation of naturally occurring microbiota in cucumber juice by pressure treatment. *International Journal of Food Microbiology* 174: 12–18.

Zheng X, Yu Y, Xiao G, Xu Y, Wu J, Tang D, and Zhang Y. (2014). Comparing product stability of probiotic beverages using litchi juice treated by high hydrostatic pressure and heat as substrates. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 23: 61–67.

Zulueta A, Esteve MJ, and Frígola A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry* 114: 310–316.

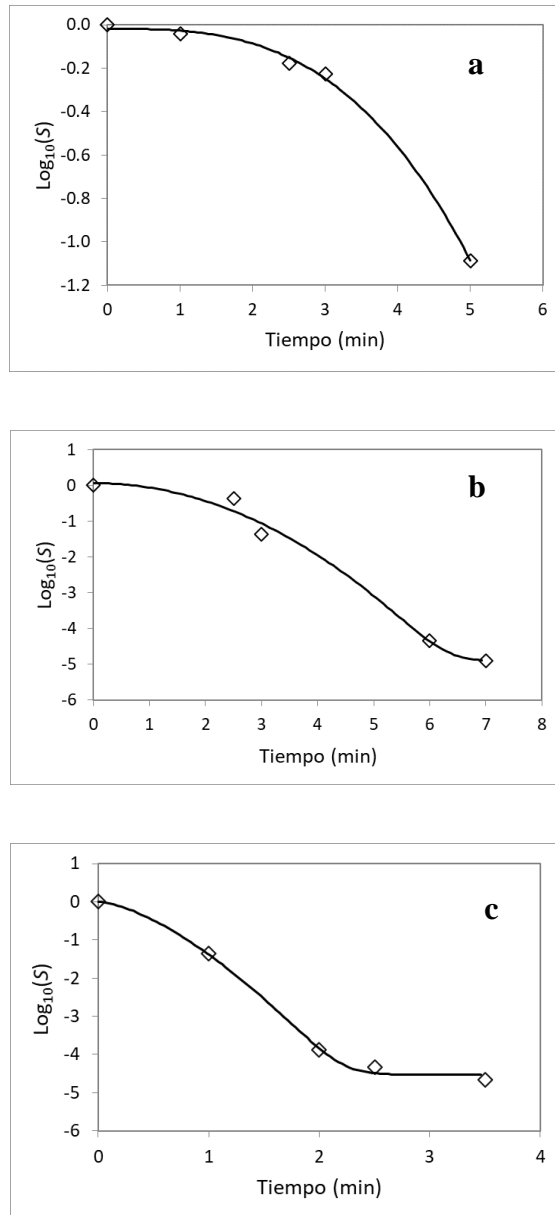


Figura 3.1 Curvas de sobrevivencia ( $\diamond$ ) de *L. monocytogenes* inoculada en pulpa de guanábana después del tratamiento con alta presión hidrostática a) 200 MPa, b) 250 MPa, c) 300 MPa. Curvas ajustadas (—) usando a) el modelo propuesto por Mafart et al. [ecuación (3.1)]; b) y c) el modelo modificado de Weibull propuesto por Albert y Mafart [ecuación (3.2)]. Los valores graficados representan la media de tres réplicas.

Cuadro 3.1 Parámetros cinéticos primarios y bondad de ajuste determinados para curvas de inactivación de *L. monocytogenes* en pulpa de guanábana sometida a alta presión hidrostática.

Presión (MPa)	Parámetros del modelo modificado de Weibull (ecuaciones (3.1) y (3.2))				5-Log <sub>10</sub> (min)	R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>	RMSE
	Log <sub>10</sub> N <sub>res</sub> ± <i>sd</i>	δ ± <i>sd</i>	<i>p</i> ± <i>sd</i>	Log <sub>10</sub> N <sub>0</sub> ± <i>sd</i>			
	Log <sub>10</sub> (UFC mL <sup>-1</sup> )	(min <sup>-1</sup> )		Log <sub>10</sub> (UFC mL <sup>-1</sup> )			
200	– <sup>a</sup>	4.89 ± 0.06	3.01 ± 0.26	–0.02 ± 0.02	24.45	0.9960	0.0284
250	–4.92 ± 0.52	2.83 ± 0.83	2.01 ± 0.71	0.06 ± 0.47	14.15	0.9569	0.4731
300	–4.53 ± 0.16	0.8 ± 0.15	1.50 ± 0.28	0.01 ± 0.21	4.00	0.9893	0.2129

*sd*, desviación estándar

<sup>a</sup> No hay cola (Figura 3.1(a))

Cuadro 3.2 Cambios en los parámetros de color en pulpa de guanábana después de los tratamientos con alta presión hidrostática.

Tratamiento	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*$	$h^*$
Control	71.12 <sup>bcd</sup>	-1.81 <sup>abc</sup>	8.99 <sup>abc</sup>	9.17 <sup>abc</sup>	101.37 <sup>cde</sup>
200 MPa/1 min	71.78 <sup>abc</sup>	-1.61 <sup>bc</sup>	9.77 <sup>bcd</sup>	9.9 <sup>bcd</sup>	99.36 <sup>bcd</sup>
200 MPa/3 min	70.84 <sup>a</sup>	-1.82 <sup>ab</sup>	9.11 <sup>ab</sup>	9.29 <sup>ab</sup>	101.3 <sup>de</sup>
200 MPa/5 min	72.18 <sup>de</sup>	-1.60 <sup>cd</sup>	9.78 <sup>de</sup>	9.91 <sup>de</sup>	99.27 <sup>abc</sup>
200 MPa/7 min	70.87 <sup>ab</sup>	-1.82 <sup>ab</sup>	9.09 <sup>ab</sup>	9.28 <sup>ab</sup>	101.31 <sup>de</sup>
250 MPa/1.5 min	73.23 <sup>e</sup>	-1.14 <sup>d</sup>	10.93 <sup>e</sup>	10.99 <sup>e</sup>	95.94 <sup>a</sup>
250 MPa/2.5 min	70.82 <sup>ab</sup>	-1.85 <sup>a</sup>	8.93 <sup>a</sup>	9.12 <sup>a</sup>	101.68 <sup>e</sup>
250 MPa/3 min	71.08 <sup>abc</sup>	-1.76 <sup>abc</sup>	9.37 <sup>bcd</sup>	9.53 <sup>bcd</sup>	100.56 <sup>bcd</sup>
250 MPa/5 min	70.98 <sup>ab</sup>	-1.82 <sup>ab</sup>	9.1 <sup>ab</sup>	9.28 <sup>ab</sup>	101.31 <sup>de</sup>
300 MPa/1 min	72.6 <sup>cde</sup>	-1.50 <sup>bc</sup>	10.12 <sup>cde</sup>	10.23 <sup>cde</sup>	98.42 <sup>bcd</sup>
300 MPa/2 min	71.04 <sup>ab</sup>	-1.79 <sup>ab</sup>	9.22 <sup>abc</sup>	9.39 <sup>abc</sup>	100.98 <sup>de</sup>
300 MPa/2.5 min	73.05 <sup>de</sup>	-1.40 <sup>cd</sup>	10.42 <sup>de</sup>	10.51 <sup>de</sup>	97.66 <sup>ab</sup>
300 MPa/3.5 min	71.15 <sup>abc</sup>	-1.83 <sup>ab</sup>	9.07 <sup>ab</sup>	9.25 <sup>ab</sup>	101.39 <sup>de</sup>

Los valores son medianas, n = 6.

Valores con letras diferentes dentro de la misma columna son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

$L^*$  (luminosidad),  $a^*$  (componente rojo),  $b^*$  (componente amarillo),  $C^*$  (croma) y  $h^*$  (tono).

Cuadro 3.3 pH, sólidos solubles totales (TSS), ácido ascórbico, contenido de fenoles totales (TPC) y capacidad antioxidante en pulpa de guanábana después de los tratamientos con alta presión hidrostática.

Tratamiento	pH	TSS (°Bx)	Ácido ascórbico (mg 100 mL <sup>-1</sup> )	TPC (mg GAE 100 mL <sup>-1</sup> )	Capacidad antioxidante (µM TE)
Control	3.91 <sup>d</sup>	4.7 <sup>a</sup>	0.37 <sup>a</sup>	44.36 <sup>c</sup>	8411.9 <sup>a</sup>
200 MPa/1 min	3.91 <sup>d</sup>	4.6 <sup>a</sup>	0.37 <sup>a</sup>	35.39 <sup>a</sup>	8872.0 <sup>a</sup>
200 MPa/3 min	3.90 <sup>bcd</sup>	4.6 <sup>a</sup>	0.37 <sup>a</sup>	37.00 <sup>a</sup>	7972.4 <sup>a</sup>
200 MPa/5 min	3.90 <sup>bcd</sup>	4.9 <sup>a</sup>	0.65 <sup>a</sup>	33.32 <sup>a</sup>	7619.7 <sup>a</sup>
200 MPa/7 min	3.89 <sup>a</sup>	4.6 <sup>a</sup>	0.37 <sup>a</sup>	41.71 <sup>abc</sup>	8902.0 <sup>a</sup>
250 MPa/1.5 min	3.91 <sup>cd</sup>	4.8 <sup>a</sup>	0.65 <sup>a</sup>	40.45 <sup>abc</sup>	8885.8 <sup>a</sup>
250 MPa/2.5 min	3.91 <sup>cd</sup>	4.6 <sup>a</sup>	0.37 <sup>a</sup>	39.99 <sup>abc</sup>	7195.7 <sup>a</sup>
250 MPa/3 min	3.90 <sup>abc</sup>	4.7 <sup>a</sup>	0.65 <sup>a</sup>	41.02 <sup>abc</sup>	8980.8 <sup>a</sup>
250 MPa/5 min	3.89 <sup>ab</sup>	4.6 <sup>a</sup>	0.37 <sup>a</sup>	43.67 <sup>bc</sup>	7616.0 <sup>a</sup>
300 MPa/1 min	3.91 <sup>cd</sup>	4.8 <sup>a</sup>	0.37 <sup>a</sup>	35.28 <sup>ab</sup>	9523.9 <sup>a</sup>
300 MPa/2 min	3.88 <sup>a</sup>	4.6 <sup>a</sup>	0.37 <sup>a</sup>	44.47 <sup>c</sup>	6716.8 <sup>a</sup>
300 MPa/2.5 min	3.90 <sup>abc</sup>	4.8 <sup>a</sup>	0.65 <sup>a</sup>	40.10 <sup>abc</sup>	8047.9 <sup>a</sup>
300 MPa/3.5 min	3.89 <sup>a</sup>	4.8 <sup>a</sup>	0.37 <sup>a</sup>	44.36 <sup>c</sup>	8790.2 <sup>a</sup>

Valores son medianas, n = 3. Para pH y TSS, n = 5.

