

**EFFECTO BACTERICIDA DEL ULTRASONIDO SOBRE LA MICROBIOTA DE CREMA
DE LECHE CRUDA**

**ALEXANDRA PINO NAVARRO
MICROBIOLOGA**



**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIONES
FACULTAD DE INGENIERÍAS Y ARQUITECTURA
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS
Pamplona, Agosto de 2019**

**EFFECTO BACTERICIDA DEL ULTRASONIDO SOBRE LA MICROBIOTA DE CREMA
DE LECHE CRUDA**

**ALEXANDRA PINO NAVARRO
MICROBIOLOGA**

**Grupo de investigaciones en ingeniería y tecnología de alimentos
Trabajo de investigación presentado para optar al título de Magister en Ciencia y
Tecnología de los Alimentos**

**Directora LUZ ALBA CABALLERO PEREZ
Mgs CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**Co-directora
PhD Lic. MARIA ESTHER RIVERA**

Grupo de Investigaciones: GIBA

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
Innovación y desarrollo de productos alimenticios**



**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIONES
FACULTAD DE INGENIERÍAS Y ARQUITECTURA
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

Pamplona, Agosto de 2018

Nota de Aceptación:

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Firma del Jurado

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar mis agradecimientos son para Dios quien me permitió llegar hasta estas instancias, a mi esposo, Cesar Augusto Ramos Pineda, hijos, Cesar Augusto y Nicolás Camilo, madre, Damaris Navarro de Pino y mi padre, Javier Pino Reyes, que está en el cielo apoyándome y cuidándome.

Doy inmensas gracias a mi directora, Luz Alba Caballero Pérez, por ser una fuente de sabiduría y ayudarme a guiar este proyecto, y a mí querida coodirectora María Esther Rivera, con quienes pudimos sacar adelante este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	8
1.2 CREMA DE LECHE.....	11
1.3 MICROBIOLOGÍA DE LA CREMA DE LECHE CRUDA.....	14
1.4 LAS ENZIMAS.....	16
1.5 TECNOLOGÍAS EMERGENTES.....	19
1.6 ULTRASONIDO.....	20
1.6.1 Baños ultrasónicos.....	21
1.6.2 Tratamiento ultrasonico.....	22
1.6.3 Uso industrial de ultrasonido.....	25
2 OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	44
2.2 OBJETIVO GENERAL.....	44
2.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	44
2.4 PLAN DE TRABAJO.....	44
2.4.1 Elección de las muestras.....	44
2.4.2 Búsqueda de bibliográfica y análisis de la información.....	45
2.4.3 Evaluación de las características químicas (pH y acidez).....	45
2.4.4 Evaluación de las características microbiológicas.....	45
2.4.5 Evaluación de las características sensoriales.....	46
2.4.6 Evaluación de las características reológicas. ¡Error! Marcador no definido.	46
2.4.7 Análisis enzimático de la crema de leche.....	46
2.4.8 Determinación experimental del efecto del ultrasonido sobre las características químicas, microbiológicas, enzimáticas, y sensoriales del almacenamiento en la calidad de crema de leche.....	46
3 METODOLOGÍA.....	47
3.1 MATERIA PRIMA.....	47
3.1.1 Crema de leche.....	47
3.2 METODOS.....	47
3.2.1. Toma de muestra.....	48
3.2.2. Tratamiento ultrasonido.....	48
3.3. ANÁLISIS QUÍMICO DE LA CREMA DE LECHE.....	49
3.4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA CREMA DE LECHE.....	50

3.4.1. Determinación de aerobios mesófilos.....	50
3.4.2. Determinación de coliformes totales.	51
3.4.3. Determinación de hongos y levaduras.....	51
3.5. ANÁLISIS ENZIMÁTICO DE LA CREMA DE LECHE.....	51
3.5.1. Determinación de Fosfatasa alcalina.	51
3.5.2. Determinación de Peroxidasa.	52
3.6. EVALUACIÓN SENSORIAL DE LA CREMA DE LECHE.....	52
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
4.4. RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS QUÍMICOS DE LA CREMA DE LECHE TRATADA CON ULTRASONIDO	55
4.4.1. Resultados de pH y acidez de la crema de leche.	55
4.5. RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS DE LA CREMA DE LECHE TRATADA CON ULTRASONIDO.	58
4.6. RESULTADOS DEL EFECTO DEL ULTRASONIDO SOBRE LAS ENZIMAS PRESENTES EN LA CREMA DE LECHE TRATADA CON ULTRASONIDO.....	61
4.7. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN SENSORIAL DE LA CREMA DE LECHE.	62
4.7.1. Perfil sensorial de la crema de leche cruda.....	62
4.7.2. Perfil sensorial de la crema de leche tratada con ultrasonido (37 Hz).	63
En la grafica 9, se presenta un consolidado del perfil sensorial de la crema de leche tratada con ultrasonido (37 Hz) a una temperatura de 30 °C y los tiempo de exposición evaluados (2, 5 y 10 min) durante los 10 días de almacenamiento en refrigeración (4 ± 1 °C).....	63
4.7.3. Índice global de la calidad de las muestras de crema tratadas con ultrasonido.	
65	
4.8. DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DEL EFECTO DEL ULTRASONIDO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS, ENZIMÁTICAS, Y SENSORIALES DEL ALMACENAMIENTO EN LA CALIDAD DE CREMA DE LECHE.	74
5. CONCLUSIONES.....	77
6. RECOMENDACIONES	79
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
8. ANEXOS.....	99

RESUMEN

El ultrasonido ofrece una alternativa diferente para la conservación y preservación de los alimentos, además de no presentar efectos adversos sobre los materiales donde se aplican. La leche cruda y sus derivados son alimentos ricos en nutrientes, la crema de leche cruda como subproducto de la transformación industrial es susceptible de deterioro por la alta carga microbiana y presencia de enzimas que desarrollan defectos no deseados en el producto (rancidez, oxidación, crecimiento de hongos entre otros). El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto del Ultrasonido sobre la microbiota presente en crema de leche cruda con el fin de disminuir su carga bacteriana. Las muestras de crema de leche cruda se recolectaron de la planta de producción de la empresa Freskaleche S.A.S. del Municipio de Aguachica, Cesar. Todos los análisis se hicieron por triplicado, tomando como base la cantidad promedio de crema de leche diaria con muestras aleatorias empacadas, rotuladas en bolsas de polietileno de baja densidad (300g) y refrigeradas (4 ± 2 °C); los experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones de la empresa evaluando las características químicas (pH, acidez), microbiológicas (mesófilos aerobios, coliformes totales, hongos y levaduras), enzimáticas (fosfatasa alcalina y peroxidasa), reológica (textura) y sensorial (color, olor y sabor) antes y después del tratamiento con ultrasonido (US) a una frecuencia de 37 KHz, en un baño ultrasónico, 500 W., con tiempos 2, 5 y 10 minutos y temperaturas 30 y 40 ± 2 °C, almacenadas en condiciones de refrigeración (4 ± 2 °C) durante 10 días, (0, 3, 5, 7 y 10 días). Los datos experimentales obtenidos fueron evaluados estadísticamente mediante un diseño factorial (tiempo y temperatura de exposición a US en 4 y 2 niveles: 2, 5 y 10 min, a 30 y 40 °C respectivamente; se realizó un análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de significancia de $p \leq 0.05$ y prueba POST HOC de Tukey mediante el paquete estadístico SPSS v. 19.0. De otra parte se encontró que el ultrasonido no tuvo ningún efecto sobre las enzimas evaluadas. Se encontró que el ultrasonido tiene un efecto bactericida sobre la carga inicial de la crema de leche cruda producida en la planta de Freskaleche demostrando que el ultrasonido a 37 KHz a una temperatura de 40 °C disminuye 62% la carga microbiana inicial de mesofilos aerobios y 96% de coliformes totales, sin embargo los jueces semientrandos evidenciaron que el ultrasonido a 40 °C por 10 minutos afectaron las características de la crema de leche en cuanto textura, sabor, color respecto a la crema de leche no tratada.

Palabras clave: bactericida, carga microbiana, crema de leche, ultrasonido, sensorial

INTRODUCCIÓN

Los consumidores de la industria de los alimentos están más preocupados por los aspectos relacionados con la higiene de fabricación de alimentos así como la seguridad y transparencia en los métodos de producción. Freskaleche como empresa láctea de la región no es ajena a esta situación, presentando problemas relevantes como: acidificación de la crema de leche antes de ser ultra pasteurizada, alta carga bacteriana de la leche cruda y prolongado tiempo de espera a temperatura ambiente (35 ± 2 °C) en el proceso de descremado de la leche cruda lo que conlleva a un incremento en la acidez, variación de pH, inestabilidad proteica entre otros. La calidad microbiológica de la crema de leche depende directamente de la carga bacteriana inicial de la leche cruda, el promedio reportado en los registros históricos del Centro de Acopio de Freskaleche, Aguachica es de 2.150.000 ufc/ml que están por encima de lo establecido por la legislación Colombia, en la Resolución 017 de 2012 (200.000 a 800.000 ufc/ml de leche analizada); por este motivo las prolongadas esperas durante el proceso de descremado de la leche cruda hacen que se pierda gran cantidad de kilos de producto sin alcanzar a tener un proceso térmico final como la ultra pasteurización.

En los últimos años, han surgido alternativas emergentes de conservación de alimentos como el ultrasonido, reduciendo cargas logarítmicas de bacterias a un porcentaje muy bajo sin necesidad de adicionar conservantes químicos, esto conlleva directamente a mejorar la vida útil del producto terminado y a minimizar las pérdidas por acidificación de la crema de leche en procesos intermedios.

El ultrasonido es una onda sonora, con una frecuencia superior a la perceptible por el oído humano (mayores de 16 kHz). Estas ondas a su paso por el alimento producen diversos fenómenos que son los responsables de su acción contra los microorganismos: aumentos de temperatura extremos, cambios de presión y formación de radicales, provocando daños en las paredes de los microorganismos tras provocarles un estrés físico importante. Tiene un efecto mayor en levaduras, bacterias gram positivas y gram negativas que en esporuladas. (Guerrero y Alzamora, 2004). Actualmente se investiga en alimentos líquidos como zumos y leche; intentando alcanzar la letalidad de una pasteurización y una esterilización sin que se deterioren las características organolépticas. Esta técnica cuenta con la ventaja de que se le pueden sumar otras tecnologías durante el tratamiento como el calor y la aplicación de presiones mayores, haciendo así más efectivo el proceso de inactivación. Otro uso que se le puede dar es la inactivación de enzimas

alterantes sin aplicar calor (Zhao y Basir, 2007).

Uno de los objetivos de las nuevas tecnologías en conservación de alimentos es que sea capaz de reducir los microorganismos alterantes y nocivos sin que se vea afectada la calidad sensorial de los alimentos, en este caso la crema de leche cruda. Por ejemplo, los procesos de pasteurización normalmente suelen utilizar unas temperaturas muy elevadas y ello afecta a la calidad organoléptica del producto (Chouliara, 2008). Así mismo el poder conseguir un alimento seguro en el tiempo sin que pierdan sus características sensoriales es la línea de investigación de la tecnología de conservación de los alimentos. Entre los nuevos procesos como las radiaciones ionizantes o las altas presiones hidrostáticas, también se encuentran los ultrasonidos (Chemat, 2011).

Con base en lo anteriormente expuesto, se crea la necesidad de realizar trabajos de investigación que permitan esclarecer el efecto de tecnologías emergentes de carácter no térmico como el ultrasonido, sobre la estabilidad microbiológica de productos de importancia nutricional, causando a la vez un impacto tecnológico positivo en la industria alimentaria de la región. La industria de alimentos en Colombia necesita afrontar de manera competitiva los retos tecnológicos establecidos para las nuevas generaciones, y para ello requiere un replanteamiento de las tecnologías de procesamiento actualmente utilizadas. Por este motivo, esta investigación propuso evaluar el efecto de la aplicación del ultrasonido en la micro flora bacteriana presente en la crema de leche cruda procesada en la empresa Freskaleche S.A., con el fin de reducir su alta carga microbiana y llevarla en un futuro no muy lejano a niveles industriales. Asimismo, Chemat et al. (2017) consideró que el ultrasonido es una tecnología innovadora de procesamiento de alimentos y su papel en la promoción de la alimentación sostenible. La industria del ultrasonido, en conjunto con el microondas, pulsos eléctricos, campos magnéticos, presión hidrostática, procesamiento de fluidos supercríticos; moldean una tecnología ecológica utilizada durante 30 años y lleva una gran cantidad de fuerza hoy además, los nuevos procesos alimentarios permiten una reducción significativa en los tiempos de procesamiento ahorro general en el consumo de energía, al tiempo que garantiza la seguridad de alimentos y amplios beneficios para la industria (Misra et al., 2017) la potencia de ultrasonido genera una serie de efectos que resultan del colapso de la cavitación las burbujas, que son beneficiosas en el procesamiento de alimentos. Algunos de las aplicaciones más útiles son la extracción asistido por ultrasonido, emulsificación, viscosidad cambios y modificación de proteínas, cristalización y esterilización, secado y ablandamiento de la carne (Mason et al., 2015) el procesamiento del ultrasonido cubre una amplia gama de frecuencias acústicas, comenzando con una frecuencia como bajo como 18 khz hasta varios mhz las

aplicaciones son diversos como el espectro de frecuencia es amplio al final de menor frecuencia 18 khz a aproximadamente 100 khz, también conocido como potencia ultrasónica, los efectos son causada principalmente por la inestabilidad de la cavitación (knoerzer et al., 2015).

1.1 PRODUCCIÓN DE LECHE.

En todo el mundo, el sector de producción de leche y desarrollo tecnológico de los lácteos probablemente sea uno de los sectores agrícolas y tecnológicos más golpeados por la violencia y la competencia de precios. En gran parte de los países desarrollados el gobierno subsidia un dinero para el desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías, lo que fomenta una gran producción y a mejorar la calidad en el tiempo para hacerlos más competitivos. Los gobiernos pagan los subsidios a las exportaciones a fin de colocar el excedente de la producción en los mercados mundiales, y tanto los países desarrollados como los países en desarrollo levantan y colocan impuestos para proteger su sector lechero de una competencia poco legal. Estas variaciones en el mercado producen considerables y diversos efectos en los productores y los consumidores de los países en desarrollo y los países desarrollados, efectos que son en extremo difíciles de cuantificar (Knips, 2014).

La producción de leche en Colombia se realiza bajo una gran diversidad de sistemas de producción que se hallan determinados, entre otros factores, por la variedad de alternativas tecnológicas que se utilizan, los ambientes socio – culturales y las formaciones agroecológicas en los que se encuentran inmersos así como por los objetivos económicos que se establecen. Por las mismas razones, la calidad higiénica y nutricional de la leche producida es muy variable, así como el impacto ambiental que se genera, las relaciones laborales existentes y el cuidado que se prodiga a los animales (Correa, 2005).

El consumo aparente de leche se ubicó en 143 litros por persona en 2014, cifra que si bien ha registrado un aumento desde 1990, se mantuvo estable en los últimos 2 años, ubicándose entre los 140 y 141 litros según reporte de Fedegán y el Fondo Nacional del Ganado, FNG en la década de los 90 los colombianos consumían 115 litros y para el año 2000 la cifra había aumentado 15 litros, mientras que en 2013 se mantenía en 141. (FEDEGAN, 2015). El consumo regional de leche se divide en dos preferencias, leche cruda y leche procesada. Al revisar la cultura del municipio aún se encuentran lugares de expendió de leche cruda donde los controles son mínimos por parte de la Secretaria Municipal de Salud, y el otro nivel de consumo lo hacen de varias empresas de lácteos de orden nacional y regional, se puede decir que el consumo per cápita está muy cercano al orden nacional, 140 litros promedio al año.

En el municipio de Aguachica, esta actividad ocupa entre el 40 % y 70 % del área total de la finca con pastos naturales en rastrojados y medianamente manejados. Cerca de 60.000 hectáreas están dedicadas a la ganadería con una población ganadera, en 1999, de 83.500 cabezas de ganado, aproximadamente. La ganadería bovina que se explota en Aguachica es de doble propósito (carne y leche) y de levante, con gran potencial de producción lechera y cárnica. Se desarrolla en unidades entre 50 y 140 hectáreas. La relación de ganado vacuno para doble propósito, de especie criolla y cebú, oscila entre 40 y 150 animales, y para levante entre 70 y 140 cabezas por unidad productiva. En cuanto a la leche, Aguachica en 1999 tenía 17.000 vacas de ordeños que en promedio producían 59.500 litros de leche por día, equivalentes a 3.5 litros de leche por vaca al día. Con esta producción Aguachica se ubicaba como el cuarto Municipio productor de leche en el Cesar, después de Valledupar, Codazzi y San Martín (CDIM, 2001).

La leche cruda en la región del sur de Cesar y sur de Bolívar, donde se centra la recolección de la empresa Freskaleche, acopia un volumen de 120.000 litros promedio al día durante época de invierno y decayendo a un volumen de 80.000 litros en época de verano, teniendo una compra anual de aproximadamente unos 37 millones de litros de leche. La ubicación estratégica tanto por la compra de leche cruda como de la comercialización de los productos hacen que la planta de Freskaleche sede Aguachica tome fuerza y los directivos de la empresa quieran invertir en ella. El fácil acceso desde varias zonas del país, atraen a compradores y comercializadores, y ven en la empresa una buena opción al momento de la compra de sus productos. La intención de ampliar el portafolio de productos de la empresa y desarrollar un producto que toma gran auge dentro de los consumidores, es la crema de leche, lo que hace que se tenga contemplado la mejora de sus procesos y optimización de la producción. La producción de crema de leche está en un volumen de 2.000 litros diarios, teniendo un proyectado de 10.000 litros diarios en un futuro no muy lejano, siempre y cuando la calidad de la misma pueda garantizarse durante su proceso productivo.