Valores con letras diferentes dentro de la misma columna son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

## CONCLUSIONES GENERALES

Se concluye que, una reducción 5- $\log_{10}$  de *L. monocytogenes* se logró a 50.0 °C/60 min y, sólo bajo esta condición de temperatura y tiempo de exposición, no se afectaron significativamente el contenido de ácido ascórbico y fenoles totales en la pulpa de guanábana.

Reducciones cercanas a 5- $\log_{10}$  de *L. monocytogenes* se lograron a 300 MPa por 3.5 min, y la pulpa de guanábana no mostró cambios en color, pH, sólidos solubles totales, ácido ascórbico, contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante. Por lo tanto, se sugiere que, en futuras investigaciones, aumentar en tiempo de exposición a alta presión hidrostática para lograr un mayor nivel de inactivación de *L. monocytogenes*.

## ANEXOS

### ANEXO A

#### A1. Equipo de altas presiones hidrostáticas



Figura 3.1 Equipo de altas presiones hidrostáticas.

Fuente: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), Paterna, Valencia, España.

## A2. Curvas de calibración.

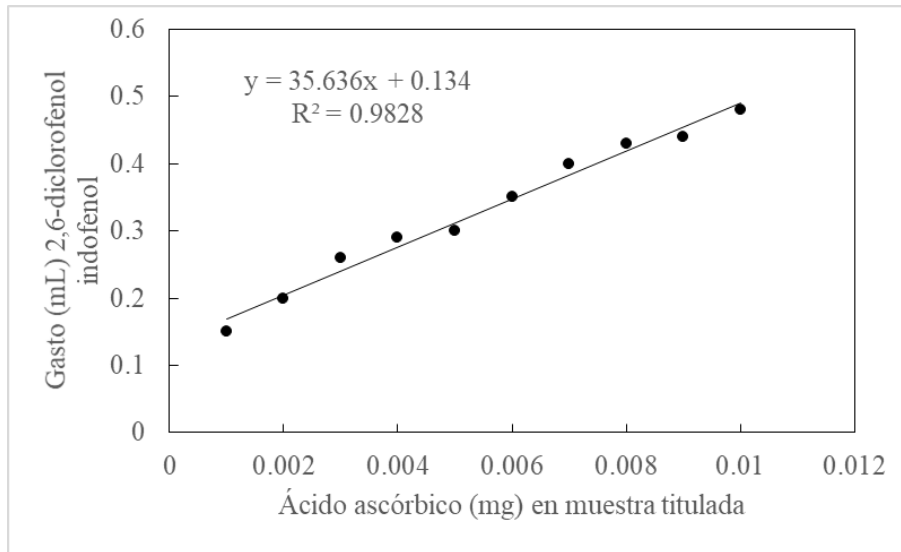


Figura 3.2 Curva de calibración generada con ácido ascórbico para el cálculo del contenido de ácido ascórbico en pulpa de guanábana.

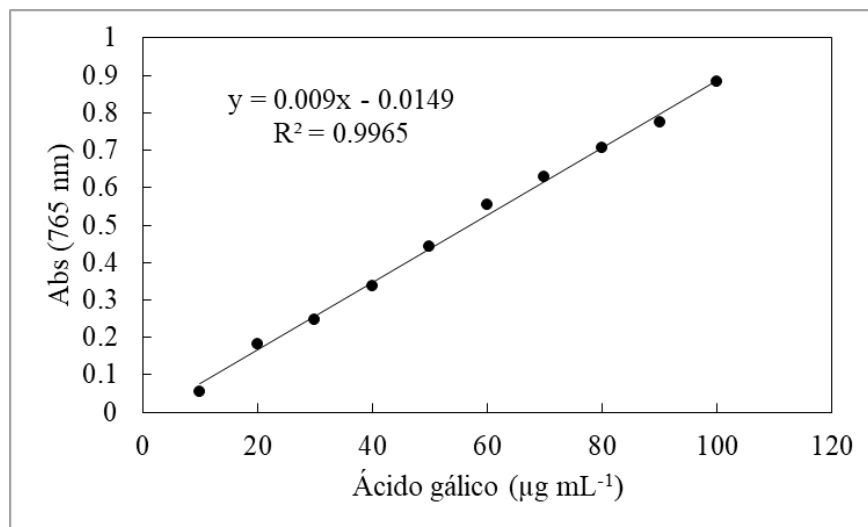


Figura 3.3 Curva de calibración preparada con ácido gálico para el cálculo del contenido de fenoles totales en pulpa de guanábana.



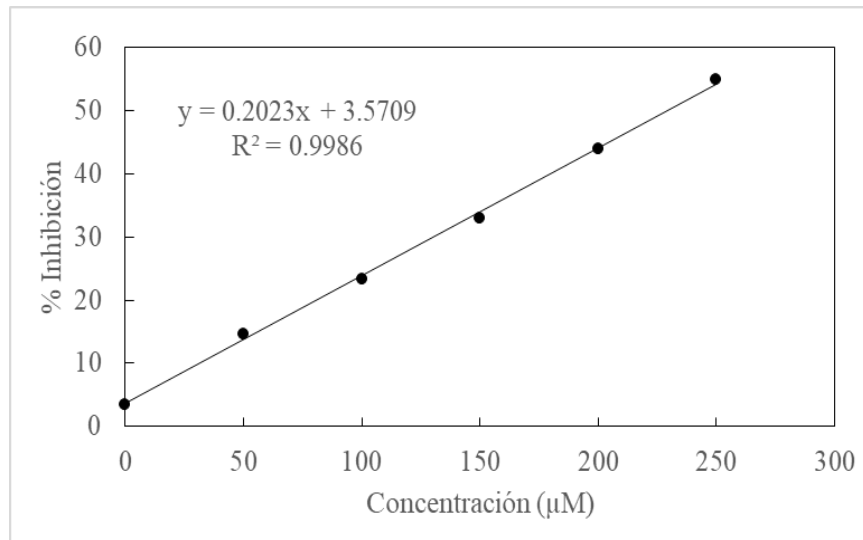


Figura 3.4 Curva de calibración obtenida a partir de disolución de Trolox, rango de concentración de 0 – 250 µM, para el cálculo de capacidad antioxidante total en pulpa de guanábana.

## ANEXO B. Diagrama de color.

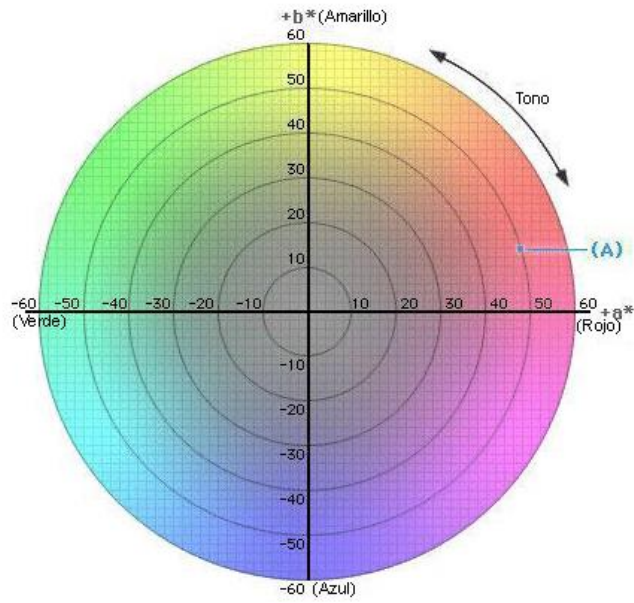


Figura 3.5 Diagrama de color CIE Lab.



## Effect of moderate thermal treatments on the inactivation of a strain of *Listeria monocytogenes* and physicochemical properties of soursop pulp

Almadalia Velasco-Hernández<sup>1</sup>, Crescenciano Saucedo-Veloz<sup>1</sup>, Martha Elva Ramírez-Guzmán<sup>1</sup>, Sergio Humberto Chávez-Franco<sup>1</sup>, Salvador Valle-Guadarrama<sup>2</sup> and Daniela Saucedo-Reyes<sup>1</sup> 

### Abstract

Soursop (*Annona muricata* L.) is a commercially important tropical fruit, whether fresh or processed as a pasteurized or frozen pulp used to prepare juice, drinks, nectar, ice cream, popsicles, and desserts. Besides preserving quality, another preoccupation in the processing of fruit pulps is product safety. Several studies show the association between pulp processing and the development of various microorganisms; however, few have focused on the association between *L. monocytogenes* and the pulp of sour fruits. The objective was to evaluate the effect of moderate thermal treatments on the inactivation of *L. monocytogenes* and the physicochemical properties in soursop pulp in order to determine the best processing conditions that will allow to maintain quality as well as to achieve an adequate level of safety. Thermal inactivation kinetics were obtained for *L. monocytogenes* inoculated in soursop pulp at five levels of temperature (50, 52.5, 55, 57.5, and 60 °C) and different exposure times (0–60 min). The survival curves did not suggest a log-linear relationship, and were, consequently, fitted to the modified Gompertz equation. The results indicated that the modified Gompertz equation provided an acceptable goodness of fit. Five-log<sub>10</sub> cycles reductions of *L. monocytogenes* were achieved at 50 °C/60 min, 52.5 °C/16 min, 55 °C/10 min, 57.5 °C/5 min, and 60 °C/1.25 min. These 5-log<sub>10</sub> treatments applied to the soursop pulp indicated that the soursop pulp showed changes in the color parameters and a decrease in the content of total sugars, reducing sugars, ascorbic acid, total phenols, and pH.

### Keywords

Soursop pulp, *Listeria monocytogenes*, thermal treatment, inactivation kinetics

Date received: 3 September 2019; accepted: 25 February 2020

## INTRODUCTION

Within the Annonaceae family, soursop (*Annona muricata* L.) stands out for producing highly appreciated fruits given their palatable sweet-sour taste, soft texture, and delicate aroma, besides their high content of antioxidant compounds that give them a high added value (Baskaran et al., 2016; Jiménez et al., 2014). Physiologically, the fruits are highly perishable due to

their elevated respiration rate and ethylene production, and thus may last 3–4 days at 24 °C, and 1–2 weeks at 13 °C (Pareek et al., 2011). Because of this, the fruits are mainly commercialized as a processed product, either frozen or pasteurized pulp, which is used to make juice, nectar, ice cream, popsicles and desserts (Jiménez et al.,

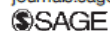
Food Science and Technology International 0(0) 1–14

© The Author(s) 2020 Article reuse guidelines:

sagepub.com/journals-permissions

DOI: 10.1177/1082013220913357

journals.sagepub.com/home/fst



<sup>1</sup>Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, México

<sup>2</sup>Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, México

### Corresponding author:

Daniela Saucedo-Reyes, Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, 56230, Montecillo, Texcoco, México.