1.2 CREMA DE LECHE.

Es el producto de la concentración de la grasa de la leche, obtenida por separación (Keating, 2002). La separación de la crema o nata se fundamenta en la diferencia de densidad entre los glóbulos grasos (0,93) y la que constituye la leche desnatada (1,036). Cuando la leche se deja en reposo se habla de separación por decantación espontánea o estática, los glóbulos grasos se separan en régimen laminar, es decir, sin turbulencia. La separación mecánica por acción centrífuga, es una operación rápida y en flujo continuo, se recurre a la fuerza centrífuga que separa a los componentes de la leche en capas distintas en base a la densidad, de este modo se obtiene: la crema, la leche

descremada y las impurezas contenidas en la leche (pelos, tierra, guano, etc.) El descremado mecánico se realiza en equipos denominados descremadoras o desnatadoras. (Walstra, 2003).

La grasa de la leche puede ser descompuesta por diferentes bacterias, levaduras y mohos que no constituyen grupos definidos si se tienen en cuenta otras características. Las bacterias son en su mayor parte aerobias o facultativas, proteolíticas y no producen ácido. En la grasa de la leche pueden tener lugar las siguientes modificaciones:

1. Oxidación de los ácidos grasos no saturados, la cual, junto con otras descomposiciones, da lugar a aldehídos, ácidos y cetonas y produce olores y sabores a sebo. Los metales, la luz solar, y los microorganismos oxidantes favorecen las reacciones de oxidación.
2. Hidrólisis de la grasa de la leche a ácidos grasos y glicerol por la lipasa. Es posible que la lipasa estuviese ya inicialmente en la leche o puede tener procedencia microbiana.
3. Oxidación e hidrólisis combinadas para originar rancidez. Las especies bacterianas productoras de lipasas se encuentran en muchos géneros, por ejemplo en los géneros *Pseudomonas*, *Proteus*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium* y otros. Muchos mohos y algunas especies de levaduras tienen actividad lipolítica. *Pseudomonas fragi* y *Staphylococcus aureus* elaboran lipasas bastante termo resistentes, las cuales, si se encuentran en la leche fresca, es posible que resistan la pasteurización. (Jay, 2009).

El contenido de grasa en los productos lácteos (tenor butiro métrico) es de gran importancia económica y nutricional. Las vacas de raza Guernesey producen leche con más tenor graso que las vacas Holstein. Los productos lácteos descremados tienen menores valores de sólidos totales, grasa y energía. El contenido de grasa del queso depende del contenido original de grasa de la leche del cual se partió. La grasa, en la leche se encuentra en estado de suspensión, formando miles de glóbulos de tres a cuatro micras de diámetro por término medio, variando de 1 a 25 micras. Cuando se deja la leche en reposo, estos glóbulos ascienden formando una capa de nata. Estos glóbulos están protegidos por membranas, evitando así ataques enzimáticos. Por centrifugación se separa también la grasa de la leche, con lo que obtenemos dos productos: la leche descremada y la crema. Un centímetro cúbico de leche puede contener cerca de 3,000 a 4,000 millones de glóbulos de grasa. Cuando no se quiere que asciendan a la superficie, se recurre a la homogenización de la leche, la que consiste en dividir a un décimo del normal estos glóbulos de forma que queden más tiempo en suspensión. (Zela, 2005).

Ácidos grasos; la grasa de leche contiene triglicéridos derivados de una amplia variedad de ácidos grasos saturados e insaturados, se diferencia de otras grasas alimenticias por su alto contenido de ácidos grasos saturados de cadenas cortas. Los ácidos grasos presentes en la leche más importantes son: oleico, palmítico, esteárico, mirístico láurico y butírico. El oleico y linoléico son insaturados y líquidos a temperatura ambiente, al igual que el butírico, caproico y caprílico. El resto de los ácidos grasos tienen puntos de fusión altos (31 a 70 °C), por lo que son sólidos a temperatura ambiente. $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_7 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$ El ácido oleico tiene un doble enlace y un punto de fusión de 14° C, por lo que tiene un índice de yodo bajo, lo que nos da una idea de su consistencia. Cuando las vacas comen mucho pasto, aumenta el contenido de ácido oleico, siendo más líquida la grasa. Adicionalmente a los triglicéridos, la grasa de la leche contiene pequeñas cantidades de fosfolípidos como la lecitina y la cefalina, esteroides como el colesterol y vitaminas liposolubles como A, D, E y K. (Gil y Ruiz, 2010)

Muchas de las alteraciones de la nata puede deberse a que duró varios días en la finca antes de ser recogida. Durante este tiempo pueden crecer en ella bacterias lácticas, bacterias que producen gas, y otros microorganismos capaces de alterarla, y a continuación pueden crecer en ella mohos, por ejemplo *Geotrichum candidum* y levaduras que fermentan la lactosa, que sólo se encuentran en la nata en algunas ocasiones.

Los sabores no deseables de la nata pueden ser adquirirlos del pienso que come la vaca, absorberlos del ambiente, o pueden aparecer en ella como consecuencia del crecimiento de microorganismos. Alimentos tales como las cebollas, los ajos, la especie *Galinsoga parviflora* (guascas), el mastuerzo, y el ensilado de mala calidad aportan sabores anormales a la nata (Budhkar, 2014). Los compuestos volátiles que pueden ser absorbidos a partir del aire ambiental constituyen los olores procedentes del establo y de los compuestos químicos que en el mismo se emplean, por ejemplo el queroseno, la gasolina, los sprays anti-moscas, los desinfectantes, etc. La multiplicación de los microorganismos en la nata y en la leche de la cual se obtiene, puede dar lugar a cualquiera de los siguientes sabores desagradables:

- Sabor a queso, producido por lactobacilos
- Sabor a rancio, como consecuencia de la actividad lipolítica llevada a cabo por bacterias y mohos y, tal vez, debido a la lipasa existente en la nata
- Sabor a establo, producido por especies del género *Enterobacter sp.p*
- Sabor a malta, producido por *Streptococcus lactis* var. *Maltigenes*
- Sabor a levadura, producido por levadura

- Sabores a enmohecido, debidos a mohos y a actinomicetos
- Sabores metálicos, producidos por metales disueltos en natas de elevada acidez
- Sabor insípido, como consecuencia de la destrucción del diacetilo por bacterias como por ejemplo por algunas especies del genero *Pseudomonas sp.p*
- Sabor muy ácido, cuando la nata tiene una acidez excesiva
- Sabor a sucio, producido por las bacterias coliformes.

En la nata, los microorganismos pueden producir sabores debidos a reacciones químicas, estos pueden ser: la rancidez, producida por la lipasa de la nata, el sabor a sebo, debido a la oxidación de las grasas no saturadas catalizadas por el cobre y por enzimas bacterianas y favorecida por el pH bajo, el sabor a pescado, debido a la producción de trimetilamina a partir de la lecitina (Spreer, 1991).

1.3 MICROBIOLOGÍA DE LA CREMA DE LECHE CRUDA.

Uno de los aspectos relevantes en esta investigación es la microbiología de la crema de leche.

La flora bacteriana existente en leche cruda, leche pasteurizada, y productos lácteos, pueden llegar a modificar el producto de la siguiente forma:

- a. Los microorganismos pueden producir cambios deseables en las características físico químicas de la leche durante la elaboración de diversos productos lácteos.
- b. Los productos lácteos y la leche pueden contaminarse con microorganismos patógenos o sus toxinas y provocar enfermedad en el consumidor.
- c. Los microorganismos pueden causar alteraciones de la leche y productos lácteos afectando la calidad de sus subproductos (Jay, 2009).

- **Bacterias lácticas.** Son un grupo de bacterias de diferentes géneros, ampliamente distribuidas en la naturaleza. Son formadoras de textura y ayudan al establecimiento de las condiciones para la elaboración de ciertos productos lácteos. Por efecto de la acidez producida por la fermentación de la lactosa, la leche puede llegar a coagular gracias a la coalescencia de las caseínas al alcanzarse el pH iso-eléctrico. En la elaboración de crema y mantequilla una ligera acidificación permite acelerar el proceso y aumentar el rendimiento (Frazier, 1993). Algunas especies producen polisacáridos (gomas, mucina), que aumentan la viscosidad de la leche cambiando su textura *Streptococcus termophilus*,

Lactobacillus bulgaricus, *Leuconostoc cremoris*. Aportan sabor y aroma, ya que como parte de su metabolismo fermentativo se da la producción de acetaldehído, diacetilo, acetoina, acetona, lactonas, ácidos volátiles, alcohol y gas. Este efecto se lleva a cabo por varios mecanismos:

Ciertas especies producen bacteriocinas (*Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Enterococcus spp.*) las cuales son proteínas que se comportan como antibióticos y que inhiben el crecimiento de bacterias relacionadas con estas. Con la producción de ácido y descenso del pH se logra la inhibición de otras especies bacterianas y la conservación de los alimentos; el efecto bio-preservador también se cumple gracias a la competencia por nutrientes que se da entre las diversas especies bacterianas (Mestres, 2004).

- **Estafilococos.** Son anaerobios facultativos, fuertemente fermentadores. Son de gran importancia desde el punto de vista sanitario. Causan mastitis y pueden provocar enfermedades o intoxicaciones en los humanos. *Staphylococcus aureus* produce una exotoxina que causa fuertes trastornos intestinales en los humanos, la cual es termo resistente, por lo cual no es destruida con la pasteurización (Frazier, 1993).
- **Micrococos.** Débilmente fermentadores, forman parte de la flora inocua que contamina la leche cruda. Tienen poca actividad enzimática, por lo tanto son de muy poca importancia como agentes de adulteración en la leche. (Hassan y Frank, 2002).
- **Bacterias esporuladas.** Los Bacillus son bacterias aeróbicas con actividad enzimática variada producen acidificación, coagulación y proteólisis. Los Clostridium son anaerobios estrictos, producen gas. Algunos producen toxinas patógenas (*Clostridium botulinum*). Ambos géneros son de poca importancia en leche cruda, su crecimiento es inhibido por las bacterias lácticas. Cobran importancia en productos lácteos que tengan como fin la ultrapasteurización. (Alais y Lacasa, 2003).
- **Pseudomonas spp.** Más del 50% de la flora Gram negativa de la leche cruda está representada por este género. Juegan un papel importante en la conservación de productos lácteos, ya que además de ser psicrófilas, varias especies tienen un gran poder proteolítico y lipolítico. Además se ha descrito que algunas de estas enzimas resisten temperaturas por encima de los 80 °C, por lo cual pueden causar alteraciones aún en productos elaborados con leches pasteurizadas (Alais y Lacasa, 2003).
- **Enterobacterias.** Las bacterias entéricas pueden separarse en dos grandes grupos; el llamado grupo entérico formado por bacterias que presentan características comunes con las bacterias intestinales; y el grupo de bacterias relacionadas cuyos componentes

presentan en común con los primeros su metabolismo anaerobio facultativo y la capacidad de colonizar ambientes intestinales en situaciones patológicas. Las bacterias del grupo entérico forman un conjunto de microorganismos muy heterogéneo (el contenido de G+C del grupo varía del 40 al 60%) cuya característica común más relevante es ser anaerobios facultativos: desarrollan un metabolismo respiratorio en condiciones aerobias y un metabolismo fermentativo en anaerobias. Sólo algunos miembros del grupo son capaces de respirar NO_3^- aunque esta no es una característica general del grupo. Son todos microorganismos quimioorganotrofos con pocos requerimientos nutricionales por lo que pueden crecer en medios de cultivo relativamente simples. Morfológicamente son bacilos cortos y cocobacilos Gram-negativos (Frazier, 1993).

- **Coliformes.** Se entiende como coliformes todos los representantes de la familia Enterobacteriaceae que desdoblán la lactosa produciendo ácido y gas, los géneros más importantes de esta familia son: *Escherichia spp.*, *Citrobacter spp.*, *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.* y son indicadores de falta de higiene en la rutina de ordeño. Los Coliformes se determinan con medios líquidos y sólidos debido a su acción sobre la lactosa formando ácido (Frazier, 1993).
- **Hongos, levaduras y mohos.** Algunos géneros de levaduras y mohos son de importancia para la industria láctea. Su presencia indica deficientes condiciones higiénico-sanitarias. Pueden producir deterioros en la leche o en productos derivados. Los hongos que producen micotoxinas resultan muy peligrosos, sobre todo a que estos metabolitos son termorresistente (Jay, 2009).
- **Virus.** La leche se puede contaminar con los virus causantes de la Fiebre Aftosa, Estomatitis Vesicular, Brucelosis, los cuales solo se pueden llegar a transmitir a los humanos por consumo de leche o productos lácteos crudos sin procesar (Hassan, 2002).

1.4 LAS ENZIMAS

Según Walstra (2003) las enzimas son sustancias orgánicas, complejas de naturaleza proteica y que actúan como iniciadoras de reacciones químicas permaneciendo intactas después de producir las reacciones.

La leche contiene varias enzimas, algunas se hallan en las membranas de los glóbulos de grasa, por lo que son arrastradas cuando se separa la crema; entre ellos están los reductosos aldehídicos, fosfatosos, etc. Otras enzimas flocculan con la caseína a pH 4.6, por ejemplo los proteasos, catalosos, etc. Muchas veces es difícil saber el origen de las enzimas, ya que las bacterias que

pueden hallarse semejantes a los que se sintetizan en las glándulas mamarias. La actividad enzimática de la leche depende del pH y de la temperatura. La elevación de la temperatura a más de 70 °C provoca su destrucción. Las principales enzimas presentes en la leche son las siguientes:

Las hidrolasas: lipasa, fosfatasa, amilasa y lactasa

- Lipasas (responsables de la rancidez de la leche),
- Fosfatasa (en la membrana del glóbulo de grasa),
- Proteasas (asociadas a la caseína)
- Amilasas (hay enzimas desnitrificantes y enzimas sacarificantes, α y β amilasas respectivamente),
- Lisozima, es importante desde el punto de vista de la nutrición ya que facilita la precipitación de la caseína en forma de floculo lo que mejora su digestibilidad; por otra parte posee propiedades bacteriostáticas. (Celis, 2009).

Las oxidoreductasas: peroxidasa y catalasa.

- Lactoperoxidasa,
- Reductasualdolasa (asociada a la membrana del glóbulo de grasa),
- Catalasa,

a. Lipasas. Esta enzima produce la hidrólisis de la grasa descomponiendo los glicéridos en glicerol y ácidos grasos. La liberación del ácido butírico es una de las causas del sabor rancio en la leche. La lipasa nativa de la leche es termosensible y se inactiva con la pasteurización lenta a bajas temperaturas, pero la lipasa que producen las bacterias como las *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Bacillus*, principalmente, son termorresistentes y solo se inactivarán sometiendo la leche a altas temperaturas, tal es el caso de la alta pasteurización. Las lipasas están ligadas fuertemente a la caseína de la leche y se puede extraer de la cuajada formada por el cuajo, tratándola con soluciones tampones. (Alais, 2003).

b. Fosfatasas. La leche dos enzimas que hidrolizan los ésteres fosfóricos, la fosfatasa alcalina cuyo máxima actividad es a un pH de 8 y la fosfatasa ácida cuya actividad máxima es a un pH de 4. La fosfatasa alcalina es la de mayor importancia por su sensibilidad al calor. Esta es una metaloproteína que contiene en su molécula Zinc (Zn) y está ligada a la materia grasa. La resistencia al calor de esta enzima es un poco superior a la de las bacterias patógenas que pueden existir en la leche por lo que se usa en la industria para el control de la pasteurización

de la leche, así sea la pasteurización alta o lenta. Cuando la Fosfatasa se destruye lo hacen también las bacterias patógenas. La prueba fosfatasa consiste en valorar colorimétricamente el fenol que se libera del fenilfosfato - disódico por la acción de la enzima (Alais, 2003)

c. Amilasa. La acción principal de esta enzima es la sacarificación del almidón cuya reacción se puede identificar con la prueba del yodo. 100 ml de leche normal a 25 °C hidrolizan 22.5 g de almidón soluble. Si se calienta a 60 °C por 1 hora o a 65 °C por 30 minutos la enzima se destruye (Alais, 2003).

d. Lacto – peroxidasa. Fue la primera enzima que se descubrió en la leche, su contenido en la leche representa un 0.2% del total de contenido proteico. Es una proteína hémica por contener en su molécula un átomo de hierro. Es bastante resistente al calor pues solo se destruye sometiéndola a 70 °C por 30 minutos o a 80 °C por 30 segundos. Es una enzima de oxidación indirecta, porque libera el oxígeno atómico de los peróxidos como el agua oxigenada (H₂O₂) (Alais, 2003).

e. Catalasa. Esta enzima reacciona con el peróxido de hidrógeno liberando agua y oxígeno molecular. Debido a que los leucocitos producen catalasa se utiliza para detectar el origen de leches mastíticas ya que el volumen de oxígeno producido es proporcional a la cantidad de leucocitos en la leche. Se encuentran tablas que relacionan ambos factores. Sin embargo esta prueba no se puede utilizar en leches muy contaminadas porque los resultados podrían confundirse con el efecto producido por la catalasa de las bacterias. Así mismo la cantidad de catalasa varía según la raza, la alimentación y el momento de ordeño de la vaca, por lo que el uso de esta prueba ha disminuido apreciablemente (Walstra, 2003).

Las enzimas tienen un gran factor determinante en el deterioro de la leche cruda y sus derivados, por tal motivo se deben revisar y tener presentes a la hora de poder darle cualquier tratamiento para su inactivación o efecto retardante. La leche contiene numerosas enzimas relacionadas con el grupo de las albúminas, con las cuales generalmente precipitan. Algunas se encuentran concentradas en la membrana superficial de los glóbulos grasos y son arrastradas por la nata (reductasa aldehídica, fosfatasa); otras precipitan con la caseína a pH 4,6 (proteasa, catalasa, etc.). La distribución de las enzimas de la leche ha dado lugar a numerosos estudios en los que los resultados a veces son discordantes, lo que puede explicar el método de fraccionamiento. Por ejemplo, la catalasa se encuentra en gran parte con la caseína separada por precipitación, mientras que queda muy poca en la caseína obtenida por ultrafiltración. Por otra parte, en la leche se encuentran activadores e inhibidores de la enzima cuya acción depende de su concentración en la

fracción considerada. A veces es difícil determinar su origen, ya que las bacterias, que frecuentemente se encuentran en la leche, producen enzimas del mismo tipo; el desarrollo de estas bacterias aumenta, por consiguiente, la cantidad de enzimas presentes o aportan otras nuevas. (Morata, 2011).

1.5 TECNOLOGÍAS EMERGENTES

Según Chemat (2011), varias de las técnicas de procesado de los alimentos tradicionales han alcanzado ya su estado óptimo, sin embargo las demandas de los consumidores y las regulaciones ambientales, cada vez más son más estrictas, conducen a su modificación o a la implementación de nuevos procesos. La aplicación del ultrasonido de potencia en la industria láctea se ha limitado al tratamiento previo de la leche para elaborar algunos quesos y con más énfasis en el yogur, con el objetivo de reducir la flora microbiana, inhibir la actividad enzimática, promover una mayor homogeneidad en la matriz grasa-proteína, mayor estabilidad, color más blanco y mejor textura. (Barbosa y Bermúdez, 2008). Actualmente, para procesar y conservar alimentos que cumplan con éstas demandas, deben efectuarse modificaciones en los procesos de conservación tradicionales adoptando nuevas tecnologías. (Knorr, 2004).

El ultrasonido de alta intensidad es una de estas tecnologías promisorias, la cual ha traído considerable interés en la ciencia y tecnología de los alimentos, debido a sus efectos benéficos en el tratamiento y la conservación de alimentos. (Barbosa y Bermúdez, 2008). Con esta tecnología se pueden desarrollar mejoras en la calidad e inocuidad de los alimentos procesados sin recurrir a procesos físicos severos, ofreciendo un potencial para mejorar los procesos existentes, así como para el desarrollo de nuevas opciones de procesos, pues ésta, en base a la tecnología convencional, logra altos rendimientos en la producción, reduce tiempos de procesado, mejora propiedades como el sabor, la textura, el flavor, el color, inhibe-controla la proliferación de microorganismos patógenos (Mawson, 2008), requiere menor consumo de agua y energía contribuyendo adicionalmente a la conservación del medio ambiente, siendo una tecnología confiable y aceptable (Mason, 1991).

Tradicionalmente, el tratamiento térmico, en la pasteurización y la esterilización con el empleo de altas temperaturas en función del tiempo tienen la capacidad de destruir: microorganismos y enzimas (microbianas y propias de la leche), siendo estas últimas responsables del deterioro de los alimentos. Sin embargo, su eficacia depende de la temperatura de tratamiento y el tiempo y esto lleva a la pérdida de nutrientes, el desarrollo de sabores indeseables, colores y el deterioro de las propiedades organolépticas de los alimentos (Alais, 2003). Como resultado están las nuevas

tecnologías no térmicas que están prometiendo un panorama de gran interés para la conservación de los alimentos. Las nuevas tecnologías se están desarrollando para asegurar la conservación de alimentos sin el uso de conservantes, sin la pérdida nutricional y las características organolépticas propias del alimento (textura, color, sabor), con un bajo consumo de energía, un coste competitivo, un respeto al medio ambiente y un alto grado de seguridad (Raventos, 2005).

El ultrasonido de alta intensidad no es una tecnología estandarizada, por lo cual es necesario su desarrollo y escalado ante cada nueva aplicación, además que un mejor entendimiento de los complejos mecanismos fisicoquímicos de acción del ultrasonido de alta intensidad relacionados con el tiempo de aplicación (duración), intensidad y frecuencia de las ondas de ultrasonido y sus efectos en las propiedades tecnológicas y funcionales de los alimentos puede reforzar las aplicaciones actuales del ultrasonido y contribuir a la presencia del ultrasonido en los procesos de la industria de los alimentos en el futuro (Soria y Villamiel, 2010).

1.6 ULTRASONIDO

El ultrasonido, al igual que los sonidos, son ondas mecánicas de tipo longitudinal que se propagan por las partículas del medio como un movimiento ondulatorio, a una velocidad determinada a partir de su foco emisor. La diferencia entre ambos es que en los primeros no son capaces de estimular el mecanismo de audición. La capacidad de percepción del sonido depende de que su intensidad supere un umbral determinado y de que su frecuencia se encuentre entre ciertos límites. El espectro sonoro para el ser humano comprende una zona audible, que varía entre los individuos según la edad, aunque se admite que abarca desde los 16 hasta los 20.000 Hz. Existen dos zonas inaudibles, una por debajo de los 16 Hz y otra por encima de los 16.000 o 20.000 Hz (ultrasonidos). El ultrasonido de emisión continua aplicada a intensidad media o baja, se emplean fundamentalmente por su efecto térmico en profundidad. A intensidades elevadas, en cambio predomina, la acción mecánica intensa, con gran capacidad destructiva (Martínez, 1998).

Ultrasonidos de alta potencia tiene solo recientemente hasta hace pocos años un uso aplicado comercialmente a gran escala en las etapas de emulsión, homogenización, extracción, cristalización, deshidratación, pasteurización a baja temperatura, desgasificación, antiespumante, inactivación y desactivación de enzimas, reducción de tamaño de partículas y de alteración de la viscosidad. Esto se debe a un mejoramiento del diseño de los equipos (Pataste y Bates, 2008).

La energía acústica es uno de los tipos fundamentales de energía que se encuentra en la naturaleza. Los sonidos son oscilaciones mecánicas en el tiempo que tienen lugar en el seno del material por

el que se propagan (Muleta, 2003). A diferencia de las ondas electromagnéticas, como las microondas, las ondas acústicas necesitan de un medio material para su propagación al tratarse de ondas elásticas. Así, las ondas electromagnéticas pueden transmitirse por el vacío mientras que el sonido no. Los ultrasonidos son ondas acústicas de frecuencia superior a 20 kHz, valor que representa el límite de audición humano (Raja, 2004). Esta clasificación no está basada en ningún tipo de fundamento físico, ya que las leyes de generación y propagación del sonido son las mismas en todo el espectro de frecuencia. (Figura 1)

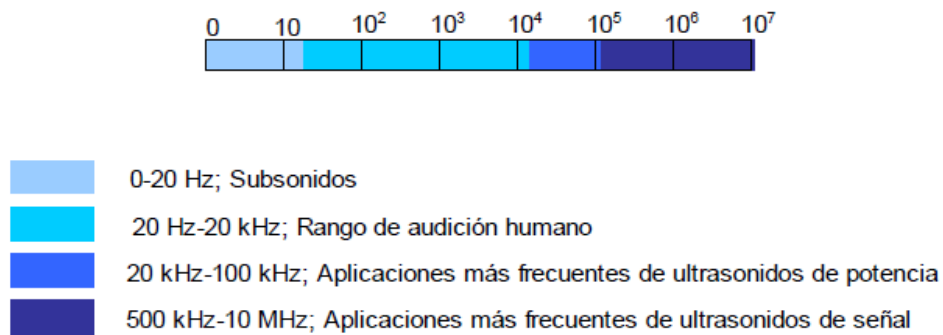


Figura 1. Clasificación del sonido en función de la frecuencia. Fuente: Young, 2009, Física Universitaria, volumen 1.

1.6.1 Baños ultrasónicos

Los baños ultrasónicos son la fuente de ultrasonido más empleada en la mayoría de los resultados experimentales publicados en la literatura. Los baños ultrasónicos usan cargas con distintas polaridades, hacia las cuales el material responde por contracción o expansión, además son altamente eficientes (>95%) y pueden utilizarse en un amplio rango de frecuencias (Mason, 1991).

Los baños ultrasónicos son económicos, simples y versátiles. Constan de un recipiente metálico el cual tiene adosados a sus paredes, o en el fondo, uno o más transductores. Los productos pueden ser sumergidos en el baño para ser tratados con el ultrasonido. En los baños de ultrasonido, cuando los transductores vibran, estos transmiten su vibración a todo el recipiente metálico, a su vez, éste transmite la vibración al líquido contenido en el recipiente. El problema de estos equipos se encuentra en que la reflexión en la interface aire-líquido produce la pérdida de ondas y un campo de ultrasonido irregular dentro del baño. Bajo estas circunstancias, un gran número de repeticiones

son necesarias para obtener conclusiones significativas (Mulet, 2003). El hecho de calentar la leche a una menor temperatura tiene ventajas. Según el estudio, algunas proteínas de la leche empiezan a desnaturalizarse (alterarse o romperse) a 63°C, cambiando el sabor de la leche al crearse nuevos compuestos volátiles y eliminarse otros. La leche pasteurizada adquiere así un sabor distinto al de la leche cruda. La mayoría de los compuestos aromáticos presentes en la leche fresca normal son compuestos carbonílicos, cetonas, ésteres, terpenos, aldehídos, ácidos grasos libres y compuestos de azufre. Mediciones realizadas en los dos compuestos más significativos detectados, dimetil amina y sulfuro de dimetilo, mostraron concentraciones similares en la leche cruda y sonicada, mientras que en la leche pasteurizada eran hasta 40 veces mayor (Mestres, 2004).

1.6.2 Tratamiento ultrasónico

El uso de ultrasonidos para eliminar las bacterias coliformes y otros patógenos que crecen en ambientes oxigenados, necesita la mitad de energía que el proceso de pasteurización a alta temperatura. De hecho, según el estudio, la sonicación supera con creces la tasa de destrucción de gérmenes exigida por la FDA y aunque el sistema experimental resulta excesivamente lento para su comercialización, los investigadores ven claro que sería posible desarrollarlo para conseguir la velocidad de procesamiento de los actuales sistemas de pasteurización. El tratamiento de ultrasonido no cambió el pH de patrón de PLA, y menos agua que se necesitaba para saturar los sustratos bajo el sistema mecánico-agitación asistido por ultrasonidos. Mejor calidad demostró el análisis de los aceites asistidos por ultrasonido, el tratamiento no cambió significativamente el valor PV de desgomado aceite de colza ($P > 0,05$), los resultados indican que el ultrasonido podría ser una manera eficaz de reducir el tiempo, el agua y la dosis de enzima utilizada en el proceso de desgomado PLA. El mecanismo de inactivación microbiana por ultrasonidos de potencia es a través de la cavitación, la generación y colapso de micro burbujas. Colapso de la burbuja dentro de un líquido resultados medianos en temperaturas localizadas de hasta 5500 °C y presiones de hasta 100 MPa. Consecuentemente la intensa energía local y alta presión lograr una localizada efecto de la inactivación. Los cambios de presión que se producen a partir de estos implosiones son el principal mecanismo de ruptura celular microbiana (Piyasena, 2003). Un número de parámetros tales como la frecuencia y amplitud de las ondas de ultrasonido, así como la temperatura y la viscosidad de la influencia medio líquido el grado de cavitación (Sala 1995), (Mason, 1996). En los niveles más altos de amplitud que corresponde a intensidades de ultrasonido superiores, de acuerdo con estudios anteriores (Guerrero, 2001). La medición de la amplitud en lugar de poder como una indicación de la ultrasónico cavitación se divulga para ser un método fiable para la indicación de la potencia de ultrasonidos (Tsukamoto, 2004). La levadura presentado

inactivación podría ser de una combinación de física y química mecanismos que se producen durante la cavitación. Los efectos físicos de sonicación puede no resultar en la inactivación de la levadura debido al hecho de que células de levadura son relativamente rígidos y no podrán ser alterados por la acción de microcorrientes (Iida, 2008) la ruptura de las células de levadura debido a las burbujas de cavitación y la liberación de la proteína intercelular de células de levadura por acción del ultrasonidos podría ser propuesto como un método para evaluar los efectos físicos (mecánica) del campo ultrasónico. La cavitación se refiere a la formación de burbujas de gas y el vapor de agua causado por la onda de presión que viaja a través del líquido estas burbujas crecen sobre varias ciclos de presión hasta alcanzar un tamaño inestable y sufre un violento colapso, generando altas presiones (hasta 2000 bar), temperaturas (hasta 5000 K) y cizallamiento (Schössler et al., 2014; Knoerzer et al., 2015).

El efecto de la sonicación sobre la inactivación microbiana (*E. coli* y *S. mutans*) y el mecanismo de inactivación se basa principalmente sobre los efectos químicos. (Ciccolini, 1997) las células de levadura podrían contener núcleos de cavitación y sonicación y provocarían una cavitación interna, así como microcorrientes interna, modificando la estructura celular. Efectos bactericidas en células de levadura se reportaron durante las etapas iniciales de tratamiento con ultrasonidos, con la bactericidas y bacteriostáticos efectos aumentando gradualmente con el tiempo y la intensidad de la sonicación (Tsukamoto, 2004).

El ultrasonido requiere un medio elástico para extenderse y funciona en frecuencias de 20 kHz a 10 MHz. Los principales efectos de los ultrasonidos en un medio líquido que se atribuyen a los fenómenos de cavitación, que se emiten a partir de los procesos físicos que crean, agrandan y implosionan micro burbujas de los gases disueltos en el líquido mediante la compresión y descompresión de las moléculas que constituyen el medio (McClements, 1997). El colapso de la burbuja de cavitación crea un punto transitorio caliente con temperatura elevada y presión localizada, que se han calculado a ser de hasta 5000 K y 5000 atm, que puede acelerar drásticamente la reactividad química en el medio (Flint y Suslick, 1991). Este fenómeno ha encontrado numerosas aplicaciones en la industria alimentaria, como el procesamiento, extracción, emulsión, la preservación, la homogeneización, entre otros (Chemat, 2011).

El procesamiento de ultrasonido presenta un cierto número de parámetros que deben ser cuidadosamente estudiados ya que pueden influir en el proceso. Además de los parámetros intrínsecamente relacionados con el dispositivo de ultrasonidos, tales como la frecuencia, longitud de onda y amplitud de la onda, la energía de ultrasonidos y la intensidad consiguiente tienen

también un efecto sobre el proceso y puede ser optimizado. El efecto de la frecuencia puede estar vinculado no sólo para el tamaño de la burbuja de cavitación, sino también a su influencia en la resistencia a la transferencia de masa (Mulet, 2003). Aunque la literatura reporta las alteraciones en los materiales se aumenta directamente con la energía de ultrasonidos (por inducir mayores fuerzas de corte, dependiendo de la naturaleza y las propiedades del medio), en la industria alimentaria este parámetro se optimiza para la potencia mínima necesaria para lograr el mejor resultados (Feng, 2010). Otro parámetro tal como la temperatura, el tiempo de tratamiento y el tipo de disolvente (si lo hay) pueden afectar el proceso y por lo tanto se debe tomar en consideración.

Además de su aplicación en procesos de transferencia de materia, los ultrasonidos de potencia se han utilizado en otros campos de la tecnología de alimentos. Entre otras, destacan las aplicaciones en procesos de transferencia de calor, inactivación de microorganismos y enzimas, operaciones de limpieza, mejora de reacciones químicas, tenderización de carne, formación de emulsiones y en procesos de corte de alimentos (Javanaud, 1988; Mason, 1996; Cárcel, 1999).

Cuando las esporas bacterianas se exponen simultáneamente a las ondas ultrasónicas y al calor, hay una reducción de la resistencia de las esporas. El efecto es máximo cuando los dos efectos son simultáneos, aunque cuando la ultrasonicación se realiza inmediatamente antes del calentamiento se reduce cierta reducción a la resistencia (Ray, 2010). En España ha sido estudiado este fenómeno y se denomina manotermosonicación (MTS) o termoultrasonicación. Además de las esporas, se ha demostrado que la MTS es eficaz para reducir la termoresistencia de las enzimas peroxidasa, lipoxigenasas y polifenoloxidasas.

En un primer estudio del efecto de la MTS en la termoresistencia usando solución de Ringer de la cuarta parte de concentración, el valor D a 110 °C de una cepa de *B. Cereus* fue reducido de 11.5 a -1.5 minutos y el de una cepa de *B. Licheniformis* de D a 99 °C desde 5.5 hasta 3 minutos. En un estudio posterior que usó leche entera y dos cepas de *B. subtilis*, los valores de D a 100 °C fueron reducidos de 2.59 a 1.60 minutos en una cepa, y de 11.30 a 1.82 minutos en otra. Los valores z equiparables fueron 9.12-9.37 y 6.72-6.31, respectivamente. La ultrasonicación se llevó a cabo a 20 kHz y 150 W el valor z parece confirmar la repercusión que tiene la MTS en los valores z. Por lo que se refiere al mecanismo posible mediante el cual la termoresistencia de las esporas bacterianas se reduce mediante tratamientos ultrasónicos un estudio que utilizó *B. stearothermophilus* averiguó que el tratamiento ultrasónico efectuaba la liberación de calcio, ácido dipicolínico, ácidos grasos, y otros componentes de peso molecular bajo. Se creía que el efecto de

esto en las esporas llevaba a un estado de hidratación modificado y, de este modo, reducía la termoresistencia. Estos no explicarían el efecto de la MST en las enzimas (Ray, 2010).

1.6.3 Uso industrial de ultrasonido

En 1998, Earnshaw, estudio, el uso industrial de la energía ultrasónica se ha explorado desde mediados del siglo 20, pero sólo unos pocos números de aplicaciones se han introducido hasta ahora en el mercado. (Leistner, 2000), durante los últimos diez o quince años un renovado interés para el procesamiento de ultrasonidos ha aparecido, especialmente en aquellos sectores en los que la energía ultrasónica puede representar una herramienta limpia y eficiente para mejorar o producir efectos (Mason, 1996). Tal parece ser el caso de relevante sectores como la industria alimentaria, el medio ambiente, los productos farmacéuticos y los productos químicos fabricación, maquinaria, etc., donde ultrasonidos de potencia se está convirtiendo en una tecnología emergente para el desarrollo del proceso. El potencial de los ultrasonidos de potencia implica procesos físicos y químicos. Los procesos físicos son principalmente adscritos a efectos mecánicos de las ondas de alta potencia en cualquier medio, mientras que los procesos químicos se refieren a efectos químicos inducidos por la cavitación ultrasónica en líquidos. Los últimos procesos se incluyen en el término de sonoquímica. El término general para toda la zona es procesamiento de ultrasonidos. El posible problema significativo en la aplicación de alta intensidad de ultrasonido para procesamiento industrial es el diseño y el desarrollo de los sistemas ultrasónicos de potencia eficientes (generadores y reactores) capaz de trabajar a gran escala con éxito operación adaptado específicamente para cada proceso individual (Mulet, 2003). En el área de procesamiento de ultrasonidos en medios fluidos y más específicamente en los gases, el desarrollo de la familia de generadores de energía con amplios radiadores ha contribuido fuertemente a la aplicación a semi-industrial y etapa industrial de varias aplicaciones comerciales, en sectores como la industria alimentaria, el medio ambiente, proceso para fabricación, etc. Por otra parte, el desarrollo de reactores de cavitación para el tratamiento de líquido en continuo flujo está ayudando a introducir en la industria del amplio potencial de la zona de sonoquímica (Herrero, 2006).