Email: danielareyes\_4@hotmail.com

2014; Leite et al., 2016). Furthermore, pulp dilution (water addition) is a common practice justified by some producers as a way to improve the pulping step efficiency. The amount of water to add is determined by the final pulp consistency and texture desired depending on the final use projected (Francis and Bellot, 2003).

Besides preserving their organoleptic and nutritional quality and nutraceutical value, another preoccupation in processing sour pulps is related with the safety of the product. In this sense, there are reports (De Oliveira et al., 2018; Lima Tribst et al., 2009) about the most relevant outbreaks involving foodborne pathogens and spoilage microorganisms associated with fruit juices and pulps but, there are few studies related to the growth and survival of *L. monocytogenes* in the pulp of sour fruits like soursop (Caggia et al., 2009; Von Breymann et al., 2013).

Contamination by *L. monocytogenes* happens during the postharvest handling of the fruit and preparation for processing, making it difficult to avoid cross-contamination; moreover, it is hard to maintain the food processing plants free of this microorganism due to its capability to form biofilms (Carpentier and Cerf, 2011; Ferreira et al., 2014). According to Von Breymann et al. (2013), *L. monocytogenes* has the ability to survive and develop in fruit pulp, tolerating low pH conditions and low water activity. Furthermore, it is tolerant to a wide range of pasteurization treatments (Mazzotta, 2001) and can grow in frozen conditions (Vitas et al., 2004); thus, commercially, fruit pulp preservation is supplemented with chemical additives like sodium benzoate or potassium sorbate (Von Breymann et al., 2013). Nevertheless, the preference for additive-free fruit pulp management leads to the need to carry out research work that associates the physicochemical characteristics of the pulp and the treatment to be applied to control *L. monocytogenes*. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the effect of moderate thermal treatments on the inactivation of *L. monocytogenes* and the physicochemical quality of soursop pulp to determine the best processing conditions that allow to maintain quality and achieve an adequate safety level.

## MATERIALS AND METHODS

### Process to obtain the pulp

Soursop fruits in ripe stage were used (pH = 3.74, firmness of 8.2 N, total soluble solids of 8.1 °Bx, and titratable acidity of 0.74% citric acid); these were acquired from sellers located in the Wholesale Supply Market of Mexico City. The fruits were washed and disinfected with a 0.01% sodium hypochlorite solution. Subsequently, the peels and seeds were removed under aseptic conditions.

To facilitate handling of the pulp during the experimental tests, water was added at a 1:1 ratio to obtain a smooth pulp that is easy to filter (Francis and Bellot, 2003). The mix was homogenized in a glass mixer (Osterizer, Mod. 6644-13), filtered (sieve no. 45, Series ASTM E-11, 0.355 mm), and kept at -63 °C until it was used for inactivation studies and soursop quality evaluation, respectively.

### Bacterial strain and cell culture preparation

A single strain of *L. monocytogenes*, ATCC 7644, was used for this study. The strain was obtained from the strain collection of the Autonomous National University of Mexico (UNAM) and placed in cystine trypticase agar (CTA; Bioxon, Decton Dickinson, Mexico City, Mexico) at 5 °C.

To reproduce the cells, an aliquot was taken with a sterile wire and transferred to 100 mL sterile brain-heart infusion broth (BHI broth, BD/Bioxon, Becton Dickinson, Mexico City, Mexico). Immediately, the cells were incubated at 37 °C for 24 h under continuous agitation at 200 r/min to obtain cells in the stationary growth stage. Then, the cells were centrifuged twice at 4000 × g for 15 min at 4 °C (Hermle, Z 446 K, Wehingen, Germany), and re-suspended in 50 mL sterile BHI.

The initial cultures were placed in 2 mL sterile plastic cryovials containing BHI supplemented with 20% sterile glycerol at a 1:1 ratio. Subsequently, the samples were stored at -63 °C until use for studies on heat inactivation. The estimated concentration of *L. monocytogenes* was 10<sup>9</sup> CFU mL<sup>-1</sup>.

### Thermal treatments

Thermal treatments through capillaries were developed according to Vega et al. (2016). Subsequently, 9 mL sterile pulp (pH = 3.75) were inoculated with 1 mL of the *L. monocytogenes* cell suspension, previously unfrozen and acclimatized to room temperature. The inoculated pulp was homogenized in a vortex shaker (mod. MX-S, 60 W, ScienceMed, Helsinki, Finland). Glass capillary tubes (intraMARK, BLAUBRAND®, Wertheim, Germany), previously sterilized at 250 °C for 24 h and acclimatized, were filled with 100 µL inoculated pulp. Both ends of the tubes were immediately sealed, one end with high-vacuum silicon grease (Dow Corning®, Midland, USA) and the other with fire. The tubes were sealed carefully to avoid heating of the inoculated pulp. The thermal treatment was done by submerging the capillaries in a recirculating water bath (Tempstir™, Precision Scientific Company, Tamil Nadu, India) at controlled temperatures: 50.0 ± 1 °C, 52.5 ± 1 °C, 55.0 ± 1 °C, 57.5 ± 1 °C, and 60.0 ± 1 °C, at different



time intervals (0–60 min), and immediately cooled in an ice-water bath. The time needed to reach the treatment temperatures (come-up time) was approximately 3 s; the come-up time was excluded. A set of four capillaries was used for each combination of temperature and time. A set of untreated capillary tubes was used as control.

### Enumeration of *L. monocytogenes*

Serial decimal dilutions of the treated and untreated samples were done in 0.1% (w/v) sterile peptone water (PW, BD/Difco Laboratories, Sparks, MD, USA). Aliquots of 0.1 mL of the diluted solution were placed in Petri dishes, in duplicate, and the enumeration medium used was sterile tryptone soy agar (TSA, BD/Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). The selected dilutions were incubated at 37 °C for 48 h. Subsequently, counting was done. The reduction of viable cells was expressed as the decimal logarithm of the quotient of the treated ( $N$ ) and untreated ( $N_0$ ) cells.

### Mathematical modeling and validation of the predictive model

The modified Gompertz equation was adjusted (equation (1)) (Linton et al., 1995, 1996) to the heat inactivation curves of *L. monocytogenes* in soursop pulp.

$$\text{Log} \frac{N}{N_0} = C e^{-e^{BM}} - C e^{-e^{-B(t-M)}} \quad (1)$$

where  $N$  and  $N_0$  represent the final and initial microbial count, respectively;  $B$  is the relative death rate at  $M$  [ $\text{Log}_{10} (\text{CFU mL}^{-1}) \text{ min}^{-1}$ ];  $C$  is the difference in the value of the upper and lower asymptote [ $\text{Log}_{10} (\text{CFU mL}^{-1})$ ];  $M$  is the time (min) at which the absolute death rate is maximum; the minus sign before  $C$  means the inactivation of microorganisms, and  $t$  is the time (min).

Also, through the  $B$  and  $C$  parameters of the modified Gompertz equation, the maximum exponential death rate,  $\mu_{\text{max}}$ , was calculated (equation (2)) (McMeekin et al., 1993)

$$\mu_{\text{max}} = \frac{BC}{e} \quad (2)$$

The goodness of fit was assessed from the adjusted determination coefficient ( $R^2_{\text{adj}}$ ) and the root mean square error ( $RMSE$ ) (Ly-Nguyen et al., 2003), described by equations (3) and (4), respectively.

$$R^2_{\text{adj}} = 1 - \frac{(n-1) \left( 1 - \frac{SQO_{\text{regression}}}{SQO_{\text{total}}} \right)}{(n-p)} \quad (3)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{SQO_{\text{residual}}}{(n-p)}} \quad (4)$$

where  $n$  is the number of observations,  $SQO$  is the sum of squares, and  $p$  is the number of parameters in the model.

The prediction capacity of the experimental model based on the modified Gompertz equation (equation (1)) was determined by calculating the accuracy factor ( $A_f$ ), which is the absolute value of the relationship between the predictions and the observed data (equation (5)), and the bias factor ( $B_f$ ), which represents the general mean of the relationship between the predictions and the observed data (equation (6)) through a group of data not used in the model (Ross, 1996).

$$A_f = 10^{\frac{1}{n} \left| \sum \text{Log}_{10} \left( \frac{X_p}{X_o} \right) \right|} \quad (5)$$

$$B_f = 10^{\frac{1}{n} \sum \text{Log}_{10} \left( \frac{X_p}{X_o} \right)} \quad (6)$$

where  $n$  is the total number of observations,  $X_p$  is the predicted value, and  $X_o$  is the observed value.

### Microbiological and physicochemical analysis

For the studies on the effect of the moderate thermal treatments on the microbiological quality and physicochemical properties of the soursop pulp, the temperatures and exposition times that comply with the 5- $\text{log}_{10}$  criterion of the study microorganism were selected; criterion established by the FDA (2004) for pasteurized products. To do this, 200 mL pulp was placed in sterile glass flasks and submerged in recycling water bath (Tempstir<sub>tm</sub>, Precision Scientific Company, Tamil Nadu, India), and subjected to the selected thermal treatments. Subsequently, the flasks were removed and cooled in ice-water bath. The untreated pulp was used as control.

**Microbiological analyses.** After each thermal treatment, the pulp samples were analyzed to count total coliforms, aerobic mesophiles, *E. coli*, yeasts, and molds by plate pouring method. The samples were serially diluted with 0.1% sterile peptone water (PW, BD/Difco Laboratories, Sparks, MD, USA), and aliquots of 0.1 mL of the diluted solution were placed in plates, in duplicate, pouring potato dextrose agar (PDA agar, BD/Difco Laboratories, Sparks, MD, USA) on the plates to count yeasts and molds; violet red bile agar (VRBD agar, BD/Difco Laboratories, Sparks, MD, USA) for total coliforms; nutrient agar (NA agar, BD/Difco Laboratories, Sparks, MD, USA) for aerobic mesophiles; and tryptone bile X-glucuronide agar

(TBX agar, Sigma-Aldrich) for *E. coli*. The plates were incubated at 37°C for 48 h for aerobic mesophiles, total coliforms, and *E. coli*, and at 25°C for five days for yeasts and molds. Subsequently, the count was done (CFU mL<sup>-1</sup>). The analyses were repeated three times in separate assays.

**Color measurement.** The color parameters,  $L^*$ ,  $a^*$ , and  $b^*$ , were measured in the treated and untreated pulp using a D-25 PC2 colorimeter (Hunter Lab, VA, USA). The sample was placed in a 90 mL optical glass cell (Hunter Lab VA USA).  $L^*$  represents the luminosity of the samples (0 = black to 100 = white) and the  $a^*$  and  $b^*$  values indicate variation in hue from green to red (-60 to +60) and from blue to yellow (-60 to +60), respectively (Pinheiro et al. 2013). The total color difference ( $\Delta E^*$ ) and browning index ( $BI$ ) were calculated using equations (7) and (8) respectively (Ferrari et al., 2010).

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (7)$$

where  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$ , and  $\Delta b^*$  are the differences between the treated sample and the control in  $L^*$ ,  $a^*$ , and  $b^*$ , respectively.

$$BI = [100(x - 0.31)]/0.172 \quad (8)$$

where

$$x = (a^* + 1.75 L^*) / (5.645 L^* + a^* - 3.012 b^*)$$

**Total soluble solids, pH, and titratable acidity.** Total soluble solids (TSS), pH, and titratable acidity were determined through standard methodologies (AOAC, 1990). TSS were quantified using a refractometer (Atago PAL-1, Tokyo, Japan). The pH was measured with a pH-meter (HI 2210, Hanna Instruments, Romania, EU). The titratable acidity was determined through the titration method with NaOH 0.1 N using phenolphthalein as indicator.

**Ascorbic acid.** The ascorbic acid content was determined through the titration method (AOAC, 2000). Three mL of the sample were diluted with 30 mL oxalic acid 0.5g/100 mL. A 5 mL aliquot was titrated using a 2,6-dichlorophenol indophenol solution. The results were expressed as mg ascorbic acid in 100 mL pulp (mg 100 mL<sup>-1</sup>).

**Total sugars.** The total sugars (mg mL<sup>-1</sup>) were quantified using the anthrone method (Witham et al., 1971). For sugar extraction, 1 mL pulp was mixed with 60 mL

99.9% ethyl alcohol (J. T. Baker) and water (8:2 v/v). The mixture was boiled down to 20 mL. Then, 1 mL of the extract was evaporated at 60°C for 15 min. The residue was immediately dissolved with 60 mL distilled water. Subsequently, 1 mL of this solution was mixed with 2 mL distilled water and 6 mL 0.4% anthrone solution (0.4 g anthrone in 100 mL 98.8% sulfuric acid). Then, the mixture was placed in boiling water for 3 min, cooled with ice water, and absorbance was measured at 600 nm (Spectronic 20, Milton Roy, Houston, TX, USA), using a mix of 3 mL distilled water and 6 mL 0.4% anthrone as a blank. Total sugars were calculated through interpolation of the values on a calibration curve prepared with glucose.

**Reducing sugars.** The sugar extraction was prepared as described in the previous section. The reducing sugars were quantified according to Nelson (1944) and Somogy (1952). To do this, 1 mL of the extract was evaporated at 60°C for 15 min. The residue was immediately dissolved with 60 mL distilled water. Subsequently, 1 mL of this solution was mixed with 1 mL of the Nelson-Somogy reagent. This reagent was prepared by mixing 2.5% anhydrous sodium carbonate, 2.5% potassium sodium tartrate, 2% sodium bicarbonate, 2% anhydrous sodium sulfate, and 15% copper sulfate. Later, the mixture was placed in water at 80°C for 15 min, cooled in ice water, and added 1 mL arsenic molybdate reagent (5.5% ammonium molybdate, 12% sodium arsenite, 98.8% and sulfuric acid). Immediately 7 mL distilled water were added and absorbance was measured at 540 nm (Spectronic 20, Milton Roy, Houston, TX, USA) using a mix of 8 mL distilled water, 1 mL Nelson-Somogy reagent, and 1 mL arsenic molybdate reagent as a blank. The reducing sugars were calculated through interpolation of the values on a calibration curve prepared with glucose. The results were expressed as mg glucose in 1 mL pulp (mg mL<sup>-1</sup>).

**Total phenolic content.** The total phenolic content (TPC) was determined according to the method described by Waterhouse (2002), with some modifications. To do this, 1 mL soursop pulp was mixed with 10 mL methanol-water (8:2 v/v) and left to sit for 24 h. Subsequently, 200 µL of the extract was mixed with 1.5 mL distilled water and 0.1 mL of the Folin-Ciocalteu reagent (1:1 (v/v)). After three min, 0.2 mL of a sodium carbonate solution (20% (w/v)) was added. The mixture was stirred and incubated at room temperature in the dark for 1 h. Absorbance was measured at 765 nm using a spectrophotometer (Spectronic® Genesys™ 5, Spectronic Instruments Inc., Rochester, NY, USA). The TPC was calculated through interpolation of the values on a calibration curve prepared with gallic acid.

The results were expressed as gallic acid equivalents (GAE) in 100 mL pulp ( $\text{mg GAE } 100 \text{ mL}^{-1}$ ).

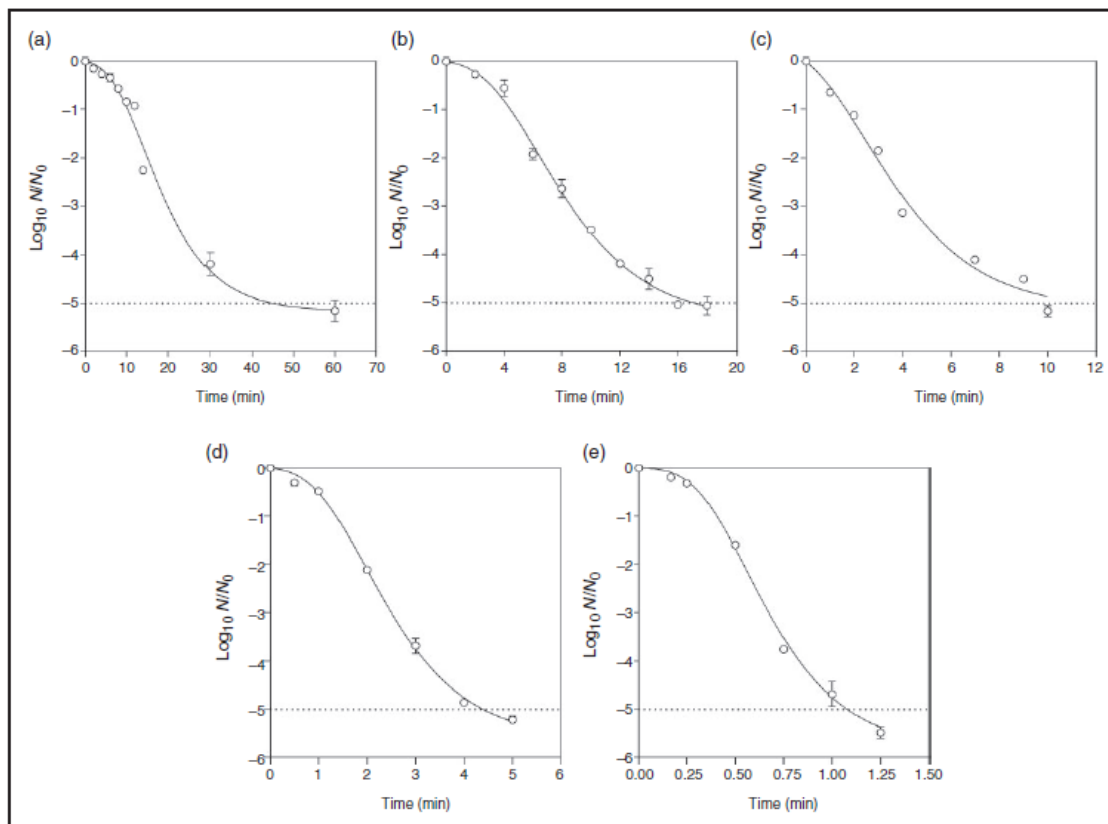
### Statistical analysis

The analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the effects of the intensity of temperature and time on the soursop pulp using  $n=3$  for the studies on *L. monocytogenes* inactivation and  $n=5$  for the physicochemical determinations (color, pH, titratable acidity TSS, ascorbic acid, total sugars, reducing sugars, and TPC) in each  $5\text{-log}_{10}$  treatment. The multiple range test (MRT) and the Fisher distribution (LSD) were calculated to compare the treatments ( $p < 0.05$ ) and contrast equality of variance. The statistical analyses were done using the Statgraphics Centurion XV software (Statpoint Technologies Inc, Warrenton, VA, USA), and the adjustments of the mathematical model with the GraphPad PRISM program PRISM (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Inactivation of *L. monocytogenes*

The survival curves were obtained by graphing the logarithm of the surviving fraction of *L. monocytogenes* cells inoculated in the soursop pulp after the applied temperatures (50.0, 52.5, 55.0, 57.5, and 60.0 °C) and the exposure times (0–60 min) (Figure 1), where the increase of temperature was observed to lead to a decrease of the surviving fraction of the microorganism in shorter timeframes. According to the safety criterion given by the FDA (2004) and the NACMCF (2006) for pasteurized products,  $5\text{-log}_{10}$  cycles reductions of *L. monocytogenes* in soursop pulp were achieved at: (1) 50.0 °C, 60 min (Figure 1(a)); (2) 52.5 °C, 16 min (Figure 1(b)); (3) 55.0 °C, 10 min (Figure 1(c)); (4) 57.5 °C, 5 min (Figure 1(d)); and (5) 60.0 °C, 1.25 min (Figure 1(e)). Some authors have proven the effectiveness of moderate thermal treatments to inactivate *L. monocytogenes* in different fruit extracts.



**Figure 1.** Survival curves (○) of *L. monocytogenes* inoculated in thermally treated soursop pulp (a) 50.0 °C, (b) 52.5 °C, (c) 55.0 °C, (d) 57.5 °C, (e) 60.0 °C. Adjusted curves (–) using the modified Gompertz equation (equation (1)). The graphed values and the error bars represent the mean of three replicates and the corresponding standard deviation.



Benloch-Tinoco et al. (2014) found that in order to achieve a 5- $\log_{10}$  reduction of *L. monocytogenes* in kiwi puree (pH = 3.39) when subjected to 55°C, they required more than 5.92 min. Siguemoto et al. (2018) reported that the safety criterion given by the FDA (5- $\log_{10}$  reduction) and the NACMCF (2006) was achieved with a thermal treatment at 55°C for 180 s (3 min) in apple juice (pH = 3.5). Also, Hassani et al. (2005) reported that 5- $\log_{10}$  cycles of *L. monocytogenes* were inactivated in a reference medium (pH = 4) when it was subjected to 58°C for 1.4 min. It has been reported that the destruction of the microorganisms through thermal treatments can be affected not only by temperature, but also by the characteristics of the substrate such as pH, water activity or the presence of chemical preservatives (Mañas et al., 2003; Murphy et al., 2002; Peleg and Cole, 1998).