Los nuevos sistemas experimentales diseñadas y desarrolladas por los diferentes procedimientos de secado constituyen la base modelos a una escala superior para aplicaciones industriales. Entre las tecnologías de ésta naturaleza se encuentran las altas presiones, irradiación, pulsos de campos eléctricos de alta intensidad, campos magnéticos oscilantes y el ultrasonido (Beyza, 2007), siendo esta última una tecnología que resulta más económica comparada con las anteriormente citadas. Estas tecnologías han sido estudiadas para la mejora de la producción en las industrias de frutas y

vegetales, cárnicas y lácteos siendo principalmente empleadas en alimentos líquidos o acuosos (Herrero, 2006).

La tecnología de ultrasonido, desarrollada durante la Primera Guerra Mundial para la detección de los submarinos, cuenta hoy con variadas aplicaciones en alimentos. Los ultrasonidos pueden definirse como ondas acústicas inaudibles de una frecuencia superior a 20 kHz. Se diferencian los ultrasonidos de baja intensidad (potencia menor a 1 W/cm² y frecuencia de 0.1 - 20 MHz) o de alta intensidad (potencia de 10 - 1000 W/cm² y frecuencia menor a 0.1 MHz). Los primeros son excelentes para medir propiedades del medio en el que se propagan ya que no producen ninguna modificación. El ultrasonido de alta intensidad, al poseer una frecuencia más baja y mayor potencia, produce cambios físicos y químicos en el medio a través de la generación y subsiguiente colapso de burbujas de cavitación, las cuales aparecen, crecen y colapsan dentro del material donde se propaga. Esto ocurre asimétricamente cerca de las interfaces y sobre las superficies (Villamiel, 2006) El ultrasonido tiene las mismas propiedades de las ondas del sonido, como la reflexión, interferencia, absorción y dispersión, además de propagarse a través de líquidos, sólidos y gases (Torley, 2007). Durante la cavitación se llegan a alcanzar dentro de las burbujas, durante tiempos muy cortos, temperaturas de hasta 5.000 °C y presiones de 1000atm (Dolatowski, 2007), con velocidades de calentamiento y enfriamiento de 10⁹ °C/s. (Villamiel, 2006).

Aunque es un proceso no térmico, también ha de considerarse que parte de la energía puede absorberse como calor elevando en cierta medida la temperatura del alimento. Para llevar a cabo un tratamiento exitoso con ultrasonidos (con o sin combinación con otros procesos) han de tenerse en cuenta factores como la amplitud de las ondas, el tiempo de exposición, el tipo de microorganismo o enzima, el volumen, composición y pH del alimento, así como la temperatura y la presión en los procesos combinados (Mason, 2002). La combinación del ultrasonido con calor o presión inactiva microorganismos y enzimas especialmente resistentes al calor. Dado que se ha visto un escaso efecto del ultrasonido sobre las enzimas y los microorganismos, la mayoría de las investigaciones se han encaminado a la combinación del ultrasonido con calor (termosonicación), presión (manosonicación) o ambos (manotermosonicación), encontrándose un efecto aditivo o sinérgico, dependiendo de cada caso (Guerrero y Alzamora, 2004). Estas combinaciones han resultado ser muy útiles en la inactivación de microorganismos y enzimas especialmente resistentes al calor. La manosonicación y la manotermosonicación pueden ser particularmente eficaces en la pasterización y esterilización de mermeladas, salmueras o huevo líquido, y para la descontaminación de vegetales crudos (Vercet, 2001). La termosonicación consiste en la aplicación del ultrasonido combinado con incrementos de temperatura aproximadamente de entre

10 y 20 °C por encima de la temperatura ambiente, ya que un aumento mayor de la temperatura reduce el efecto de la cavitación al elevarse la presión de vapor del alimento (Teorema, 2009). Efecto del ultrasonido de alta intensidad en los componentes de los alimentos, históricamente el principal impedimento de la aplicación del ultrasonido en los productos lácteos ha sido la carencia de los equipos convenientes para su uso a gran escala. La mayor parte de éstos estudios se han realizado en discontinuo. Sin embargo, en los procesos en flujo continuo resulta más fácil llevar a cabo el escalado a nivel de planta piloto e industrial (Guerrero y Alzamora, 2004).

a. Inactivación enzimática

Para evitar la desnaturalización, una enzima tiene que mantener a su conformación nativa. Interacciones hidrofobias, enlaces de hidrógeno, interacciones de Van der Waals, pelado de iones, electrostática fuerzas y restricciones estéricas estabilizan el tridimensional estructura molecular de las proteínas globulares. Para la estabilización de algunos materiales alimentarios, las enzimas deben ser inactivadas o reducir su actividad. De hecho, la proteólisis causada por algunas enzimas como proteasas puede inducir algunos defectos de sabor y pigmentos marrones. La inactivación de la enzima se puede lograr fácilmente por tratamiento térmico. Sin embargo, en algunos casos, la alta resistencia de las enzimas al calor puede ser un problema, ya que las altas temperaturas modifican negativamente propiedades importantes de los alimentos, como el sabor, el color o el valor nutricional.

Kutruf en 2012 dice que los efectos de las ondas ultrasónicas sobre las proteínas son muy complejas. Proteínas globulares poliméricos se descomponen en subunidades y si el oxígeno está presente, la estructura cuaternaria no es recuperable. La deslipidación parcial de lipoproteínas se puede conseguir con irradiación ultrasónica en un tiempo determinado y suficiente, las proteínas pueden ser hidrolizadas y las cadenas de polipéptidos se pueden romper.

La influencia del gas en la intensidad de la inactivación de la enzima se ha relacionado con la formación de los radicales libres por cavitación. La sensibilidad a los ultrasonidos depende de las condiciones del tratamiento (McClements, 1995), así como sobre la naturaleza de la enzima. Generalmente, la ultrasonificación en combinación con otros tratamientos es más eficaz en la inactivación de la enzima dentro del alimento. De hecho, tratamiento MTS tiene una mayor eficacia en comparación con ecografía sola (Earnshaw, 1998). Tratamientos MTS inactivan varias enzimas a temperaturas más bajas y / o en un tiempo más corto que tratamientos térmicos en las mismas temperaturas

El jugo de naranja se calienta generalmente para ayudar a la conservación pero varias de las enzimas termorresistentes llegan a ser difícil de desnaturalizar por tratamiento térmico únicamente. La pectinmetilesterasa (PME) de las naranjas es fuertemente protegida por su pectina contra el termo-inactivación. Sin embargo, el tratamiento MTS no se ve afectada por la presencia de esa molécula y la inactivación de la enzima es eficaz (Vercet, 1999). PME presente en naranjas fue tratado por manotermosonicación a presiones de 200 kPa en tampón citrato y también en el jugo de naranja. En 35,5 °C la inactivación de la enzima usando MTS se estimó en aproximadamente siete veces mayor que con el tratamiento térmico por sí solo.

La viscosidad de los tomates transformados es uno de los más importantes parámetros relativos a la calidad y depende del grado de polimerización de sustancias pécticas (Vercet, 2001). Durante la transformación de tomates, la viscosidad disminuye debido a la actividad sinérgica de endopoligalacturonasas (PGs) y pectinmetilesterasa (PME). Estas enzimas despolimerizan cadenas de pectina en la pulpa o suero y causar la disminución de la viscosidad del producto. Esas enzimas se liberan durante el procesamiento y deben ser inactivadas lo más rápido posible. Generalmente para inactivar enzimas pécticas, los tomates se calientan rápidamente a temperaturas entre 82 °C y 104 °C. Este paso es seguido inmediatamente por cortar o aplastar (Thakur, 1996). La inactivación de PGs y PME era más eficiente en la aplicación de MTS que por simple calentamiento. En 37 °C la combinación de ultrasonido y el aumento de presión producida los niveles más altos de la inactivación en comparación con los alcanzados al 62,5 °C (López, 2009).

El sistema de la enzima peroxidasa presente en el berro (*Nasturtium officinale*), se compone de una fracción lábil al calor y resistente al calor una fracción. Se estudió la aplicación de termosonicación para permitir tratamientos térmicos menos graves obtenidos a partir convencional escaldado y, por lo tanto, producir un nuevo y saludable congelado producto, berros (*N. officinale*), con color o sabor minimizada cambios a lo largo de su vida útil (Cruz, 2008). La peroxidasa y polifenol oxidasa son las principales enzimas implicadas en el pardeamiento proceso de frutas y verduras recién cortadas. Browning es importante factor limitante en la aceptación de los consumidores. El estudio reveló que el tratamiento combinado de ácido ascórbico y ultrasonido tenía efectos sinérgicos inhibitorios sobre varias enzimas relacionadas con el pardeamiento enzimático (Jang, 2011).

Tabla 1. Relación de diferentes experiencias del uso del ultrasonido en la conservación de alimentos.

Objeto de estudio	Medio de suspensión	Tratamiento	Frecuencia (Hz)	Potencia (W)	Temperatura (C)	Tiempo (Min)	Año Referencia
Aerobios mesófilos y hongos (hongos y levaduras)	Jugo de naranja	Sonicación	500	240	-	15	2007
<i>Listeria innocua</i>	leche	Termosonicación y pulsos eléctricos	24	400	55	2.5	2009
<i>Escherichia coli</i>	Búfer fosfato	Sonicación, manosonicación, termosonicación	20	100	40-61/100-500 kPa	0.25-4	2009
<i>Pichia fermentans</i>	Jugo de tomate	Sonicación	20	0.33-0.81 W/ml		2-10	2010
<i>Salmonella enterica</i> , variedad Enteritidis	agua	termosonicación	24	400	52-58	2-10	2010
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i> y <i>A. acidoterrestris</i>	Jugo de manzana	Sonicación	25	200-600		1-30	2010
Peroxidasa	berro	termosonicación	20	125	40-92.5	0-2	2006
Lisozima	Búfer fosfato	Manotermosonicación	20		60-80 /200kPa	3.5	2006
Pectinesterasas	limón	termosonicación	20		40-90	63	2007
Pectinmetilerasa y polgalacturonasa	Jugo de tomate	termosonicación	20	40	50-75	0-40	2009
Polifenoloxidasas y peroxidasa	Manzana fresca	Sonicación y ácido ascórbico	40				2011

Fuente: F. Chemat *et al.*, / Ultrasonics Sonochemistry 18 (2011) 813–835.

b. Limpieza y desinfección

Posiblemente una de las aplicaciones más antiguas y extendidas de los ultrasonidos de potencia ha sido su utilización en procesos de limpieza (Quarty- Watson, 1998). Los baños de ultrasonidos se encuentran en todos los laboratorios y se pueden encontrar equipos comerciales para la eliminación de la placa bacteriana de los dientes. Los ultrasonidos son particularmente útiles en la limpieza de superficies (Mason, 1996). La cavitación asimétrica que se produce en la superficie de los materiales por la aplicación de los ultrasonidos, genera unas ráfagas de líquido a alta presión contra las superficies sólidas. El efecto es similar al que produciría un chorro de agua a elevada presión (Cárcel, 2003). Se han utilizado para la limpieza de la piel en canales de aves (Lillard, 1994), frutas (Seymour, 2002) y vegetales (Ajouluni, 2006). La aplicación se puede realizar en combinación con tratamientos térmicos termoultrasonificación (Wrigley y Llorca, 1992); (Raviyan, 2005); (Ugarte-Romero, 2006), presiones moderadas (manosonicación); (Burgos, 1994);

(Álvarez, 2006) y tratamientos térmicos más presión (manotermosonicación) (Vercet, 2002). Sin embargo, y a pesar de utilizarse como técnicas de inactivación de microorganismos, los ultrasonidos aplicados a potencias moderadas pueden utilizarse para la estimulación de células vivas (Mason, 1996). Un importante factor que causa dificultades en esta tecnología es la adaptación de ultrasonido a las líneas de producción de alimentos existentes (Knorr, 2011), pues los industriales se aferran a los métodos tradicionales; además se ha estudiado para mejorar características sensoriales en carnes, (Lull, 2000). Desde el punto de vista de la enorme tendencia para el uso de las nuevas tecnologías, se puede decir que el ultrasonido es uno de los más importantes tecnologías verdes utilizados en el procesamiento y preservación (Chemat, 2011). Todavía se necesitan más esfuerzos de investigación desarrollar sistemas eficientes para diversos problemas relacionados con la específica alimentos y líneas de producción (Awad, 2012). Procesamiento de ultrasonidos de alta potencia en la industria de frutas y hortalizas se convierten microbiológicamente seguras para los procesos de eliminación en cargas bacterianas. Actualmente, para disminuir la carga microbiana de frutas frescas y verduras utilizan una técnica de descontaminación o una combinación de métodos antimicrobianos que tienen lugar debido al lavado de los productos con cloro, dióxido de cloro, cloruro de sodio acidificada, ácido orgánico formulaciones, los desinfectantes basados en alcalinos, peróxido de hidrógeno, agua ozonizada, agua electrolizada, ácido peroxiacético; Según el tipo y la concentración de agentes desinfectantes, el recuento total de poblaciones en diferentes tipos de frutas y verduras después del lavado generalmente varía entre 1,0 y 3,0 log / g (Sapers, 2001); y tratamientos térmicos suaves, como también otros métodos físicos, incluyendo ultrasonido, radiación ultravioleta, campo pulsado eléctrica, los campos magnéticos oscilantes, y alta presión (Gil, 2011). Se necesitan nuevos métodos de descontaminación para identificar y eliminar microorganismos, sin efectos negativos. La aplicación de ultrasonido en lavado de frutas y verduras es una de las alternativas métodos y se recomienda para la industria alimentaria (Gil, 2009); (Sapers, 2001), (Elizaquivel, 2012); (Rivera, 2011); (São José y Vanetti, 2012); (Alexandre, 2012). A pesar de que no hay conocimiento de la aplicación comercial de ultrasonido en los procesos de descontaminación del agua de lavado (Huang, 2006) hoy en día mayoría de los estudios se concentran en el estudio de la limpieza física y efecto de descontaminación de los ultrasonidos sobre la corteza de alimentos o sobre superficies de equipos de procesamiento (Alegria, 2009). Por otra parte, los investigadores estaban tratando de evaluar la eficacia de ultrasonido en procedimientos de lavado (Knorr, 2004).

El ultrasonido fue adoptado por la industria electrónica para descontaminar superficies y su uso ha sido recientemente recomendado como una paso desinfección alternativa en la industria

alimentaria (O'Donnell, 2010), (Cao, 2010), (Knorr, 2004) (Lee, 2003), (Nascimento, 2008), (Sagong, 2011).

c. Ultrasonido en lácteos

Coupland en 2004, estudio como el ultrasonido se ha utilizado con éxito para la inactivación microbiana en muestras de alimentos ricos en grasa, como una tecnología de sustitución para los métodos convencionales, además de que presenta ventajas utilizando temperaturas más suaves que eviten la degradación de compuestos termo sensibles en un tiempo de tratamiento reducido (Chemat, 2011). Dado que el ultrasonido logra la homogenización, la reducción de tamaño de los glóbulos de grasa y la inactivación microbiana, al mismo tiempo, se ha informado que el tratamiento ultrasónico podría ser una técnica prometedora para el procesamiento de la leche (Villamiel, 2000).

El tratamiento con ultrasonido de muestras de leche (24 kHz, 400 W, 30 min) parece aumentar ligeramente el contenido de grasa (de 4,04 % a 4,25 %) en comparación con la pasteurización, que se puede atribuir a la rotura de los glóbulos de grasa y la liberación de triglicéridos en el medio por cavitación implosión burbujas (Bermúdez-Aguirre, 2008). Sin embargo, otros estudios sugieren que además de la homogeneización de los glóbulos de grasa, los compuestos volátiles se generaron en muestras de leche sometidos a ultrasonidos como una indicación de la degradación de las grasas presentes en la muestra (Chouliara, 2008). El uso de una sonda de ultrasonidos (24 kHz, 400 W) era responsable de la aparición de compuestos de degradación, a saber, 1-hexeno, 1-octeno, 1-noneno, 5-metil-1,3-cyclohexadieno, benceno, tolueno, p-xileno, n-hexanal, n-heptanal, 1,3 butadieno y 1-buten-3-ino, de la que los dos últimos son conocidos por ser productos secundarios de degradación de oxidación libre de lípidos inducida por radicales (Riener, 2009). Algunos de estos compuestos de oxidación y también octanal, 2-butanol y 2, 2,4 trimetil pentano se observaron después de tratamiento con ultrasonidos (24 kHz, 200 W) de la leche, aunque una relación pobre se encontró entre la oxidación de los lípidos y la inactivación microbiológica y sensorial también evaluación no pudo identificar a los compuestos volátiles (Chouliara, 2008). De manera similar, se ha informado de que la aplicación de ultrasonido de alta intensidad en la extracción de una variedad de compuestos biológicamente activos redujo la actividad antimicrobiana y degradado unos compuestos incoloros en un tiempo y potencia de forma dependiente (Soria y Villamiel, 2010). Actualmente, para procesar y conservar alimentos que cumplan con éstas demandas, deben efectuarse modificaciones en los procesos de conservación tradicionales adoptando nuevas tecnologías.