Studies on the thermal inactivation of microorganisms by capillary method have been reported as an accurate procedure to measure heat resistance with the advantage of shorter come up times compared to other methods that could reduce thermal lag time, and the use of lower volumes with high concentrated microbial suspensions. By this method, both linear and non-linear behaviors have been observed in survival curves attributed to differences, for example, in food substrates composition (pH, solid content, water activity, among others), strain used, temperature range, and heating method (Fernández et al., 1999; Fujikawa et al., 2000, 2001; Vega et al., 2016). In the case of linear inactivation behavior, Fairchild and Foegeding (1993) studied the heat resistance of *L. monocytogenes* and *L. innocua* M1 in skim milk; *D* values were determined ranging from 38.5 s at 61.8°C to 1.4 s at 69.5°C, and *z* values of 5.5 and 5.6°C, respectively. The thermal resistances were similar between them and shoulders were not observed in the survival curves. In case of non-linear behavior, deviations from the linearity have been often observed in thermal inactivation of microorganism studies such as curves with shoulders and/or tails. Linton et al. (1996) explained that a shoulder region may be more pronounced in food systems with high NaCl content or near neutral pH. Therefore, an increase in temperature, or a reduction of pH or NaCl at low temperatures could be suitable strategies for decreasing shoulders associated with survival curves. In the inactivation curves obtained (Figure 1), the shoulders were shorter at higher temperatures. Garre et al. (2017), Geeraerd et al. (2005) and Mossel et al. (1995) described the shoulder effect under the hypothesis of the presence of a theoretical substance  $C_c$  around or in each cell, that exists and inhibits microbial inactivation; moreover, this theoretical substance is destroyed gradually. On the other hand, the generation of heat shock proteins in microbial cells during heating

might be related to tailing, which is possibly the effect of a thermo-resistant subpopulation (Fujikawa et al., 2001). Vega et al. (2016) studied the isothermal inactivation curves of *L. innocua* CECT 910 in a vegetable beverage by the capillary method where the cells were exposed to three pH levels (4.25, 4.75, and 5.20), four temperature levels (50, 55, 60, 65°C), and different exposure times (0–75 min). The modified Gompertz equation provided the best goodness-of-fit for describing the non-linear survival curves with shoulders and tails, and the temperature and time were the most influential factors affecting the final microbial load in the case of the higher temperature level (65°C), and the time in the case of the lower temperature level (50°C) tested. Fujikawa et al. (2000, 2001) studied the thermal inactivation of *Aspergillus niger* spores at temperatures ranging from 55 to 66°C by capillary method, and reported inactivation curves with shoulder, fast linear decline, and/or a sloping tail. Author pointed out that shoulders were shorter at higher temperatures and the tail region, described as slope, was temperature dependent.

#### Adjustment of the mathematical model

Figure 1 shows that the inactivation curves of *L. monocytogenes* in thermally treated soursop pulp deviated notably from linearity, presenting a sigmoidal behavior. Therefore, the inactivation curves were adjusted through the modified Gompertz equation non-linear model (equation (1)), versatile for the adjustment of non-linear inactivation curves (Saucedo-Reyes et al., 2017; Vega et al., 2016). The modified Gompertz equation can be used to model the sigmoidal survival curves of *L. monocytogenes* inoculated in thermally pasteurized foodstuffs (Linton et al., 1995, 1996). In thermal studies it is probable that the modified Gompertz equation provides a more precise estimation of the resistance of a microorganism than does the first order model (Bhaduri et al., 1991).

There is enough evidence on the thermal resistance of *L. monocytogenes* in different substrates. Some authors have found non-linear survival curves, and the Weibull distribution (Char et al., 2010; Fernández et al., 2007; Siguemoto et al., 2018), the modified Gompertz equation (Chhabra et al., 1999; Huang, 2009; Linton et al., 1995, 1996), and other non-linear functions (Cole et al., 1993; Xiong et al., 1999), have proven to adequately adjust to the survival curves of *L. monocytogenes*. Other studies have reported that when the survival curves have a linear tendency a first order kinetic is still the most used way to describe the kinetic behavior under thermal treatment (Awuah et al., 2007; Hassani et al. 2005).

Some computational applications used for the regression procedures on the thermal inactivation of



*Listeria* spp., where a “shoulder” and/or “tailing” region have been widely reported with an acceptable goodness of fit are: SAS (Statistical Analysis System) in Stephens et al. (1994), JMP (Statistical Analytical Systems, Cary, NC) in Linton et al. (1995, 1996), SPSS package 6.1.2 in Xiong et al. (1999), GraphPad PRISM in Hassani et al. (2005), FORTRAN 77 language (Fortran 5.1, Microsoft Corporation®, 1990) in Gil et al. (2006), Statistica® 6.0 (Statsoft, USA) and Microsoft® Excel 2000 (Microsoft Corporation, USA) in Miller et al. (2009), GInaFit tool and Statgraphics Centurion XV (Statpoint Inc.) in Vega et al. (2016). Bioinactivation FE is a recent software proposed by Garre et al. (2017, 2018a, 2018b, 2018c, 2018d, 2019) that can also be useful for both modelling microbial inactivation under isothermal or dynamic conditions and for predictions. This software is a user-friendly web application for users without a programming background and where linear and non-linear mathematical models are available, and the discrimination between them can be developed.

In this study, the GraphPad PRISM program was effective for the adjustment of the modified Gompertz model (equation (1)) to the inactivation kinetic data. Using  $R^2_{adj}$  and  $RMSE$  as criteria to determine the goodness of fit, the modified Gompertz equation was appropriate to represent the thermal inactivation data as proven by the high  $R^2_{adj}$  values obtained, oscillating between 99.2 and 99.9%, and the low  $RMSE$  values (Table 1). Meanwhile, Xiong et al. (1999) reported that the adjustment of the modified Gompertz model was appropriate to describe non-linear curves when modeling the thermal inactivation (50–60 °C) of *L. monocytogenes* Scott A in infant formula.

Moreover, through the adjustment of the modified Gompertz equation to the experimental data the  $C$ ,  $B$ , and  $M$  parameters were obtained (Table 1). The  $C$  parameter surpassed the five reductions of the logarithmic cycle in all the assayed conditions, which suggests that

the assayed treatments were effective in significantly decreasing the number of *L. monocytogenes* cells in sour-sop pulp. Table 1 shows that the  $C$  and  $B$  parameters increased while the  $M$  parameter decreased significantly as the temperature increased. The  $C$  and  $B$  parameters were used to calculate the maximum death rate (equation (2)). The maximum death rate values ( $\mu_{max}$ ) obtained (Table 1) increased as the heating temperature increased, which suggests that as the temperature increases, the microbial population died faster. Linton et al. (1996) evaluated the heat resistance of *L. monocytogenes* in infant formulas at 50, 55, and 60 °C; pH values of 5.0, 6.0, and 7.0; and 0%, 2%, and 4% NaCl concentration, and found that as the heating temperature increased from 50 to 60 °C, the death of the microbial cells accelerated, generating survival curves without or with scarce regions of shoulders or tails.

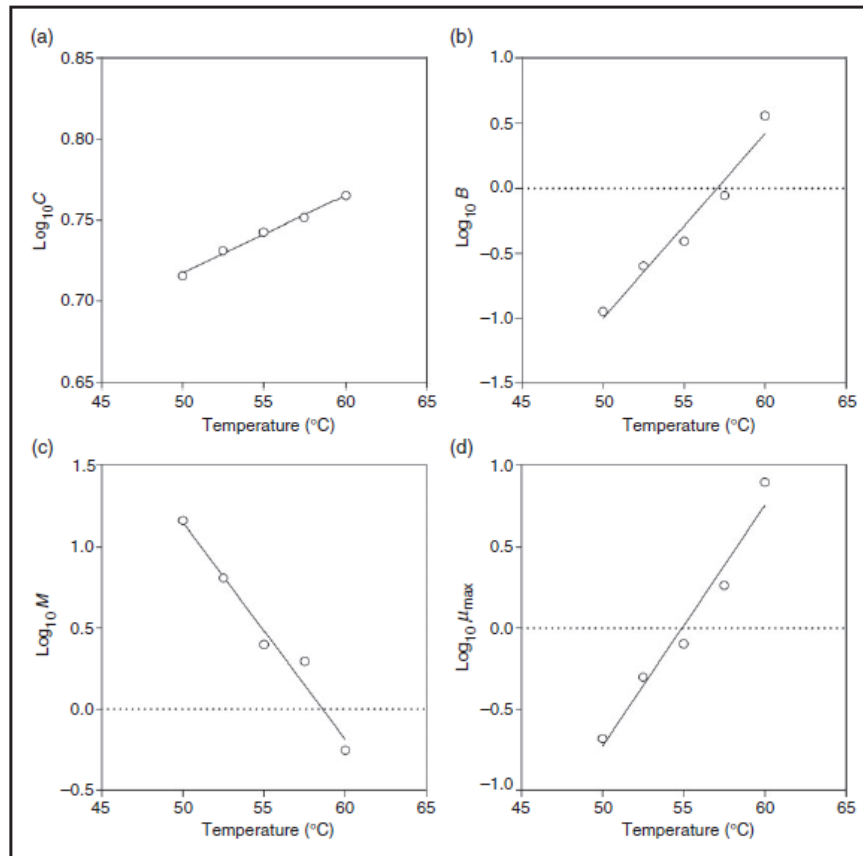
In heat treatments, the determination of the secondary kinetic parameter ( $z_T$ ) indicates the increase in temperature needed to decrease the value of the primary kinetic parameter by 1 log cycle.  $z_T$  can be calculated as the inverse value of the gradient for the linear relation between the decimal logarithm of the primary kinetic parameter and the temperature applied. Therefore, with the linear relationship of the decimal logarithm of each estimated parameter,  $C$ ,  $B$ ,  $M$ , and  $\mu_{max}$ , against the temperature, Figure 2(a) to (d), respectively, the secondary models (equations (8) to (11)) and the  $z_T$  value for each parameter were determined (Table 2). The determination coefficients obtained for each linear relationship were representative at a 95% confidence level.

According to Figure 2, a positive effect of temperature on  $\mu_{max}$ ,  $C$ ,  $B$  parameters, and a negative effect on  $M$  parameter could be observed. The  $C$  parameter showed the highest  $z_T$  value of 209.083 °C due to the slope value of the line being small in comparison to the other values (Table 2). On the other hand, in case of  $\mu_{max}$ ,  $B$  and  $M$  parameters, the steeper the line, the bigger the slope and the lower  $z_T$  values (Table 2).

**Table 1.** Primary kinetic parameters and goodness of fit determined for *L. monocytogenes* inactivation curves in sour-sop pulp.

Temperature (°C)	Parameters of the modified Gompertz equation (equation (1))					$R^2_{adj}$	$RMSE$
	$C \pm sd \text{ Log}_{10}$ (CFU mL <sup>-1</sup> )	$B \pm sd \text{ Log}_{10}$ (CFU mL <sup>-1</sup> ) min <sup>-1</sup>	$M \pm sd$ min	$\mu_{max} \pm sd \text{ Log}_{10}$ (CFU mL <sup>-1</sup> ) min <sup>-1</sup>			
50.0	5.197 ± 0.016	0.113 ± 0.004	14.542 ± 0.027	0.209 ± 0.007	0.993	0.253	
52.5	5.387 ± 0.022	0.252 ± 0.004	6.427 ± 0.010	0.500 ± 0.006	0.996	0.175	
55.0	5.532 ± 0.002	0.393 ± 0.000	2.502 ± 0.001	0.799 ± 0.001	0.992	0.244	
57.5	5.646 ± 0.028	0.881 ± 0.004	1.973 ± 0.006	1.830 ± 0.009	0.999	0.123	
60.0	5.826 ± 0.021	3.625 ± 0.101	0.560 ± 0.001	7.768 ± 1.188	0.997	0.165	

*sd*: standard deviation.



**Figure 2.** Relationship between temperature and the estimated parameters of the modified Gompertz equation: (a)  $C$  parameter, (b)  $B$  parameter, (c)  $M$  parameter, (d)  $\mu_{max}$ . The points (○) represent the values observed and the lines represent the adjustment of the model.

**Table 2.** Secondary models and  $z_T$  values for *L. monocytogenes* in soursop pulp.

Secondary model	$z_T$ (°C)	$R^2$	Equation
$\text{Log}_{10} C = 0.0048 T + 0.4784$	209.083	0.992	(8)
$\text{Log}_{10} B = 0.1423 T - 8.1148$	7.029	0.960	(9)
$\text{Log}_{10} M = -0.1337 T + 7.8332$	7.482	0.971	(10)
$\text{Log}_{10} \mu_{max} = 0.1482 T - 8.1347$	6.749	0.964	(11)

$T$ : temperature (°C).

Particularly on  $C$  parameter, Linton et al. (1996) observed that this value approximated the value for the log survival fraction when the survival curve began to form a tailing region, and represented an area of the survival curve which was characterized by a substantial decrease in death rate. The values of  $C$  parameter determined in this study ranged from  $5.197 \pm 0.016$  to  $5.826 \pm 0.21$  (Table 1), indicating that the curves began to form a tail at those values. Miller

et al. (2009) studied the effect of thermal treatments (52.5–65 °C) on *L. innocua* strains (10528 and 2030c) in broth culture and two growth phases (exponential and stationary), and the Gompertz model was used and determined the influence of temperature, growth phase, and culture strain on the kinetic parameters. As a result, differences in  $z$ -values were observed mostly influenced by the temperature and growth phase factors; higher temperatures implied narrow shoulder periods, higher inactivation rates, and a more evident tail due to a probably heat resistant residual population. Vega et al. (2016), through a linear regression of the decimal logarithm of the primal kinetic parameter ( $\mu_{max}$ ) versus applied temperature, determined a  $z_T$  value of 7.11 °C.

#### Validation of the model

The validation of the experimental mathematical model based on the modified Gompertz equation and the

integration of equations (8) to (11) (Table 2) into equation (1) was done through the calculation of the accuracy factor ( $A_f$ ) (equation (5)), and the bias factor ( $B_f$ ) (equation (6)). The accuracy factor ( $A_f$ ) indicates how much the predictions differ from the observed data. Ideally, predictive models should have an  $A_f=1$ , but typically, the accuracy factor will increase 0.10–0.15 for each variable in the model (Ross et al., 2000). The bias factor ( $B_f$ ) compares the predictions of the model.  $B_f=1$  means that the observed data are equally distributed above and below the predictions, producing a perfect concordance.  $B_f<1$  means the model under-predicts, and when  $B_f>1$  the model over-predicts the response of the bacterial inactivation. An acceptable  $B_f$  value for a predictive model can be 0.75–1.25 (Pérez-Rodríguez and Valero, 2013). The  $A_f$  and  $B_f$  obtained for each level of temperature are shown in Table 3. The  $A_f$  value for the temperature of 57.5 °C was the highest but it was within the acceptable range. For the same temperature, 57.5 °C, the  $B_f$  value obtained over-predicted the response of bacterial inactivation; however, the mean  $B_f$  value was near 1. In this sense, the Gompertz model could be acceptable to predict the behavior of *L. monocytogenes* inoculated in

soursop pulp thermally treated at 50.0, 52.5, 55.0, 57.5, and 60.0 °C.

**Microbiological quality and physicochemical properties**

**Microbiological quality.** The results obtained equaled fewer than one coliform per mL (NOM-113-SSA1-1994) and fewer than 1 CFU mL<sup>-1</sup> of *E. coli*, both in untreated soursop pulp and in the pulp samples subjected to the 5-log<sub>10</sub> thermal treatments (50.0 °C/60 min, 52.5 °C/16 min, 55.0 °C/10 min, 57.5 °C/5 min, and 60.0 °C/1.25 min). The untreated pulp was below (22.25 ± 0.58 CFU mL<sup>-1</sup>) of the permissible limit (≤100 CFU mL<sup>-1</sup>) of aerobic mesophiles and upper permissible level of 25 CFU mL<sup>-1</sup> of yeasts and molds (86.75 ± 4.79 CFU mL<sup>-1</sup>) according to the microbiological specifications for pasteurized juices and nectars of the NOM-130-SSA1-1995 normative. No counts of aerobic mesophiles, yeasts, and molds were detected in the pulps treated at 52.5, 55.0, 57.5, and 60.0 °C. However, the pulp treated at 50 °C/60 min contained aerobic mesophiles (<100 CFU mL<sup>-1</sup>), and yeasts and molds (<25 CFU mL<sup>-1</sup>). Despite these counts, the pulp subjected to 50 °C/60 min was within the acceptable range for aerobic mesophiles, yeasts, and molds. The NOM-130-SSA1-1995 specifies that for pasteurized juices and nectars, the maximum allowed limit for aerobic mesophiles is 100 CFU mL<sup>-1</sup> and 25 CFU mL<sup>-1</sup> yeasts and molds. Therefore, the thermal treatments applied to the soursop pulp were effective.

**Color.** The color parameters,  $L^*$  (luminosity),  $a^*$  (red component), and  $b^*$  (yellow component), of the soursop pulp decreased ( $p<0.05$ ) as the heating temperature increased, being the change in color did not depend on the length of the heat treatment (Table 4). This suggests that as the heating temperature increased, the pulp was less brilliant (lower  $L^*$  values) than the untreated pulp. Also, as the processing temperature increased (from 50

**Table 3.** Accuracy factor ( $A_f$ ) and bias factor ( $B_f$ ) of *L. monocytogenes* in soursop pulp.

Temperature (°C)	$A_f$	$B_f^a$
50.0	1.192	1.060
52.5	1.075	0.985
55.0	1.197	0.922
57.5	1.298	1.244
60.0	1.184	0.845
<i>Average</i>	<i>1.189</i>	<i>1.011</i>

<sup>a</sup>The  $B_f$  values are within the acceptable range 0.75–1.25 (Dalgaard 2000, 2002; Ross et al., 2000).

**Table 4.** Color parameters in soursop pulp.

Temperature (°C)	Time (min)	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E^*$	$BI$
Control	–	39.16a	–0.72a	5.02a	–	11.89a
50.0	60	36.78b	–1.02a	3.82b	2.79a	8.54ab
52.5	16	34.32c	–1.00a	3.06bc	5.35b	6.89bc
55.0	10	32.70d	–2.32b	3.00bc	7.06c	4.21cd
57.5	5.0	31.74e	–2.44b	2.34c	8.10c	1.72d
60.0	1.25	30.60f	–2.44b	2.12c	9.24d	1.05d

Different letters in the same column indicate significant differences between the samples ( $p<0.05$ ). Values are the average of five analyses.

$L^*$ : brightness,  $a^*$ : red component,  $b^*$ : yellow component,  $\Delta E$ : total different colors,  $BI$ : browning index.



to 60 °C) the *BI* values lowered, which suggests that the pulp was more transparent, as mentioned by Chaikham and Apichartsrangkoon (2012) when studying the physical and biochemical properties of pasteurized and presurized longan juice (*Dimocarpus longan*). Chaikham et al. (2017) reported that luminosity ( $L^*$ ) decreased in thermally treated (90 °C for 5 min) litchi pulp in syrup, compared against fresh pulp. Meanwhile, Anaya-Esparza et al. (2017a) reported that the  $a^*$  and  $b^*$  parameters decreased in thermosonicated soursop nectar (1.4 W/mL at 51 °C for 10 min), compared with untreated nectar. Umme et al. (2001) reported that the yellowness ( $b^*$  values) of soursop puree decreased after pasteurization, and that heating the puree could have destroyed the yellow pigment of the puree.

A value higher than 3.0 in  $\Delta E$  has been considered to indicate perceptible changes in color (Choi et al., 2002). In this sense, Table 4 shows that all the thermally treated pulps had  $\Delta E > 3.0$ , except for the pulp treated at 50 °C for 60 min, which was  $\Delta E = 2.79$ . This suggests that this pulp showed no notable changes in color.

**Total soluble solids, pH and titratable acidity.** The thermal treatments applied to the soursop pulp had no significant effect on the TSS content or on the titratable acidity; however, the pH decreased in the treated pulps, with respect to the untreated pulp (Table 5). To this regard, Anaya-Esparza et al. (2017b) reported that a thermally treated (65 °C/30 min) pasteurized soursop nectar had a pH of 3.6 while the pH of the unpasteurized fresh nectar was 3.7. Also, Baskaran et al. (2016) reported that when pasteurizing sweetsop (*A. squamosa*) and soursop pulp at 85 °C for 20 min, there were no changes in the titratable acidity of either pulp when compared with the fresh pulp. However, they reported that the TSS content in the soursop pulp increased with the thermal treatment, although the treatment temperature was higher than

those applied in the present study. In another work, Hoffmann et al. (2017), reported that the butiá (*Butia odorata*) fruit pulp, pasteurized at 100 °C for 15 min, showed a higher TSS content than the unpasteurized pulp, which could be associated with water evaporation from the pulp during the thermal treatment.