El uso de la ecografía en la pasteurización sigue siendo de gran interés para la industria láctea. Ha demostrado ser eficaz para la destrucción de *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens* y *Listeria monocytogenes* sin ningún efecto perjudicial sobre la proteína total o caseína contenido de la leche pasteurizada (Cameron, 2009). Las investigaciones ultrasónicas también han demostrado la inactivación de las enzimas tales como pectinmetilesterasa, polifenoloxidasas y peroxidasas responsable de deterioro de frutas y jugo de verduras y diversas enzimas pertinentes a la calidad de la leche (O'Donnell, 2010); (Terefe, 2009). En combinación con el calor, ultrasonido puede acelerar la velocidad de esterilización de alimentos, disminuyendo así tanto la duración y la intensidad de térmica tratamiento y el daño resultante. Las ventajas de ultrasonido sobre la pasteurización por calor incluyen la minimización de la pérdida de sabor, mayor homogeneidad del tratamiento y un importante ahorro energético. (Vercet, 2001).

d. Inactivación microbiana

Los efectos físicos y químicos del ultrasonido en la inactivación microbiana y la fuerza motriz del procesamiento de ultrasonidos se atribuyen a acústica intracelular, la cavitación causa un aumento en la permeabilidad de las membranas y la pérdida de selectividad, el adelgazamiento de las membranas celulares (Sams y Feria, 1991), el calentamiento localizado, y la producción de radicales libres (Fellows, 2000); (Butz y Tauscher, 2002). Las burbujas de cavitación son generadas por las ondas de ultrasonido. Estas burbujas pasan a través de la solución y crean una serie de compresión / rarefacción (expansión / colapso) ciclos de la creación de una presión negativa que afecta a las moléculas del líquido. Cuando la distancia entre las moléculas supera el mínimo distancia molecular se rompe el líquido hacia abajo y el vacío se forma en ciclos sucesivos, huecos o cavidades crecen continuamente con una pequeña cantidad de vapor del líquido (Suslick, 1998). Durante las aplicaciones de ultrasonido, miles de burbujas, que se clasifican en dos diferentes estructuras, se forman; los primeros grupos de burbujas, definidos como estables burbujas de cavitación no son lineales, tienen un cierto tamaño de equilibrio durante ciclos de presión, y forman grandes nubes de burbujas. El segundo, interna (Transitorios) burbujas de cavitación son no estables y colapsan rápidamente en un muy corto período de tiempo y luego se desintegran en burbujas más pequeñas. Estas burbujas son a menudo pequeñas y también colapsan rápidamente. Pequeñas burbujas simplemente se disuelven; Sin embargo, el límite de transferencia de masa donde la capa es más delgada, y la zona interfacial es mayor durante la expansión de la burbuja que durante colapso de la burbuja. Esto significa que más traslados aéreos en la burbuja durante la fase de expansión que se escapa durante el colapso (Lauterborn y Ohl, 1997); (Lee, 2005); (Kentish y Ashokkumar, 2011); (Tiwari, 2012). Cavitaciones internas inestables se

observan generalmente en bajas frecuencias (20-100 kHz) y deben someterse a un colapso de generar temperatura y presiones en el medio. El gas y el vapor dentro de la burbuja puede ser calentado a una alta temperatura y los puntos calientes de alta temperatura (Hasta 5500 °C) y presión (de hasta 50.000 kPa) se producen en cortos períodos de tiempo (del orden de microsegundos). Las ondas de choque radiado por colapso de burbujas podría ser lo suficientemente fuerte como para esquilar y romper la célula de pared y de membrana estructuras. Finalmente, se puede decir que los componentes de las células microbianas interrumpen por medio de micro choques mecánicos de la tecnología de ultrasonido (Fellows, 2000); (Butz y Tauscher, 2002). El segundo efecto antimicrobiano proviene del efecto químico de ultrasonidos. De hecho, la literatura menciona que utilizando una Unidad ultrasónica 20 kHz se encontró para mejorar la inactivación de microorganismos debido a los mecanismos antimicrobianos de radicales hidroxilos (Suslick, 1998); (Phull y Mason, 1999); (Kadkhodae y Povey, 2008). Estudios anteriores han demostrado que el ultrasonido genera un aumento de la temperatura en un nivel localizado dentro de una burbuja colapsada que genera radicales hidroxilo primarios (Makino, 1983); (Suslick, 1989); (Ashokkumar y Mason, 2007); (Kentish y Ashokkumar, 2011). Además, se informó de que reacciones que implican transferencia de un solo electrón se aceleran en aplicaciones ultrasónicas (Weiss, 2011). Todos los efectos químicos de cavitación incluyen la generación de radicales libres e involucran transferencia de un solo electrón durante la fase de enfriamiento de átomos de hidrógeno y radicales hidroxilo que se recombinan para formar peróxido de hidrógeno (H₂O₂), formando importantes propiedades bactericidas (Lee y Feng, 2011). Si otros compuestos se añade a la solución irradiada con ultrasonido, se podrían formar una amplia gama de reacciones secundarias y compuestos orgánicos que pueden ser oxidados y reducidos (Suslick, 1989). Al final de estas reacciones sucesivas, normalmente la cantidad de radicales libres aumenta. Por otra parte, el radical hidroxilo (OH⁻) es capaz de reaccionar con el esqueleto de azúcar-fosfato de la cadena DNA y hace que la sucesión de los enlaces fosfato-éster de la hebra doble del ADN microbiano se vea interrumpido. (Manas y Pagan, 2005).

Las aplicaciones comerciales en la ciencia y tecnología de alimentos se han basado principalmente en ultrasonido de alta potencia (Awad, 2012). Los investigadores, en las últimas décadas, fueron capaces de optimizar muchas aplicaciones de ultrasonido ya sea para la prueba o el procesamiento de productos alimenticios (Carcel, 2012). Adicionalmente, existían las aplicaciones ultrasónicas comerciales para el desespumado, emulsificación, extracción y descontaminación, extrusión, tratamiento de aguas residuales, y enternecimiento de la carne (Patist y Bates, 2008); (Quan, 2011); (Anon, 2012). Para los fines antimicrobianos, el ultrasonido era en su mayoría utilizado

para la limpieza y desinfección de las superficies de fábrica industriales de alimentos (Chandrapala, 2012).

e. Tratamiento de agua

En un sistema de agua industrial, el tratamiento de ultrasonido de alta frecuencia, patentado como Sonoxide, ha demostrado excelentes resultados en el control de bacterias y algas y tiene más de 600 alrededor del mundo (Broekman, 2010). Recientemente, se ha observado que la investigación intensiva del sensor de ultrasonido apropiado o equipo de evaluación en términos de diseño de la sonda, la geometría, y las características (por ejemplo, la frecuencia), así como las condiciones de operación, que cumplan con las demandas de las aplicaciones específicas en diferentes materiales alimenticios o proporcionar resultados óptimos para cada aplicación individual, se están llevando a cabo (Patist y Bates, 2010). Como resultado, puede que la eficacia de la tecnología de ultrasonido llegue a ser una importante alternativa asegurando la solidez en diferentes campos de aplicaciones industriales (Soria y Villamiel, 2010); (Awad, 2012).

En los estudios que utilizaron la ecografía para fines de descontaminación, se basaron principalmente en lechuga, espinaca, zanahoria rallada, trufas, cereza, tomates y fresas, estas fueron utilizadas como materiales alimenticios en los temas de investigación (Sagong, 2011). Los ultrasonidos de alta potencia con bajas frecuencias y tiempos de tratamiento entre 20-45 kHz y 1-10 min se utilizan generalmente en estas aplicaciones. En diferentes tratamientos en combinación con los parámetros tales como potencia, frecuencia, temperatura, y tiempo, la reducción microbiana con ecografía varía entre 0,5 y 1,98 log UFC / g (Zhou, 2009), (Chen y Zhu, 2011); (Elizaquivel, 2012).

El estudio del efecto en agua del grifo con agua clorada (25 ppm de cloro libre), el ultrasonido en agua (10 W / L, 32-40 kHz, 10 min) (Seymour, 2002), y el ultrasonido en agua clorada en cuatro tratamientos diferentes, trató de determinar la eficiencia de descontaminación de estos tratamientos en cepas resistentes a la ampicilina de *Salmonella typhimurium*, *E. coli* y *Listeria monocytogenes* en lechuga iceberg, pepino, zanahoria, pimiento, repollo blanco, cebolla, perejil, fresa, menta, y otra hierbas. Para el efecto de la frecuencia entre el rango dado por ultrasonidos de alta potencia, se sugirió que las diferentes frecuencias de tratamiento de ultrasonido no tenían efecto significativo sobre la eficiencia de descontaminación de *S. typhimurium* (PN 0,05) en el lavado de la lechuga iceberg, las reducciones medias de 25, 32-40, y 62 - 70 kHz tratamientos fueron 1.4, 1.3, y 1.3 log₁₀ UFC / g respectivamente. La aplicación de ultrasonido en agua reduce significativamente el número de *S. typhimurium* (aprox. / G reducción de 1,5 log₁₀ CFU, la

reducción de 97,9%). Estas reducciones fueron significativamente diferentes ($P < 0,05$) a partir del *S. typhimurium* de agua en la descontaminación de productos frescos lavados con agua simple permiten reducciones log microbianas de $1,43 \pm 0,04$ UFC / g en pimiento rojo. Entre las tecnologías aplicadas está el ozono en solución acuosa, los ultrasonidos y la radiación ultravioleta; en la ecografía se encontró uno de los procesos más eficaces para las reducciones microbianas. Reducciones de $1,98 \pm 0,21$ log UFC / g ocurrieron sobre *Listeria innocua* cuando muestras de pimiento rojo se habían lavado con ultrasonidos (Alexandre, 2013).

Hasta hoy, los resultados obtenidos de diferentes estudios llevados a cabo con el uso de tratamientos de descontaminación de aguas de lavado combinadas con aplicaciones ultrasónicas son variables. Los resultados de diferentes estudios también son difíciles de comparar porque utilizan diferentes parámetros como la frecuencia, la eficiencia, la densidad de energía acústica, el tiempo de tratamiento, la temperatura, relaciones agua / muestra, protocolo de lavado de agitación, especies y las cepas de organismos de prueba tales como *E. coli* O157: H7, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, y el tipo de alimentos y su superficie. Hay una gran cantidad de parámetros y factores que no se interpretan de la misma forma en condiciones experimentales. Debido a estas diferencias, la armonización de los resultados de las aplicaciones de ultrasonido puede ser muy difícil. Como resultado de ello, la búsqueda de las mejores condiciones, dosis y combinación de tratamientos para las diferentes tecnologías de descontaminación es un obstáculo más que desafía la adaptación comercial de los equipos de ultrasonido. En un futuro se necesitan estudios usando la tecnología de ultrasonido para propósito de descontaminación dentro de la industria alimentaria comercial, con el fin de ampliar y optimizar los procesos (Chen, 2007).

f. Tratamiento de ultrasonido en frutas y verduras

Tratamiento combinado de ultrasonidos durante 10 min y ácido peracético resultó en una mayor eliminación de microorganismos de la superficie de los tomates. (Huang, 2006) los ultrasonidos de 170 kHz eliminan en un buen porcentaje la eficiencia de *Salmonella spp*, *E. coli* O157: H7 a partir de la corteza de algunos alimentos. Estos autores también observaron que la combinación de tratamientos químicos y ultrasonidos dio lugar a una mayor reducción de la población de contaminantes en las frutas y verduras. (Gogate y Kabadi, 2009) también llegaron a la conclusión de que cuando Las ecografías se utilizan en combinación con los productos químicos, que pudieron aumentar la eficacia de los agentes desinfectantes. (Sagong, 2011) encontrado un efecto sinérgico en el uso de ácidos orgánicos combinados con ultrasonido (40 kHz) en la inactivación de *E. coli*

O157: H7, *Salmonella Typhimurium* y *Listeria monocytogenes* inocularon en lechuga orgánica, sin afectar significativamente el color y textura.

La influencia de la aplicación de ultrasonidos de potencia en el transporte de masa y microestructura de la cáscara de naranja durante el secado con aire caliente se observó en el albedo. El albedo se caracteriza en muestras frescas por mucho tiempo las células tubulares y grandes espacios intercelulares. En el caso de las muestras se secaron al aire, tejido celular de albedo es perturbado y desaparece en la forma tubular debido a la eliminación de agua. Aunque, un efecto más intenso en la estructura se observó en las muestras de los Estados Unidos. La estructura celular parecía ser más comprimido, casi destruidos, y se encontraron grandes espacios intercelulares aire creando un material poroso que facilita el movimiento del agua dentro de ella. Las expansiones y compresiones alternativas producidas por las ondas de ultrasonido en el material son la responsable de la degradación del tejido celular. Este efecto se denomina "efecto esponja", ya que tiene un parecido cuando una esponja se comprime y se libera. La onda acústica actúa repetidamente sobre el agua facilitando la remoción celular y afecta la estructura celular (Ortuño, 2009).

La combinación de ultrasonido con algunos métodos, constituye un enfoque atractivo para mejorar la inactivación microbiana como trabajos previos han demostrado el efecto obstáculo en diferente frutas y verduras como la ciruela (Chen y Zhu, 2011), las fresas (Cao, 2010); (Alexandre, 2012), semillas de alfalfa (Scouten y Beuchat, 2002), frutas y jugos vegetales (Kuldiloke, 2002), manzanas y lechuga (Huang, 2006) y el pimiento rojo (Alexandre, 2013).

Cuando se aplica a líquidos, las ondas ultrasónicas promueven la aparición del fenómeno de cavitación, que consiste en la formación, el crecimiento y colapso de burbujas de aire. Estas burbujas generan energías mecánicas y químicas localizadas que son capaces de inactivar microorganismos (Adekunte, 2010), (Gogate y Kabadi, 2009), (Piyasena, 2003), (Valero, 2007). Cuando un colapso de la burbuja ocurre, los cambios de presión que se considera causa principal de disrupción de células microbianas (Patil, 2009). El ultrasonido se ha usado para interrumpir la creación de biofilm o incluso inactivar microorganismos. Esta estrategia puede contribuir a la transformación de muchos productos, incluyendo frutas y verduras mínimamente procesadas, y así ayudar en la adaptación a las nuevas tendencias del mercado. Por lo tanto, teniendo en cuenta la importancia de evaluar la eficiencia de los ultrasonidos ondas aislados y en combinación con desinfectantes en la reducción contaminación en los alimentos mínimamente procesados. El tratamiento con ultrasonido elimina un promedio de 0,83 log₁₀ ufc / g de la población de

Salmonella spp y el aumento en el tiempo de contacto de 10 a 30 min de la contaminación, este tratamiento redujo aún más. La eficacia de un ultrasonido 40 kHz aplicada para 10 min se manifestaron en las fresas, donde los tratamientos condujeron a una gran reducción de la contaminación microbiana mientras se mantiene los índices de calidad durante el almacenamiento de los frutos (Cao, 2010).

La intensa presión generada durante el uso del ultrasonido puede contribuir a la penetración de los oxidantes químicos. Las fotomicrografías de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 células adheridas a través de la membrana celular y el proceso de cavitación puede ayudar en la desagregación de los microorganismos, que culmina en un aumento de la eficiencia del tratamiento de desinfección (Gogate y Kabadi, 2009). Imágenes obtenidas por SEM indicaron la adherencia y biofilm formación por *Salmonella spp* en secciones de la superficie del tomate cereza después de 48 h de incubación. Tratamientos de desinfección con 40 mg / L de ácido peracético y un ultrasonido de 45 kHz redujo esta contaminación. La incapacidad de los tratamientos de desinfección para eliminar y / o inactivar por completo los microorganismos de la superficie de frutas y verduras indica la posibilidad del crecimiento microbiano durante el almacenamiento. Esto también sugiere que los patógenos pueden persistir en sitios protegidos en la superficie o dentro de la biopelícula preexistente en las frutas y verduras. A pesar de esta descontaminación, las evaluaciones deben llevarse a cabo con el fin de verificar si el aumento del tiempo de la sonicación dañaría la calidad del producto desinfectado durante el período de almacenamiento. La población de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 adherido a la superficie de tomates cherry después de 96 h incubados, reduciendo en casi 4 log₁₀ ufc / g cuando se utilizó la combinación de 40 kHz ultrasonido y ácido peracético. Observaciones microscópicas de secciones tomate cherry incubadas con cepas de *Salmonella typhimurium* durante 96 horas se observó una gran población de células adherentes en ciertos puntos sobre la superficie del producto, además de grupos compactos de células, lo que indica la presencia de biofilm. Incluso con la gran población de células adherentes y la formación de biopelículas, el tratamiento de ultrasonidos 30 min fue capaz de eliminar de forma significativa las células de la superficie de los tomates cherry.

Este resultado confirma que el ultrasonido, una tecnología emergente para aplicaciones de procesamiento de alimentos, podría mejorar la seguridad microbiana de los productos frescos (Brilhante, 2011) (Pagán, 2000). El desarrollo de las nuevas tecnologías emergentes en diferentes campos es en la actualidad uno de los principales retos para el mejora de la calidad de vida en el mundo. Obviamente, tienen que ser medio ambiente y ahorro de energía tecnologías para asegurar la sostenibilidad. El ultrasonido de alta potencia puede ser considerada como una de estas

tecnologías. De hecho, su uso con fines terapéuticos médicos es un área en desarrollo tan rápidamente que es considerado como un "boom". La aplicación de energía ultrasónica para producir o para mejorar los procesos industriales es también un área emergente que debe ser incluido dentro del "boom ultrasonidos".

g. Tratamientos combinados

(D'Amico, 2006) hay algunos estudios diseñados para investigar los efectos del ultrasonido en forma simple y combinada con algunos productos químicos tales como ácidos orgánicos, cloruro de sodio acidificado, etanol, dióxido de cloro, y ácido peracético en la inactivación microbiana de algunas frutas y verduras (Huang, 2006, Zhou, 2009, Sagong, 2011, Rivera, 2011, São José y Vanetti, 2012). Se comparó la eficacia de la combinación de tratamientos de ultrasonido (30 W / L, 40 kHz, 5-10 min) con diferentes ácidos orgánicos (málico, cítrico y láctico) concentraciones (0, 0,3, 0,5, 0,7, 1 y 2), y los tiempos de tratamiento (5, 10, 20, 30, y 60 min) con agitación suave a 20 ° C frente a *E. coli* O157: H7, *S. typhimurium* y *L. monocytogenes*. Se determinaron las reducciones máximas de *E. coli* O157: H7, *S. typhimurium* y *L. monocytogenes* con 2,7 (ácido láctico), 3,2 (ácido cítrico), y 2,9 (ácido málico) log₁₀ UFC / g después de un tratamiento combinado con ácido orgánico al 2 % y ultrasonido para 5 min., Respectivamente (P 0,05 b). El efecto de reducción de los ultrasonidos sobre *S. typhimurium*, *E. coli* O157: H7 y *L. monocytogenes* y los recuentos entre los tratamientos 5 y 10 min no fueron significativos (PN 0,05) en lechuga fresca en un tratamiento con ultrasonidos con aplicaciones de ácidos orgánicos. Los datos similares obtenidos de diferentes estudios sugieren que el efecto de reducción se produjo principalmente durante los primeros 5 min y no aumentó significativamente, incluso después de un tratamiento de 10 min en diferentes muestras tales como perejil, lechuga, repollo, zanahoria, pepino, fresa, cebolla y el pimiento (Seymour, 2002). Investigadores evaluaron la descontaminación alternativa procesos de zanahoria rallada, (Alegría, 2009) aplican los siguientes procesos: la cloración (50 o 200 ppm de cloro libre / 1 min a 5 °C), ozonización (1 ppm / 5 min, 5 °C), agua caliente (100 °C / 45 s), y ultrasonicación (45 kHz / 1 min) se observó que las reducciones logarítmicas fueron de 1,3 y 0,9 en los tratamientos de ultrasonido.

(Koda, 2009) en algunos estudios los resultados de descontaminación como los de cloro combinado con tratamientos de ultrasonido no superaron la eficacia de la aplicación de solo el ultrasonido, que es un resultado muy importante desde el punto del efecto antimicrobiano del ultrasonido. En ambos tratamientos con y sin cloro el número de microorganismos se redujo en aproximadamente 1 unidad logarítmica en condiciones experimentales en las que se aplicó a

efectos de descontaminación. (Huang, 2006) utilizaron la combinación de dióxido de cloro (0, 5, 10, 20, y 40 ppm) y ultrasonido (170 kHz en 10 min) para inactivar el resistente ácido nalidíxico de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium*, y el resistente ácido nalidíxico-novobiocina de *E. coli* O157: H7 en manzanas y lechuga.

Los resultados demostraron que el dióxido de cloro puede reducir eficazmente los números de organismos de las muestras del ensayo, y la aplicación de ultrasonidos puede promover el efecto antimicrobiano de dióxido de cloro en *Salmonella spp.* Y *E. coli* O157: H7 inoculado a las manzanas y las muestras de lechuga y con un solo tratamiento de ultrasonido causó una reducción de 1.2 a 1.9 log₁₀ UFC / g reducción en las mismas muestras. (São José y Vanetti, 2012).

El efecto de los ultrasonidos (45 kHz, 10 min, 25 °C) en presencia de peróxido de hidrógeno 5% y 40 mg / l de ácido peracético en los tomates cherry fue muy eficiente también. Se estudió la reducción en el recuento total de bacterias viables, y el recuento de hongos y levaduras. En aplicaciones combinadas con peróxido de hidrógeno y ácido peracético con ultrasonido, los valores adicionales de reducción causada por ultrasonido aumentado a 0,5 - 0,8 log₁₀ CFU / g, y 0,2 a 1,1 log₁₀ CFU / g. Del mismo modo, el efecto antimicrobiano de hipoclorito de sodio (500 ppm), peróxido de hidrógeno (500 ppm), y etanol al 70 % combinado con ultrasonidos (35 kHz, 10 min, 4 °C) fueron muy eficientes en muestras de trufa (Rivera, 2011).

Según (Zhou, 2009) aplicaciones de ultrasonido únicamente eliminó 1 log₁₀ UFC / g de flora total bacteriana mesófila, 1,6 log₁₀ CFU / g en *Pseudomonas spp.*, 1,6 log₁₀ CFU / g Recuento de Enterobacterias, 0,9 log₁₀ bacterias g de ácido láctico, 0,9 log₁₀ CFU / g YMC. Cuando la ecografía fue combinada con sodio hipoclorito y peróxido de hidrógeno, un efecto adicional (aprox. Se encontró 1 log₁₀ CFU / g). (Zhou, 2009) han buscado la carga microbiana de hojas de espinaca y se informó de que el cloruro de sodio acidificado redujo la *E. coli* O157: H7 a una población de 2,1 log₁₀ UFC / g sobre la de lavado con agua, mientras que la reducción de otros desinfectantes tales como cloro, ácido peracético, y el agua electrolizada ácida se acerca 1-1,2 log₁₀ CFU / g; Ultrasonidos (21,2 kHz, 200 W / L, 2 min) aumentó significativamente la reducción de la *E. coli* O157: H7 en espinacas para todos los tratamientos por 0,7 a 1.1 log₁₀ UFC / g sobre la de lavados con desinfectantes solos (P b 0.05). Para probar los efectos del ultrasonido en ciruela (Chen, 2007). Recuentos microbiológicos disminuyeron en los tres diferentes tratamientos que se dan a continuación:

- El lavado con agua del grifo estadounidense (Control),

- ClO₂ (40 mg / L) US + en solución ClO₂ (40 kHz, 20 °C, 10 min, 100 W) (Tratamiento I)
- ClO₂ (40 mg / L) US + en agua del grifo (40 kHz, 20 °C, 10 min, 100 W) (Tratamiento II).

Los tratamientos de ultrasonido de dióxido de cloro y reducen significativamente el número de los recuentos totales viables(TVC) y recuentos de mohos y levadura (YMC) en la fruta del ciruelo por 2,3-3,0 y 1,4-2,0 log₁₀ UFC / g, respectivamente, en comparación con el control. Cuando el ultrasonido fue aplicado en agua, dio una mayor reducción microbiana (Aprox. 0,7 log UFC / g para TVC y YMC) que la ecografía para el dióxido de cloro. Como resultado de este estudio, las aplicaciones combinadas de productos químicos y ultrasonido en productos crudos se sugieren que ondas ultrasónicas simultáneas y la cavitación sinérgicamente mejoraron los efectos antimicrobianos del tratamiento químico en comparación con el uso secuencial. Los datos en la literatura demostraron que existe un efecto sinérgico aumentado en aproximadamente 0,7 a 1,7 unidad logarítmica en la reducción de TVC, YMC, en *E. coli* O157: H7 y *Salmonella spp*, cuando el ultrasonido se combina con algunos agentes químicos antimicrobianos, dependiendo en las concentraciones utilizadas, las condiciones experimentales de ultrasonido, la cepas de microorganismos, y el tipo de alimento tratado (Patist y Bates, 2008).

Hay investigaciones limitadas que determina totalmente el efecto antimicrobiano de la ecografía únicamente, la aplicación de ultrasonidos a reducir aprox. 0,6 - 1,5 log₁₀ CFU / g ml en condiciones experimentales generalmente. La reducción microbiana por ultrasonidos es muy importante desde el punto de vista de descontaminación verde y el concepto de barrera de inhibición y los métodos de eliminación de las tecnologías de conservación de alimentos. Además, a partir de la literatura existente llegamos a la conclusión que estos resultados podrían ser útiles para la estimación de la descontaminación efecto de los ultrasonidos y la posible utilización de esta tecnología en diferentes procesos en lugar de agentes químicos antimicrobianos (Sagong, 2011).

El efecto letal del ultrasonido se informó a ser muy dependiente tanto del tipo de microorganismo, procesamiento y medio de ultrasonidos. El tratamiento de termosonicación es capaz de aumentar la tasa microbiana de inactivación en el jugo de fruta. El tratamiento con combinación de calor y ultrasonido podría dañar extensamente las células de *E. coli* K12 y romperlas (Lee, 2009). Se necesitan tiempo de tratamiento prolongado y de alta densidad de energía acústica para lograr la disminución de 5-log en el número de células patógenas (Lee, 2009). Hay un límite de temperatura para que la termosonicación esté por encima de la óptima y esta no conducirá a ninguna matanza adicional en comparación con el tratamiento térmico debido a la efecto de amortiguación y la

reducción de la actividad de cavitación a temperaturas elevadas, el incremento de presión de vapor y disminución de la tensión superficial (Ugarte-Romero, 2007).

Anterior autores han observado la reducción del potencial número de patógenos como *Shigella boydii* (Ugarte-Romero, 2007), *Listeria monocytogenes* (Gastélum, 2012), *Staphylococcus aureus* (Walkling-Ribeiro, 2009) y *Escherichia coli* (Lee, 2013). Los detalles de estos microorganismos y su eficiencia de destrucción después del tratamiento de termosonicación. *Shigella boydii* es un gramnegativo, patógeno y puede sobrevivir en el rango de pH de 3.03 a 4.01 (Bagamboula, 2002). *L. monocytogenes* es más resistente al tratamiento con ultrasonidos de *Shigella boydii*. Esto condujo a la aplicación de una temperatura ligeramente mayor de 65 ° C para lograr una reducción de 5-log de *Listeria monocytogenes* con el tiempo de acortar a 2,5 minutos (Ugarte-Romero, 2007). *Staphylococcus aureus* es una bacteria gram-positiva con forma de cocos, que puede sobrevivir en el ambiente de pH de 4 a 10 y causar intoxicación alimentaria estafilocócica (Brennan, 2006); (Rodríguez-Caturla, 2012). Para lograr la reducción de ciclo de 5-log de *Staphylococcus aureus*, la termosonicación se combinó con campos eléctricos pulsantes (Walkling-Ribeiro, 2009). *Escherichia coli* es una bacteria gram-negativa que es sensible al pH y no puede sobrevivir en condiciones extremadamente alcalinas y ácidas (Sharma y Beuchat, 2004), podría ser destruido hasta el ciclo 5-log por tratamiento de termosonicación (Lee, 2003). El efecto letal de termosonicación no es el mismo para todos los microorganismos debido a la eficiencia de inactivación microbiana es también influenciado por sus diferencias morfológicas tales como el tipo, forma o diámetro de los microorganismos. El efecto de los ultrasonidos sobre la estructura y las propiedades emulsionantes de proteína de clara de huevo (EWP) y se observa un aumento de la hidrofobicidad y la estabilidad de la emulsión de la ecografía tratada EWP en comparación con no tratados EWP. Existe una reducción significativa en la primaria en el perfil estructural de la proteína de peso molecular de EWP después de sonicación a 55 kHz durante 12 min (Krise, 2011). (Karki, 2010), (Hu, 2013) observaron cambios significativos en el perfil estructural de la proteína primaria de soja tratada con ultrasonido. (Martínez, 2012) describieron un significativa reducción de tamaño de la proteína agregada de aislado de proteína de soja (SPI).

1.6.4 Importancia de los ultrasonidos en la vida útil de los alimentos

En los últimos años, ha habido una creciente demanda de sustancias antimicrobianas que se usan como desinfectantes seguros para la industria alimentaria (López-Gómez, 2009). Tendencias similares también son válidas para frutas, verduras frescas y alimentos orgánicos. De este modo, la novedad y las tecnologías de conservación de alimentos complementarios continuamente se

están investigando. En la conservación de la tecnología de alimentos alternativa, se ha prestado especial atención a los métodos físicos y biopreservación para extender la vida útil e inhibir microorganismos indeseables, minimizando el impacto en la nutrición y las propiedades organolépticas de los productos alimenticios. Los métodos no convencionales de tratamiento o de saneamiento que se utiliza actualmente en la industria alimentaria han demostrado ser capaces de inactivar microorganismos unidos a los tejidos de frutas o vegetales. El desarrollo de nuevas tecnologías en la Industria Alimentaria con la finalidad de obtener alimentos y productos alimenticios más seguros, que conserven sus características físicas, químicas, nutricionales, sensoriales y microbiológicas está permitiendo extender la vida útil, a la vez satisfacer las necesidades y demandas del consumidor. Los mayores avances en este campo se han desarrollado en sistemas de conservación físicos, los cuales han demostrado ser eficaces en el control del crecimiento microbiológico, principal causa del deterioro de la calidad y vida útil de los alimentos (Guerrero y Alzamora, 2004).

La aplicación simultánea de calor (40 °C) y ultrasonido (20 kHz por 12 segundos) bajo presión moderada (2 kg/cm²) mejoró las propiedades reológicas del yogurt. Las mediciones realizadas en los yogures tratados con ultrasonido mostraron que tenían una estructura más fuerte, sin embargo indican que el efecto de homogenización de los glóbulos de grasa producido por el tratamiento de manotermosonicación aplicado a los yogures no fue la única causa de esta diferencia de textura, sino que se debió probablemente, además, al efecto de desnaturalización de las proteínas de la leche (Villamiel, 2010). A nivel de laboratorio se ha comprobado su efectividad en la reducción microbiana en leche y en la inhibición de la actividad enzimática, (Barbosa , 2008) al evaluar el efecto que tiene el contenido de grasa en la leche de larga duración sobre la bacteria *Listeria innocua* ATCC 51742 sometida a tratamientos de termosonicación (400W, 24kHz, 63 °C x 30 minutos). Se encontró, en primer lugar, una extensión en la vida útil de todas las leches analizadas (libre de grasa, 1 %, 2 % y leche entera), y en segundo lugar que el contenido de grasa en la leche es un obstáculo que disminuye el efecto de la termosonicación, por lo cual, en las leches con bajo contenido de grasa (libre de grasa y 1 % de grasa) la vida útil bajo condiciones de refrigeración fue aún más larga. se encontró que, en la leche entera el tiempo de aplicación de ultrasonido necesario para lograr la inactivación de la bacteria *Listeria innocua* ATCC 51742 fue de 30 minutos, más tiempo del necesario para conseguir el mismo efecto en las leches descremadas. Sin embargo, es muy poca la información que se encuentra sobre investigaciones específicas en la aplicación de ultrasonido como método de conservación en productos lácteos como el queso,

existiendo sólo antecedentes relacionados a su uso como técnicas de análisis no destructivas en el seguimiento o monitoreo del proceso de maduración de quesos (García-Pérez, 2007).

(Leong, 2014) el ultrasonido de alta intensidad tiene un efecto positivo en la calidad final de la leche y otros productos lácteos donde los alcances más importantes incluyen realzar el color, la apariencia, la textura y estabilidad. Técnicamente hablando estos avances son debidos al efecto de homogenización de la leche generados por las ondas ultrasónicas. Desde una perspectiva microestructural ocurren cambios importantes con respecto al tamaño de los glóbulos de grasa, como reflejo en una macro escala, se revela un color más blanco, mejor apariencia y propiedades físicas (Barbosa y Bermúdez, 2008). La termosonicación (combinación de temperatura y calor) provee ciertas características de calidad, produciendo una mayor homogeneidad en la matriz grasa/proteína, mejor estabilidad, color más blanco y mejor textura, producto de una reducción y reagrupamiento de los componentes de la leche e interacción con los demás ingredientes de la emulsión. Efectivamente la termosonicación es una alternativa viable para procesar leche, yogurt y otros productos lácteos, con importante ahorro de costos y tiempo (Barbósa y Bermúdez, 2008).

Generalmente, la cavitación de la sonicación es más eficaz en las bacterias gram-negativas, células redondas esféricas pequeñas, y las bacterias gram-positivas son más resistentes a los ultrasonidos debido a que su pared celular es más gruesa y les da una mejor protección contra los efectos del ultrasonido. Las diferencias en la sensibilidad de las células podrían ser causadas por la capa más fuertemente adherente de peptidoglicanos en las células gram-positivas. Las esporas bacterianas y hongos son más resistentes a la ecografía que las bacterias vegetativas. Las esporas son más difíciles de ser destruidos que las células vegetativas que se encuentran en fase de crecimiento. Los cocos o células en forma esférica son más resistentes a los ultrasonidos que los bacilos de forma de vástago debido a la relación de superficie de la célula y el volumen. Las células con mayor área de superficie son más resistentes a la ecografía que las células pequeñas y redondas. En resumen, la eficacia de la ecografía en el tratamiento de los microorganismos es diferente dependiendo de la especie y sus estructuras de la pared celular (Arzeni, 2012). La tecnología del ultrasonido se combina principalmente con otros agentes desinfectantes, la aplicación de la ecografía es una tecnología no térmica que contribuye al aumento de la seguridad microbiana y prolonga la vida de anaquel, especialmente en la comida sensible nutricionalmente y sensorialmente al calor y las que presentan características funcionales (Alegría, 2009, Cao, 2010, O'Donnell, 2010, Wang, 2011, Bhat, 2011).

2 OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del ultrasonido sobre la carga microbiana e inactivación enzimática en crema de leche cruda como alternativa tecnológica para mejorar su calidad.

2.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Analizar química, microbiológica y enzimáticamente la crema de leche cruda y tratada con ultrasonido.

Evaluar las características sensoriales (color, sabor y olor) de la crema de leche cruda tratada con ultrasonido.

Establecer la influencia del ultrasonido sobre el tiempo de almacenamiento de la crema de leche tratada.

Determinar el efecto del ultrasonido sobre las características químicas, microbiológicas, enzimáticas y sensoriales de la crema de leche tratada.

2.4 PLAN DE TRABAJO

Para dar cumplimiento a los objetivos planteados se estableció en siguiente plan de trabajo.

2.4.1 Elección de las muestras

Para la realización del estudio, las muestras de crema de leche cruda fueron tomadas directamente en la planta de procesamiento de leche cruda en el Centro de Acopio de la Empresa Freskaleche S.A.S. ubicada en Aguachica, Cesar.

El porcentaje de materia grasa de las muestras de crema de leche cruda (300 ± 2 g) fue del 50 %, empacada en bolsas de polietileno, recubiertas con papel aluminio y refrigeradas (4 ± 2 °C).

A las muestras de crema de leche cruda obtenidas, se le realizaron las pruebas químicas (pH y acidez), microbiológicas (aerobios mesófilos, coliformes totales, mohos y levaduras), enzimáticas (fosfatasa y peroxidasa) y organoléptico (color, sabor y olor).

El equipo de ultrasonido usado en el proyecto fue de marca Elmasonic P: 500 W., con una frecuencia de 37 KHz, y tiempos utilizados fueron de 2, 5 y 10 minutos a una temperatura de 30 y $40 \pm 2^\circ\text{C}$. Todas las muestras fueron empacadas en polietileno de baja densidad con vacío al 95 %, en una empacadora marca Henkovac, rotuladas, protegidas de la luz (con papel aluminio) y almacenadas en condiciones de refrigeración ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 0, 3, 5, 7 y 10 días; periodo en el que se evaluaron química, microbiológica, enzimática y sensorialmente.