**Total sugars, reducing sugars and ascorbic acid.** The content of total sugars and reducing sugars in the soursop pulp decreased with each of the thermal treatments applied to it (Table 5). The content of ascorbic acid in the untreated pulp was 0.82 mg 100 mL<sup>-1</sup>, with no significant changes in pulps subjected to 50.0 °C/60 min and 52.5 °C/16 min, but with significant decrease in pulps subjected to 55.0 °C/10 min; 57.5 °C/5 min, and 60.0 °C/1.25 min, with determined values of 0.57 mg 100 mL<sup>-1</sup>, 0.49 mg 100 mL<sup>-1</sup>, and 0.45 mg 100 mL<sup>-1</sup>, respectively. Baskaran et al. (2016) mentioned that total sugars and the ascorbic acid content decreased in the pulp of *Annona squamosa* when pasteurized at 85 °C for 20 min. Anaya-Esparza et al. (2017b) reported 50% loss of ascorbic acid in soursop nectar pasteurized at 65 °C for 30 min, compared against fresh nectar. In the present study, the soursop pulp lost 45% ascorbic acid when subjected to 60 °C/1.25 min. Ascorbic acid is highly thermolabile and degrades easily with heat application (Iguar et al., 2010; Rawson et al., 2011).

**Total phenolic content.** The TPC in the untreated soursop pulp was 37.72 mg GAE 100 mL<sup>-1</sup> (Table 5). The pulp thermally treated at 50.0 °C/60 min showed no changes in the TPC, with respect to the untreated pulp. The TPC decreased when the pulp was subjected to 52.5 °C/16 min, 55.0 °C/10 min, 57.5 °C/5 min, and 60.0 °C/1.25 min. The decrease in TPC could be due to oxidation and polymerization of the phenolic compounds during the heat processing (Tembo et al., 2017; Wang et al., 2000). Moreover, the cooking method,

**Table 5.** Physicochemical determinations in soursop pulp.

Temperature (°C)	Time (min)	pH	TSS (°Brix)	Titratable acidity (% citric acid)	Ascorbic acid (mg 100 mL <sup>-1</sup> )	Total sugars (mg mL <sup>-1</sup> )	Reducing sugars (mg mL <sup>-1</sup> )	TPC (mg GAE 100 mL <sup>-1</sup> )
Control	–	3.75a	8.08a	0.464a	0.82a	115.90a	44.77a	37.72a
50.0	60	3.70b	8.06a	0.468a	0.76a	106.71b	42.56b	35.96ab
52.5	16	3.71b	8.06a	0.468a	0.76a	97.52c	40.82c	34.17b
55.0	10	3.70b	8.08a	0.470a	0.57b	88.97d	37.48d	34.12b
57.5	5.0	3.69c	8.06a	0.472a	0.49c	86.34e	35.69e	34.09b
60.0	1.25	3.69c	8.04a	0.468a	0.45c	83.53f	32.99f	31.54c

Different letters in the same column indicate significant differences between the samples ( $p < 0.05$ ). Values are the average of five analyses.

TSS: total soluble solids; TPC: total phenolic content.

time, and temperature can influence the stability of the compounds (Rickman et al., 2007). Hoffmann et al. (2017) evaluated the impact of a thermal treatment (100 °C/15 min) on the butiá (*Butia odorata*) fruit pulp and observed a decrease of 5% in TPC after the thermal processing. In strawberry puree, the thermal processing (88 °C/2 min) decreased the TPC by up to 24% (Terefe et al., 2013).

## CONCLUSIONS

The 5-log<sub>10</sub> reductions of *L. monocytogenes* in soursop pulp were achieved at 50.0 °C/60 min, 52.5 °C/16 min, 55.0 °C/10 min, 57.5 °C/5 min, and 60.0 °C/1.25 min thus complying with the safety criterion established by the FDA (5-log<sub>10</sub> reduction). Moreover, the results obtained from the 5-log<sub>10</sub> thermal treatments applied to the soursop pulp indicated that the pulp showed changes in color parameters, and there was a decrease in total sugars, reducing sugars, ascorbic acid, TPC, and pH. The pulps treated at 50.0 °C/60 min and 52.5 °C/16 min showed no significant changes in ascorbic acid content, with respect to the control. In addition, the pulp subjected to 50 °C/60 min showed no significant changes in TPC. These thermal treatments could be an option for thermal processing of soursop pulp without considerably affecting ascorbic acid and TPCs. Moreover, both treatments proved to be microbiologically safe.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Christian E. Aceves Ruiz of the Language Department of the Colegio de Postgraduados for the translation of the original paper into English.


## DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## FUNDING

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: The authors thank the National Council of Science and Technology (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – CONACyT) for the doctorate scholarship (243568) granted to A. Velasco-Hernández and the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo Mexico, for funding the present research.

## ORCID ID

Daniela Saucedo-Reyes  <https://orcid.org/0000-0003-0553-3845>

## REFERENCES

Anaya-Esparza LM, Méndez-Robles MD, Sayago-Ayerdi SG, García-Magaña ML, Ramírez-Mares MV,

Sánchez-Burgos JA, et al. (2017a). Effect of thermosonication on pathogenic bacteria, quality attributes and stability of soursop nectar during cold storage. *Journal of Food* 15(4): 592–600.

Anaya-Esparza LM, Velázquez-Estrada RM, Sayago-Ayerdi SG, Sánchez-Burgos JA, Ramírez-Mares MV, García-Magaña ML, et al. (2017b). Effect of thermosonication on polyphenol oxidase inactivation and quality parameters of soursop nectar. *Food Science and Technology* 75: 545–551.

Association of Official Analytical Chemist (AOAC). (1990). *Officials Methods of Analysis*, 15th ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemist.

Association of Official Analytical Chemist (AOAC). (2000). *Vitamins and Other Nutrients, Official Methods of Analysis*. 17th ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemist.

Auwah GB, Ramaswamy H and Economides A. (2007). Thermal processing and quality: Principles and overview. *Chemical Engineering and Processing* 46: 584–602.

Baskaran R, Ravi R and Rajarathnam S. (2016). Thermal processing alters the chemical quality and sensory characteristics of sweetsop (*Annona squamosa* L.) and soursop (*Annona muricata* L.) pulp and nectar. *Journal of Food Science* 81: 182–188.

Benlloch-Tinoco M, Pina-Pérez MC, Martínez-Navarrete N and Rodrigo D. (2014). *Listeria monocytogenes* inactivation kinetics under microwave and conventional thermal processing in a kiwifruit puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 22: 131–136.

Bhaduri S, Smith PW, Palumbo SA, Turner-Jones CO, Smith JL, Marmer BS, et al. (1991). Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in liver sausage slurry. *Food Microbiology* 8: 75–78.

Caggia C, Scifò GO, Restuccia C and Randazzo CL. (2009). Growth of acid-adapted *Listeria monocytogenes* in orange juice and in minimally processed orange slices. *Food Control* 20: 59–66.

Carpentier B and Cerf O. (2011). Review-persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology* 145: 1–8.

Chaikham P and Apichartsrangkoon A. (2012). Comparison of dynamic viscoelastic and physicochemical properties of pressurised and pasteurised longan juices with xanthan addition. *Food Chemistry* 134(4): 2194–2200.

Chaikham P, Rattanasena P, Phunchaisri C and Sudsanor P. (2017). Quality changes of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) in syrup due to thermal and high pressure processes. *Food Science and Technology* 75: 751–760.

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

Chhabra AT, Carter WH, Linton RH and Cousin MA. (1999). A predictive model to determine the effects of pH, milkfat, and temperature on thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 62: 1143–1149.



- Choi M, Kim G and Lee H. (2002). Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. *Food Research International* 35: 753–759.
- Cole MB, Davies KW, Munro G, Holyoak CD and Kilsby DC. (1993). A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Industrial Microbiology* 12: 232–239.
- Dalgaard P (2000) Fresh and lightly preserved seafood. In: Man CMD and Jones AA (eds) *Shelf Life Evaluation of Foods*. 2nd Edition. Maryland: Aspen Publisher Inc, pp. 110–139.
- Dalgaard P (2002) Modeling and prediction the self-life of seafood. In: Bremmer HA (ed) *Safety and Quality Issues in Fish Processing*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, pp. 191–219.
- De Oliveira ES, Tombini L and Tondo EC. (2018). Foodborne outbreaks in Brazil associated with fruits and vegetables: 2008–2014. *Food Quality and Safety* 2(4): 173–181.
- Fairchild TM and Foegeding PM. (1993). A proposed non-pathogenic biological indicator for thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 59(4): 1247–1250.
- Fernández A, López M, Bernardo A, Condón S and Raso J. (2007). Modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in sucrose solutions of various water activities. *Food Microbiology* 24: 372–379.
- Fernández A, Salmerón C, Fernández PS and Martínez A. (1999). Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strains of *Bacillus cereus*. *Trends in Food Science & Technology* 10: 158–162.
- Ferrari G, Maresca P and Ciccarone R. (2010). The application of high hydrostatic pressure for the stabilization of functional foods: Pomegranate juice. *Journal of Food Engineering* 100(2): 245–253.
- Ferreira V, Wiedmann M, Teixeira P and Stasiewicz MJ. (2014). Review-*Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of Food Protection* 77: 150–170.
- Food and Drug Administration (FDA), Center for Food Safety and Applied Nutrition, United States (FDA/CFSAN, US). (2004). Juice HACCP hazards and controls guidance. Guidance for industry. 1st ed. Available at: [www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ucm072557.htm](http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ucm072557.htm) (accessed 24 November 2018).
- Francis J and Bellot C. (2003). Tropical fruits newsletter. Special issue number 44/45. Inter-American Institute for Cooperation on Agriculture, IICA Office, Port-of-Spain, Trinidad and Tobago.
- Fujikawa H, Morozumi S, Smegare GH and Teixeira AA. (2000). Comparison of capillary and test tube procedures for analysis of thermal inactivation kinetics of mold spores. *Journal of Food Protection* 63(10): 1404–1409.
- Fujikawa H, Morozumi S, Smegare GH and Teixeira AA. (2001). Thermal inactivation patterns of *Aspergillus niger* spores in capillaries. *Biocontrol Science* 6(1): 17–20.
- Garre A, Clemente-Carazo M, Fernández PS, Lindqvist R and Egea JA. (2018a). Bioinactivation FE: A free web application for modelling isothermal and dynamic microbial inactivation. *Food Research International* 112: 353–360.
- Garre A, Egea JA, Iguaz A, Palop A and Fernández PS. (2018b). Relevance of the induced stress resistance when identifying the critical microorganism for microbial risk assessment. *Frontiers in Microbiology* 9: 1663.
- Garre A, Fernández PS, Lindqvist R and Egea JA. (2017). Bioinactivation: software for modelling dynamic microbial inactivation. *Food Research International* 93: 66–74.
- Garre A, González-Tejedor G, Aznar A, Fernández PS and Egea JA. (2019). Mathematical modelling of the stress resistance induced in *Listeria monocytogenes* during dynamic, mild heat treatments. *Food Microbiology* 84: 103238.
- Garre A, González-Tejedor G, Peñalver-Soto JL, Fernández PS and Egea JA. (2018c). Optimal characterization of thermal microbial inactivation simulating non-isothermal processes. *Food Research International* 107: 267–274.
- Garre A, Huertas JP, González-Tejedor GA, Fernández PS, Egea JA, Palop A, et al. (2018d). Mathematical quantification of the induced stress resistance of microbial populations during non-isothermal stresses. *International Journal of Food Microbiology* 266: 133–141.
- Geeraerd AH, Valdramidis VP and Van Impe JF. (2005). GInaFit, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology* 102: 95–105.
- Gil MM, Brandão TRS and Silva CLM. (2006). A modified Gompertz model to predict microbial inactivation under time-varying temperature conditions. *Journal of Food Engineering* 76: 89–94.
- Hassani M, Alvarez I, Raso J, Condón S and Pagán R. (2005). Comparing predicting models for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* at different pH. *International Journal of Food Microbiology* 100: 213–222.
- Hoffmann JF, Zandoná GP, Silveira SP, Müller DC, Bonemann MF, Valmor RC, et al. (2017). Stability of bioactive compounds in butiá (*Butia odorata*) fruit pulp and nectar. *Food Chemistry* 237: 638–644.
- Huang L. (2009). Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in ground beef under isothermal and dynamic temperature conditions. *Journal of Food Engineering* 90: 380–387.
- Igual M, García-Martínez E, Camacho MM and Martínez-Navarrete N. (2010). Effect of thermal treatment and storage on the stability of organic acids and the functional value of grapefruit juice. *Food Chemistry* 118: 291–299.
- Jiménez VM, Gruschwitz M, Schweiggert RM, Carle R and Esquivel P. (2014). Identification of phenolic compounds in soursop (*Annona muricata*) pulp by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization mass spectrometric detection. *Food Research International* 65: 42–46.
- Leite JA, Luiz TF, Barbosa RF, Rabinovitch L, Quintanilla CJ, Gonsales RN, et al. (2016). Bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Bacillus cereus*:

- Preliminary characterization and application of partially purified extract containing BLIS for inhibiting *Listeria monocytogenes* in pineapple pulp. *Food Science and Technology* 72: 261–266.
- Lima Tribst AA, de Souza Sant'Ana A and Rodriguez de Massaguer P. (2009). Review: Microbiological quality and safety of fruit juices—past, present and future perspectives. *Critical Reviews in Microbiology* 35(4): 310–339.
- Linton RH, Carter WH, Pierson M and Hackney CR. (1995). Use of a modified Gompertz equation to model nonlinear survival curves for *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection* 58: 946–954.
- Linton RH, Carter WH, Pierson MD, Hackney CR and Eifert JD. (1996). Use of a modified Gompertz equation to predict the effects of temperature, pH, and NaCl on the inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A heated in infant formula. *Journal of Food Protection* 59: 16–23.
- Ly-Nguyen B, Van Loey AM, Scout C, Eren Özcan S, Fachin D and Verlent I. (2003). Mild-heat and high-pressure inactivation of carrot pectin methylesterase: A kinetic study. *Journal Food Science* 68: 1377–1383.
- Mañas P, Pagán R, Alvarez I and Condón US. (2003). Survival of *Salmonella senftenberg* 775 W to current liquid whole egg pasteurization treatments. *Food Microbiology* 20: 593–600.
- Mazzotta AS. (2001). Thermal inactivation of stationary-phase and acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *Journal of Food Protection* 64: 315–320.
- McMeekin TA, Olley J, Ross T and Ratkowsky DA. (1993). *Predictive Microbiology: Theory and Application*. New York: John Wiley and Sons.
- Miller FA, Gil MM, Brandão TRS, Teixeira P and Silva CLM. (2009). Sigmoidal thermal inactivation kinetics of *Listeria innocua* in broth: Influence of strain and growth phase. *Food Control* 20: 1151–1157.
- Mossel DAA, Corry JEL, Struijk CB and Baird RM. (1995). *Essentials of the Microbiology of Foods*. West Sussex: John Wiley & Sons.
- Murphy RY, Duncan LK, Johnson ER, Davis MD and Smith JN. (2002). Thermal inactivation D- and z-values of *Salmonella* serotypes and *Listeria innocua* in chicken patties, chicken tenders, franks, beef patties, and blended beef and turkey patties. *Journal of Food Protection* 65(1): 53–60.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF). (2006). Requisite scientific parameters for establishing equivalence of alternative methods of pasteurization. *Journal of Food Protection* 69(5): 1190–1216.
- Nelson NJA. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of the glucose. *Journal of Biological Chemistry* 153: 375–380.
- Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Secretaría de Salud, 25 Agosto 1995. Available at: [www.sinec.gob.mx/SINEC/Vista/Normalizacion/DetalleNorma.xhtml?pidn=NTJXNkVvTUx5OFpGb2piNzU1cWRPZz09](http://www.sinec.gob.mx/SINEC/Vista/Normalizacion/DetalleNorma.xhtml?pidn=NTJXNkVvTUx5OFpGb2piNzU1cWRPZz09) (accessed 5 November 2019).
- Norma Oficial Mexicana NOM-130-SSA1-1995. Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierres herméticos y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Secretaría de Salud, 21 Noviembre 1997. Available at: [www.sinec.gob.mx/SINEC/Vista/Normalizacion/DetalleNorma.xhtml?pidn=VzVWakpMeHRZZ3dqQVhZQW1WOU5rUT09](http://www.sinec.gob.mx/SINEC/Vista/Normalizacion/DetalleNorma.xhtml?pidn=VzVWakpMeHRZZ3dqQVhZQW1WOU5rUT09) (accessed 21 January 2019).
- Pareek S, Yahia EM, Pareek OP and Kaushik RA. (2011). Postharvest physiology and technology of *Annona* fruits. *Food Research International* 44: 1741–1751.
- Peleg M and Cole MB. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38(5): 353–380.
- Pérez-Rodríguez F and Valero A. (2013). Predictive models: Foundation, types, and development. In: Pérez-Rodríguez F and Valero A (eds) *Predictive Microbiology in Foods. SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition*. Vol. 5, New York: Springer, pp. 25–55.
- Pinheiro J, Alegria C, Abreu M, Gonçalves EM and Silva CLM. (2013). Kinetics of changes in the physical quality parameters of fresh tomato fruits (*Solanum lycopersicum*, cv. 'Zinac') during storage. *Journal of Food Engineering* 114: 338–345.
- Rawson A, Patras A, Tiwari BK, Noci F, Koutchma T and Brunton N. (2011). Effect of thermal and non-thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International* 44: 1875–1887.
- Rickman JC, Barrett DM and Bruhn CM. (2007). Nutritional comparison of fresh, frozen and canned fruits and vegetables. Part I. Vitamins C and B and phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87(6): 930–944.
- Ross T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology* 81: 501–508.
- Ross T, Dalgaard P and Tienungoon S. (2000). Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *International Journal of Food Microbiology* 62: 231–245.
- Saucedo-Reyes D, Carrillo-Salazar JA, Román-Padilla L, Saucedo-Veloz C, Reyes-Santamaría MI, Ramírez-Gilly M, et al. (2017). Modeling the pressure inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in sapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn) pulp. *Food Science and Technology International* 24(2): 117–131.
- Siguemoto ES, Wilhelms GJA, Martinez A and Rodrigo D. (2018). Inactivation kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in apple juice by microwave and conventional thermal processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 45: 84–91.
- Somogyi M. (1952). Notes on sugar determinations. *Journal of Biological Chemistry* 195: 19–23.
- Stephens PJ, Cole MB and Jones MV. (1994). Effect of heating rate on the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology* 77: 702–708.
- Tembo DT, Holmes MJ and Marshall LJ. (2017). Effect of thermal treatment and storage on bioactive compounds,



- organic acids and antioxidant activity of baobab fruit (*Adansonia digitata*) pulp from Malawi. *Journal of Food Composition and Analysis* 58: 40–51.
- Terefe NS, Kleintschek T, Gamage T, Fanning KJ, Netzel G, Versteeg C, et al. (2013). Comparative effects of thermal and high pressure processing on phenolic phytochemicals in different strawberry cultivars. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 19: 57–65.
- Umme A, Bambang SS, Salmah Y and Jamilah B. (2001). Effect of pasteurisation on sensory quality of natural sour-sop puree under different storage conditions. *Food Chemistry* 75: 293–301.
- Vega S, Saucedo D, Rodrigo D, Pina C, Armero C and Martinez A. (2016). Modeling the isothermal inactivation curves of *Listeria innocua* CECT 910 in a vegetable beverage under low-temperature treatments and different pH levels. *Food Science and Technology International* 22(6): 525–535.
- Vitas AI, Aguado V and Garcia-Jalon I. (2004). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology* 90: 349–356.
- Von Breymann J, Chaves C and Arias ML. (2013). Análisis de la calidad microbiológica y potencial presencia de *Listeria monocytogenes* en pulpas de guanábana (*Annona muricata*), mango (*Mangifera indica*) y maracuyá (*Passiflora edulis*) costarricenses. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 63: 53–57.
- Wang L, Kim D and Lee CY. (2000). Effects of heat processing and storage on flavanols and sensory qualities of green tea beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 4227–4232.
- Waterhouse AL. (2002). Determination of total phenolics. In: Wrolstad RE, Acree TE, An H, Decker EA, Penner MH, Reid DS, et al (eds) *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Hoboken: John Wiley and Sons, Inc., p. 11.1.1–11.1.8.
- Witham HF, Blaydes DF and Devlin RM. (1971). *Experiments in Plant Physiology*. New York: Van Nostrand Reinhold C.
- Xiong R, Xie G, Edmondson AS, Linton RH and Sheard MA. (1999). Comparison of the Baranyi model with the modified Gompertz equation for modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Food Microbiology* 16: 269–279.