A continuación se presenta el diseño muestral realizado a las muestras de crema tratadas:

$$N = (1TRUL \times 3TUL \times 2TMP \times 5D) 3R$$

$$N = 90$$

N - Número de muestras empacadas a analizar

TRUL - Número de Tratamientos de ultrasonido

TUL - Tiempo aplicación ultrasonido

TMP - Temperatura de tratamiento

D - Número de días en almacenamiento refrigerado.

R - Número de replicas

Para su ejecución se realizaron las siguientes acciones:

2.4.2 Búsqueda de bibliográfica y análisis de la información.

Se realizó una revisión bibliográfica para determinar los parámetros más importantes en la evaluación del efecto del ultrasonido en la carga microbiológica, características fisicoquímicas, sensoriales de la crema de leche de acuerdo a los objetivos establecidos.

2.4.3 Evaluación de las características químicas (pH y acidez).

La calidad química se determinó a partir de la evaluación de: pH (NTC 399), acidez (NTC 4623) antes de tratamiento y durante un periodo de 10 días en almacenamiento refrigerado a $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.4.4 Evaluación de las características microbiológicas.

El recuento microbiológico de la crema de leche cruda se realizó por metodología de petrifilm de 3M en los siguientes grupos microbianos: de recuento total de microorganismos mesófilos aerobios (AOAC 986.33), coliformes totales (AOAC 991.14), hongos y levaduras (AOAC

997.02), a la crema de leche sin tratamiento, a diferentes temperaturas del tratamiento ultrasónico en 0, 3, 5, 7 y 10 días de almacenamiento en condiciones de refrigeración ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$).

2.4.5 Evaluación de las características sensoriales.

Se determinó antes y al finalizar el almacenamiento en refrigeración por 10 días, y en su orden de percepción, la evaluación de los atributos de color, sabor y olor, valorando su escala de intensidad para crema de leche cruda.

En crema de leche sometida a ultrasonido se evaluó en su orden de percepción: el olor en relación a la intensidad de sensaciones a ácido láctico y rancidez; el sabor, en relación de ácido láctico, rancidez y textura. Finalmente, se valoró la aceptación global a partir de una escala hedónica, con un grupo de panelistas semientrenados, con experiencia en análisis de lácteos de la empresa (10 panelistas).

2.4.6 Análisis enzimático de la crema de leche.

Se analizó la prevalencia e inactivación de las enzimas presentes en la crema de leche cruda antes y después del tratamiento con ultrasonido: fosfatasa alcalina (prueba de Aschaffenburg y Muellen), y peroxidasa (prueba de Storchs).

2.4.7 Determinación experimental del efecto del ultrasonido sobre las características químicas, microbiológicas, enzimáticas, y sensoriales del almacenamiento en la calidad de crema de leche.

A partir de los resultados obtenidos de las diferentes pruebas experimentales, realizadas a la crema de leche se evaluaron mediante un diseño factorial (tiempo y temperatura de exposición a US en 3 y 2 niveles): 2, 5 y 10 min, a 30 y 40 °C respectivamente, durante 10 días de almacenamiento con tres repeticiones para cada tratamiento con US para un total de 90 unidades experimentales. Mediante el análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de significancia de 0,05 se determinó si existen o no diferencias estadísticamente significativas del efecto del ultrasonido sobre las características químicas, microbiológicas, enzimáticas y sensoriales de la crema de leche en el almacenamiento refrigerado ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 0, 3, 5, 7 y 10 días. Por último, para determinar entre que tratamientos fueron encontradas las diferencias estadísticamente significativas se aplicó la prueba de comparación de Tukey mediante el paquete estadístico SPSS v. 19.0.

3. METODOLOGÍA

A continuación se describen los métodos y técnicas a empleados para dar cumplimiento de las actividades de cada uno de los objetivos específicos:

3.1 MATERIA PRIMA

3.1.1 Crema de leche.

La crema de leche obtenida es producto del descremado de leche fresca recepcionada en la planta de Freskaleche S.A.S. ubicada en Aguachica – Cesar.

3.2 METODOS

Las muestras de crema de leche cruda fueron tomadas directamente en la planta de procesamiento de leche cruda en el Centro de Acopio de la Empresa Freskaleche S.A.S. Ubicada en el kilómetro 7 vías a Bucaramanga, en Aguachica, Cesar. Para lo cual se partió del proceso de obtención de crema de leche cruda establecido por la empresa (ver Figura 2)

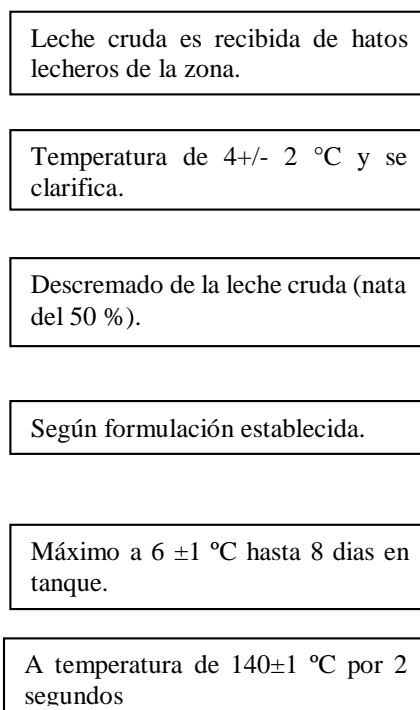


Figura 2. Diagrama del flujo del proceso de obtención de crema de leche cruda. Fuente: Pino. A (2017).

3.2.1. Toma de muestra.

El muestreo de la crema de leche cruda se realizó de forma aleatoria una vez el proceso de descremado se estabilizó dentro del equipo, esto ocurrió a los 30 minutos de iniciada la producción. Las muestras se tomaron en bolsas de polietileno de baja densidad de 9 x 5 cm, con una capacidad de 300 gramos, y se realizó un empacado al vacío (95 %) en un equipo Henkovac (ver foto 1 A y B).



Foto 1. Tomas de muestra de crema de leche cruda. Fuente: Autor

3.2.2. Tratamiento ultrasonido

Las muestras de crema de leche cruda fueron sometidas al tratamiento de ultrasonido con una frecuencia de 37 KHz, con el equipo marca Elmasonic P: 500 W; a 30 y 40 ± 2 °C, en 2, 5 y 10 minutos de exposición, en tiempos de almacenamiento de 0, 3, 5, 7 y 10 días (ver foto 2).



Foto 2. Tratamiento ultrasónico a muestras de crema de leche cruda. Fuente: Autor

Se dejaron testigos o muestras control en los tres ensayos sin aplicación de ultrasonido solo evaluando las características que se presentan con las muestras de crema de leche cruda con los tres intervalos de tiempo.

Las muestras tratadas se llevaron a los laboratorios de fisicoquímica y de microbiología de Freskaleche S.A.S. en la planta de Aguachica - Cesar para realizar las respectivas pruebas y análisis dependiendo de los tiempos de exposición estipulados para cada ensayo.

3.3. ANÁLISIS QUÍMICO DE LA CREMA DE LECHE.

A continuación se describen las pruebas químicas que se realizaron a las muestras de crema de leche cruda y procesada:

- **pH:** según NTC 399, se tomaron muestras de crema de leche cruda y tratada, la medición del pH se realizó con un equipo marca Schoot y un electrodo de vidrio, la crema deberá estar a una temperatura de 20 ± 1 °C, se hicieron 5 lecturas para corroborar el dato esperando que el pH se mantenga por lo menos durante 30 segundos.



Foto 3. Muestras de crema de leche cruda con tratamiento ultrasonido codificadas. Fuente: Autor.

- **Acidez:** se hizo según la NTC 4978 actualización 2001-09-26 por titulación. Reportando los resultados expresados en porcentaje de ácido láctico.

3.4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA CREMA DE LECHE.

El objetivo de determinar la cantidad de bacterias de origen aerobio mesófilo, es el de poder establecer la carga inicial promedio con la que llega la crema de leche cruda y poder evaluar la eficiencia de la aplicación del ultrasonido sobre ella.



Foto 4. Toma de muestra de crema de leche cruda con tratamiento ultrasonido para análisis microbiológico. Fuente: Autor

3.4.1. Determinación de aerobios mesófilos.

Se empleó la técnica de petrifilm método AOAC 986.33, se tomó cada una de las muestras (crema cruda y crema tratada), y se llevaron al laboratorio donde asépticamente se abrieron las bolsas de polietileno y se dispusieron en frascos con solución peptonada 10 gramos en 90 de diluyente. Esta preparación será llevada a 10^{-4} 10^{-5} e inoculadas en los discos petrifilm para aerobios mesófilos. Los discos inoculados se llevaron a la incubadora por 48 horas a 35 ± 2 °C. Colonias rosas se tomaron como positivas (ver foto 5).



Foto 5. Muestreo microbiológico de muestras de crema de leche cruda con tratamiento ultrasonido. Fuente: Autor.

3.4.2. Determinación de coliformes totales.

Se cuantificaron las bacterias de tipo coliforme para medir la calidad higiénica de la crema de leche cruda a trabajar.

Se tomó el diluyente, se llevó a dilución 10^{-2} y 10^{-3} , la presencia de Coliformes totales según AOAC 991.14 se realizó por medio de la técnica de petrifilm. Cuando los discos fueron inoculados se llevaron a la incubadora por 48 horas a 35 ± 2 °C. Colonias rojas con gas se tomaron como positivas.

3.4.3. Determinación de hongos y levaduras.

La determinación de la cantidad de hongos y levaduras presentes en las muestras de crema cruda y procesada nos ayudó a evaluar el deterioro que sufre la crema de leche en almacenamiento antes de su proceso final. Esta se hizo según lo establecido por la AOAC 997.02; las diluciones a trabajar fueron 10^{-2} y 10^{-3} . Una vez se obtuvieron las láminas inoculadas se llevaron a la incubadora a 27 ± 2 °C por 3 días, colonias azul-verdosas se tomaron como positivas.

Todos los petrifilm usados se incubaron en el laboratorio de microbiología de la planta de Freskaleche en Aguachica, en equipos marca Binder.

3.5. ANÁLISIS ENZIMÁTICO DE LA CREMA DE LECHE.

Se determinó la presencia de las enzimas Fosfatasa alcalina y peroxidasa tanto en crema de leche cruda y procesada. A continuación se describen las técnicas empleadas.

3.5.1. Determinación de Fosfatasa alcalina.

- Hervir 5 ml de crema de leche cruda para preparar un control.
- Poner en dos tubos de ensayo P (muestra problema) y C (control) 10 ml de agua destilada y adicionar a cada uno de ellos una tableta de Lactognost I y II. Antes de adicionar las tabletas es conveniente moltarlas en un mortero ya que es difícil disolverlas en el agua. Tras adicionar las tabletas remover con una varilla de vidrio para facilitar la disolución.
- Pipetear 1 ml de leche en cada uno de los tubos según corresponda el tipo de muestra e introducir en el baño o estufa a 37 °C durante 1 hora.
- Posteriormente añadir a cada tubo una cucharadita del reactivo Lactognost III y homogeneizar.

- Leer el color a los 10 minutos. La existencia de color azul indicará presencia de actividad de la fosfatasa alcalina.

3.5.2. Determinación de Peroxidasa.

- Introducir 5 ml de crema de leche en un tubo de ensayo.
- Añadir 5 ml de la solución de 1,4 fenilendiamina.
- Añadir dos gotas de la solución de peróxido de hidrógeno.
- Observar la coloración dentro de los 30 segundos siguientes.

3.6. EVALUACIÓN SENSORIAL DE LA CREMA DE LECHE.

Para la evaluación sensorial de la crema de leche almacenada en refrigeración (4 ± 2 °C) con y sin tratamiento de ultrasonido durante los días 0, 3, 5, 7 y 10 se realizaron las siguientes actividades:

1. Selección de los panelistas: se seleccionó personal que labora en la planta con mínimo un año de experiencia de las áreas de calidad, gestión de calidad y producción. Se les indicó que eran escogidos por su nivel de desempeño dentro de la compañía y que entrarían en un pequeño y rápido entrenamiento para poder llevar a cabo la parte sensorial de este proyecto.

a. Recopilación de datos básicos del panelista: edad, sexo criterios de exclusión e inclusión, hábitos de consumo, conocimiento del producto y evaluación sensorial

b. Entrenamiento de las personas seleccionadas: se realizó una inducción y entrenamiento sobre el tipo de pruebas a aplicar en la propuesta. Se determinó su sensibilidad frente a crema de leche, el cual fue el producto usado en el entrenamiento.



Foto 6. Panelista seleccionados evaluando muestras de crema de leche cruda con tratamiento ultrasonido.
Fuente: Autor.

2. Aplicación del perfil sensorial de la crema de leche.

a. Diseño de los instrumentos a aplicados en las diferentes pruebas sensoriales: discriminativas, preferencias o hedónicas y escala global de aceptación del producto, asignación de códigos a las muestras.

b. Adecuación del sitio y elementos requeridos: (laboratorio, vehículo a emplear, cantidad de muestras, recipientes, escupidero, servilletas, cucharitas, lapiceros, formatos, nevera, estufa y calentador) para la aplicación de la prueba dentro de las instalaciones de la empresa.

c. Realización del perfil sensorial

Crema de leche cruda: En la crema de leche cruda se evaluó en su orden: (1) El grado de percepción, (2) La evaluación de los atributos de sabor, color y olor.

Crema de leche procesada (ultrasonido): En la crema de leche sometida a ultrasonido se evaluó en su orden de percepción, el olor y sabor en relación a la intensidad de sensaciones a ácido láctico y color. Finalmente, se valorará la aceptación global a partir de una escala hedónica.

La valoración estaba en una escala de intensidad para crema de leche, los cuales fueron desde me gusta mucho, con una valorización de 1 hasta me disgusta mucho con una valoración de 5, los panelistas debían escoger cual crema era la de su preferencia donde incluían el color (desde crema claro hasta amarillo), el sabor que tenía que ser suave, y un olor agradable también asociado a una baja acidez.

3. Tabulación y análisis e interpretación de los resultados obtenidos en la evaluación sensorial.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A partir de los resultados obtenidos de las diferentes pruebas experimentales, realizadas a la crema de leche se evaluaron mediante un diseño factorial (tiempo y temperatura de exposición a US en 3 y 2 niveles): 2, 5 y 10 min, a 30 y 40 °C respectivamente, durante 10 días de almacenamiento con tres repeticiones para cada tratamiento con US para un total de 90 unidades experimentales. Mediante el análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de significancia de 0,05 se determinó si existen o no diferencias estadísticamente significativas del efecto del ultrasonido sobre las características químicas, microbiológicas, enzimáticas y sensoriales de la crema de leche en el almacenamiento refrigerado (4 ± 2 °C) durante 0, 3, 5, 7 y 10 días. Por último, para determinar entre que tratamientos fueron encontradas las diferencias estadísticamente significativas se aplicó la prueba de comparación de Tukey mediante el paquete estadístico SPSS v. 19.0.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se muestran los resultados alcanzados en el cumplimiento de los objetivos planteados:

4.4. RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS QUÍMICOS DE LA CREMA DE LECHE TRATADA CON ULTRASONIDO

A continuación se muestran los resultados obtenidos con la aplicación del ultrasonido sobre la crema de leche cruda:

4.4.1. Resultados de pH y acidez de la crema de leche.

En la tabla 2., se presentan los resultados de los análisis químicos obtenidos al aplicar el ultrasonido a temperaturas 30 °C y 40 °C en los diferentes tiempos de exposición y días de almacenamiento.

Tabla 2. Análisis químico de la crema de leche con ultrasonido a dos temperaturas y diferentes tiempos de exposición y almacenamiento. N=3.

ANÁLISIS	TIEMPO EXPOSICIÓN (min)	TRATAMIENTO ULTRASONIDO A 30 ± 1 °C					TRATAMIENTO ULTRASONIDO A 40 ± 1 °C				
		DIA					DIA				
		0	3	5	7	10	0	3	5	7	10
Acidez	2	0,22	0,35	0,38	0,39	0,38	0,24	0,41	0,40	0,39	0,4
	5	0,25	0,36	0,35	0,36	0,35	0,25	0,33	0,40	0,38	0,4
	10	0,23	0,44	0,4	0,39	0,4	0,26	0,35	0,38	0,38	0,38
pH	2	5,81	4,81	4,21	4,21	4,09	5,62	4,62	4,12	4,01	4,01
	5	5,66	5,36	5,01	5,11	5,09	5,7	4,7	4,07	4,01	4,01
	10	5,59	5,09	4,19	4,01	4,01	5,74	4,74	4,17	4,09	4,08

Como se observa en la tabla 2, el pH presento una variación en los tiempos de exposición durante los días de almacenamiento con la aplicación del ultrasonido. Sin embargo, el análisis de ANOVA no mostro diferencias estadísticamente significativas ($p\text{-valor} \geq \alpha$), es decir, $0,481 \geq 0,05$. Lo anterior pudo deberse a que el pH, es un parámetro bioquímico que se ve afectado según los resultados obtenidos por (Majid, 2015) donde el ultrasonido provoca la hidrólisis del agua dentro de las burbujas oscilantes que conducen a la formación de H⁺ y OH⁻ los radicales libres que pueden capturar en algunas reacciones químicas, por ejemplo, los radicales libres pueden ser eliminados por los aminoácidos de las enzimas involucradas en la estabilidad de la estructura, la unión del sustrato o las funciones catalíticas.

En donde mayor caída de pH se presentó fue en el almacenamiento entre el día 3 y el 5 arrojando un valor 0,61 en caída de pH, y donde estuvo más estable fue entre los días 5, 7 y 10 de almacenamiento, manteniendo una constante de reducción de pH entre 0,03 y 0,05 respectivamente.

Madadlou et al. (2009), informaron un aumento en la turbidez y reducción en el diámetro de partícula a cualquier valor de pH dado para la solución de caseína a medida que aumentaba la potencia de ultrasonidos (a una frecuencia de 35 kHz). También observaron una mayor magnitud de reducción en el diámetro de las micelas reensambladas a un pH más alto, lo que sugiere una interacción entre el ultrasonido y el pH.

Mientras que la acidez presenta mínimas variaciones en su comportamiento (ver gráfico 1) dependiendo del tiempo de tratamiento y día de almacenamiento a temperaturas de refrigeración. Estas variaciones se aprecian en el grafico 1, sin embargo, se encontró que el p- valor es mayor al nivel significancia para la acidez ($0,1029 \geq 0,05$) por lo tanto no hay diferencias estadísticamente significativas en la crema tratada a 40 °C, en cambio a 30 °C se observan pequeñas variaciones durante el almacenamiento sobre todo cuando sobrepasa el tercer día a 10 minutos del tratamiento.

Tabla 3. Análisis de varianza (ANOVA) para Acidez por el Tiempo de exposición del ultrasonido

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,0369571	3	0,012319	2,24	0,1029
Intra grupos	0,17026	31	0,00549226		
Total (Corr.)	0,207217	34			

La variación del comportamiento entre la acidez de los tratamientos realizados entre 2 y 5 minutos es muy baja, cuando se somete a 30 °C, en cambio la variación entre estas y el tratamiento realizado con el ultrasonido a 10 minutos es con 30 °C si modifica los resultados. Mientras que el cambio de la acidez en el tratamiento realizado a 40 °C por 2, 5 y 10 minutos en el tiempo 0 no es muy amplia, lo que indica que el tratamiento mantiene los valores de acidez en la crema recién tratada.

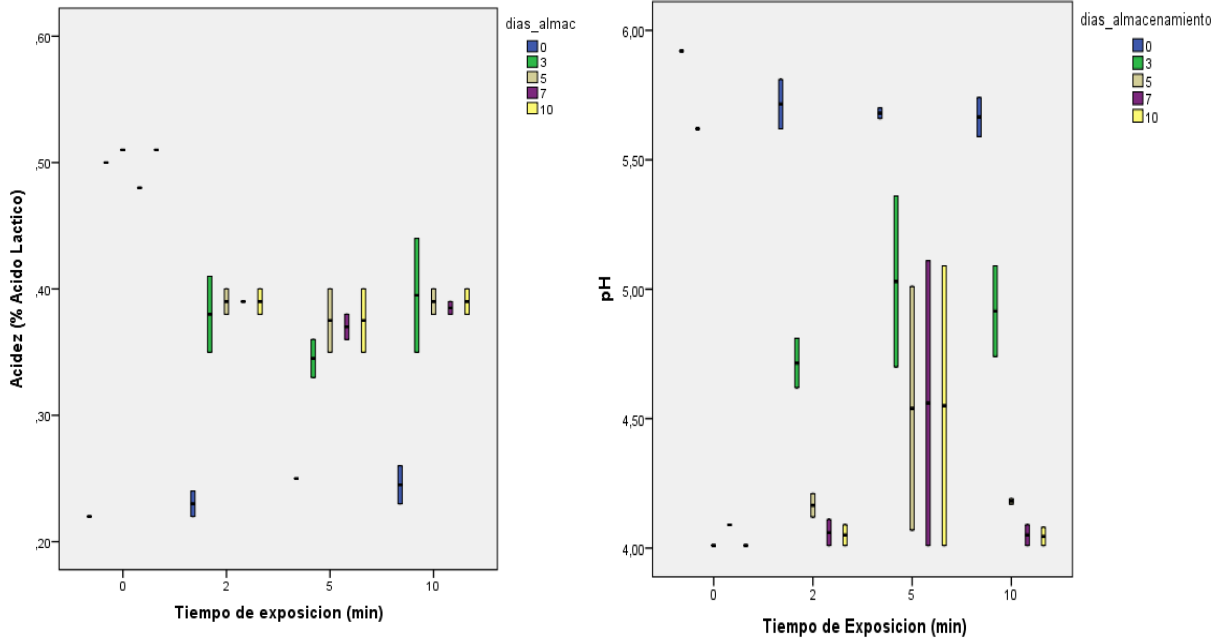


Grafico 1. Diagrama de cajas y bigotes de la acidez y pH de la crema de leche y lo tiempos de exposición (mín.) del ultrasonido.

Del grafico 1 se infiere que la crema de leche sometida a los tratamientos de ultrasonido muestran una disminución del pH a diferentes tiempos de exposición (min), mientras que la acidez expresada en ácido láctico, fue mayor en la crema de leche que no fue sometida a ningún tipo de tratamiento, sin embargo la crema de leche sometida a tratamientos de 2, 5 y 10 min conservaron el porcentaje de acidez a lo largo de los 10 días de almacenamiento a temperatura de 30 y 40 ± 1 °C, indicando que el tratamiento de ultrasonido aplicado a la crema de leche cruda disminuye la acidez siendo una alternativa tecnológica para mejorar su calidad antes de la Ultrapasteurización. El aumento de pH fue atribuido a la liberación de iones de la estructura celular en el citoplasma o cambios en la estructura proteica, que podría conducir a cambios en la posición de las funcionalidades iónicas que reducen los valores en el alimento, Alarcón *et al*, (2018).

Tabla 4. ANOVA para Acidez por Tiempo de exposición

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,00172667	2	0,000863333	0,22	0,8055
Intra grupos	0,10694	27	0,00396074		
Total (Corr.)	0,108667	29			

Tabla 5. ANOVA para pH por Tiempo de exposición

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,670207	2	0,335103	0,75	0,4810
Intra grupos	12,0305	27	0,445576		
Total (Corr.)	12,7007	29			

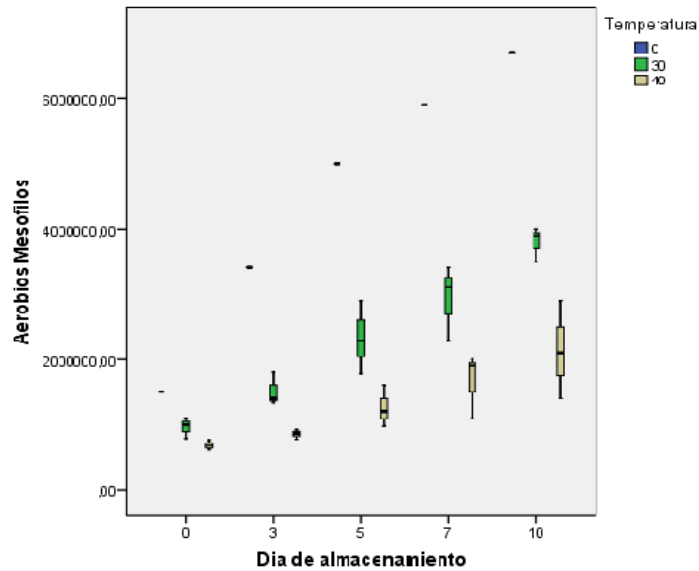
4.5. RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS DE LA CREMA DE LECHE TRATADA CON ULTRASONIDO.

Los resultados del análisis microbiológico se presentan en la tabla 5, donde la crema de leche tratada con ultrasonido presentó una estabilidad en cuanto a recuentos microbianos y pequeñas variaciones reflejada en los valores de UFC/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro) a lo largo del almacenamiento, lo que quiere decir que el tratamiento es efectivo si se pretende almacenar la crema de leche antes de ser sometida a un tratamiento final como lo es la ultrapasteurización.

Tabla 6. Resultados de los análisis microbiológicos de la crema de leche con y sin tratamientos

ANÁLISIS	TIEMPO EXPOSICIÓN (min)	TRATAMIENTO ULTRASONIDO A 30 °C					TRATAMIENTO ULTRASONIDO A 40 °C				
		DÍA					DÍA				
		0	3	5	7	10	0	3	5	7	10
Aerobios mesófilos	2	2.900.000	7.400.000	3.210.000	3.200.000	7.190.000	1.100.000	2.430.000	1.310.000	1.500.000	4.310.000
	5	1.100.000	7.080.000	2.680.000	3.200.000	4.790.000	840.000	1.840.000	340.000	2.800.000	6.330.000
	10	800.000	8.080.000	1.480.000	4.300.000	5.930.000	830.000	3.340.000	230.000	2.500.000	3.980.000
Coliformes totales	2	21.000	45.000	11.000	2.650	3.340	10.000	20.000	10.000	1.900	6.630
	5	30.000	42.000	50.000	4.900	3.231	10.000	20.000	10.000	8.400	650
	10	10.000	37.000	50.000	10.900	2.240	10.000	80.000	10.000	7.600	3.420
Hongos y levaduras	2	200	800	7.800	1.830	5.650	100	900	1.900	1.470	3.250
	5	100	800	900	2.520	5.800	100	800	700	1.890	1.133
	10	200	1.000	700	2.500	4.700	100	1.000	100	1.900	3.150

De acuerdo a la gráfica 3, se observó que hay pequeñas variaciones en el conteo de los mesófilos aerobios después de la aplicación del ultrasonido comparado con la muestra de crema de leche cruda sin tratamiento, demostrando que el tratamiento de ultrasonido a los 40 °C durante los días de almacenamiento redujo el número de bacterias entre 2 a 4 logaritmos. Sin embargo estos cambios no fueron estadísticamente significativos de acuerdo al análisis de varianza aplicado ver tabla 6.



Gráfica 2. Diagrama de cajas y bigotes de mesófilos aerobios influenciados por los días de almacenamiento y temperaturas.

De acuerdo con Pagán (1999), la inactivación microbiana se relaciona con el fenómeno de cavitación cuya intensidad se afecta con la temperatura y características fisicoquímicas del medio de propagación de las ondas ultrasónicas, quien reportó que la implosión de burbujas durante la cavitación acelera las partículas que se encuentran alrededor (sólidos inmersos), aumentando su choque e incrementando el efecto de cavitación, coincidiendo con lo encontrado en esta investigación.

Como se observa en la gráfica 3 el recuento de mesófilos presentó una variación en los tiempos de exposición durante los días de almacenamiento con la aplicación del ultrasonido. Sin embargo, el análisis de ANOVA no mostro diferencias estadísticamente significativas ($p\text{-valor} \leq \alpha$), es decir, $0,9355 \leq 0,05$ (ver tabla 6).

Tabla 7 ANOVA para Aerobios mesófilos por tiempo de almacenamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>p-valor</i>
Entre grupos	7,4366E11	2	3,7183E11	0,07	0,9355
Intra grupos	1,50139E14	27	5,56071E12		
Total (Corr.)	1,50883E14	29			

La grafica 3 muestra reducción significativa menor a 2.000 ufc / ml en el conteo de los coliformes total durante los días de almacenamiento a temperaturas de 30 - 40 ° C y la muestra control (crema de leche cruda sin tratamiento) coincidiendo con los resultados Tao *et al.*, (2015) debido a la inactivación microbiana por el ultrasonido.

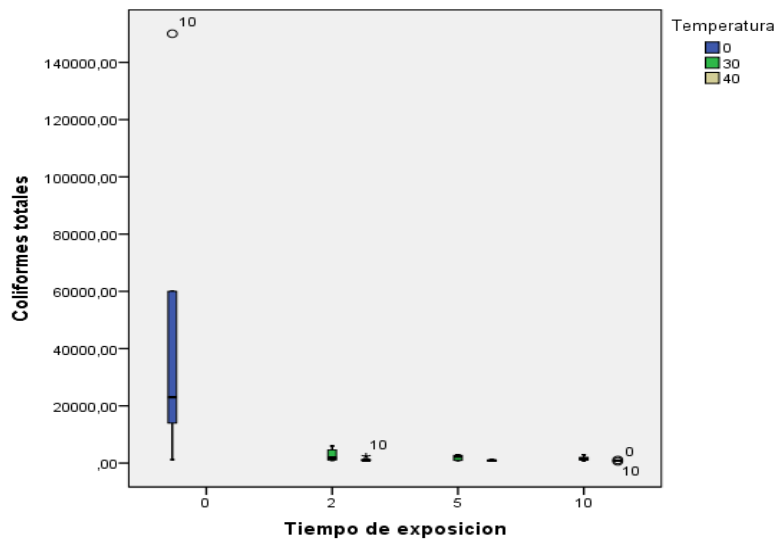
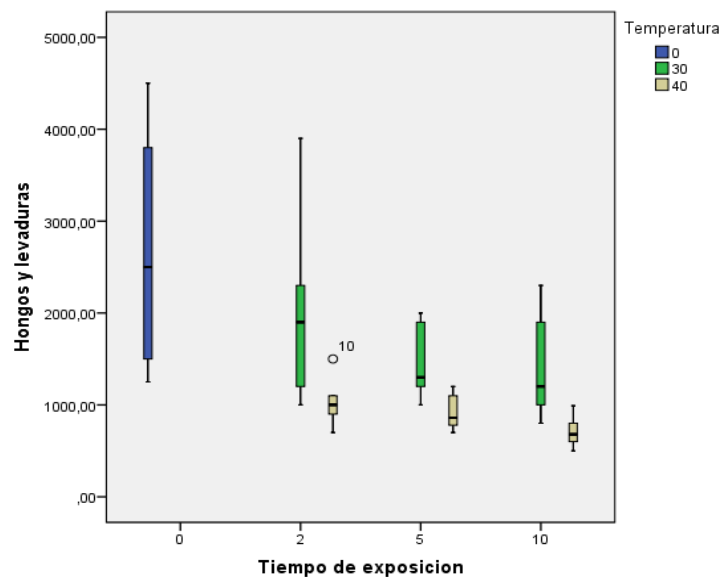


Grafico 3. Diagrama de cajas y bigotes de coliformes totales influenciado por el tiempo de exposición del ultrasonido y al temperatura.



Grafica 4. Hongos y levaduras influenciados por tiempos de exposición y temperaturas.

En la gráfica 4 se encontró que la disminución en el conteo de hongos y levaduras es similar en los tiempos y temperaturas de exposición con el tratamiento de ultrasonido, que es la carga de microorganismo con una disminución poco significativa, manteniendo un conteo similar al de la crema de leche cruda sin tratamiento (patrón).

El tratamiento de ultrasonido a 30 y 40 °C a 37 Hz a: 2, 5 y 10 minutos de tratamiento, no fue efectivo para el grupo de hongos y levaduras; probablemente esto se deba a que la estructura celular de estos microorganismos es diferente a las bacterias de grupo aerobio mesófilo y coliforme total.

4.6. RESULTADOS DEL EFECTO DEL ULTRASONIDO SOBRE LAS ENZIMAS PRESENTES EN LA CREMA DE LECHE TRATADA CON ULTRASONIDO.

Los resultados obtenidos en los tratamientos de ultrasonido de crema de leche cruda a temperaturas de 30 y 40 °C a diferentes tiempos de exposición muestran que no hubo incidencia en la inactivación de las enzimas presentes en la crema de leche cruda (fosfatasa alcalina y peroxidasa, (POD)) ni antes ni después del tratamiento con ultrasonido (ver tabla 8).

Tabla 8. Resultados de la prueba de fosfatasa y alcalina en crema de leche con y sin tratamiento de ultrasonido.

ENZIMAS ANALIZADAS	TRATAMIENTO ULTRASONIDO 30 °C			TRATAMIENTO ULTRASONIDO 40 °C		
	2	5	10	2	5	10
TIEMPO EXPOSICIÓN (min)						
FOSFATASA ALCALINA	+	+	+	+	+	+
PEROXIDASA	+	+	+	+	+	+

Como se observa en la tabla 6 ninguno de los tratamientos con ultrasonido aplicados inactivaron las enzimas presentes en la crema de leche: la fosfatasa alcalina y la peroxidasa, las cuales se presentan de manera natural en la leche cruda, se infiere que pudo deberse que a las bajas temperaturas empleadas en la aplicación del ultrasonido, ya que ellas se inactivan en temperaturas cercanas a la pasteurización teniendo en cuenta lo expuesto por Bermúdez-Aguirre (2017), quien considera que el impedimento para que las enzimas presentes en productos no llegaran a inactivarse a bajas temperaturas y longitudes de onda se pudo deber a la textura presente en ciertos alimentos. Para ciertos alimentos (p. Ej., Zumo de naranja) y, en particular, con tecnologías no térmicas emergentes

como el ultrasonido y el procesamiento a alta presión, las enzimas endógenas y deteriorantes pueden ser muy resistentes.

De otra parte, las enzimas también deben usarse como referencias de pasteurización para evitar el deterioro de los alimentos procesados durante el almacenamiento. La termosonicación y la manotermosonicación se recomiendan para la inactivación enzimática, ya que el ultrasonido a temperatura ambiente a menudo es ineficaz contra la mayoría de las enzimas alimentarias. Según la investigación de Matos (2017), se verificó claramente la eficiencia de la termosonicación en el proceso de la reducción / inactivación de la enzima polifenoloxidasas (PPO) y la enzima peroxidasa (POD) en agua de coco en donde se encontró que la ecografía presentó un efecto aditivo al tratamiento térmico sobre la inactivación de PPO y POD. Sin embargo, estudios específicos para cada tipo de la matriz de alimentos debe realizarse porque este proceso puede no presentarse la misma eficiencia en diferentes matrices, aspecto que coincide con los resultados obtenidos en el tratamiento de ultrasonido en la crema de leche donde no se inactivaron las enzimas peroxidasa y fosfatasa alcalina.

En estudios previos se informó que el ultrasonido tiene poco efecto sobre la actividad PPO reducción en el jugo de guanábana (Dias *et al.*, 2015) e incluso actividad PPO aumento en cubos de manzana y jugo de manzana (Silva, Almeida, Rodríguez, & Fernández, 2015) y puré de aguacate (Bi *et al.*, 2015). De otra parte, según la investigación realizada en zumo de manzanas por Abid (2013), lo que indica que, la mayor inactivación de enzimas se obtuvo en ultrasonidos con sonda a 60 °C durante 10 min, e igualmente la inactivación completa de microorganismos, estos resultados evidencian que las enzimas se inactivan a temperaturas por encima de los 60 ± 1 °C.

4.7. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN SENSORIAL DE LA CREMA DE LECHE.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la evaluación sensorial aplicada a la crema de leche cruda y con tratamiento de ultrasonido.

4.7.1. Perfil sensorial de la crema de leche cruda

El perfil sensorial es la expresión final que se obtuvo de la evaluación de la crema de leche cruda con y sin tratamiento, en el que se establece la intensidad de los atributos característicos de la crema de leche permitiendo definir características para su uso.

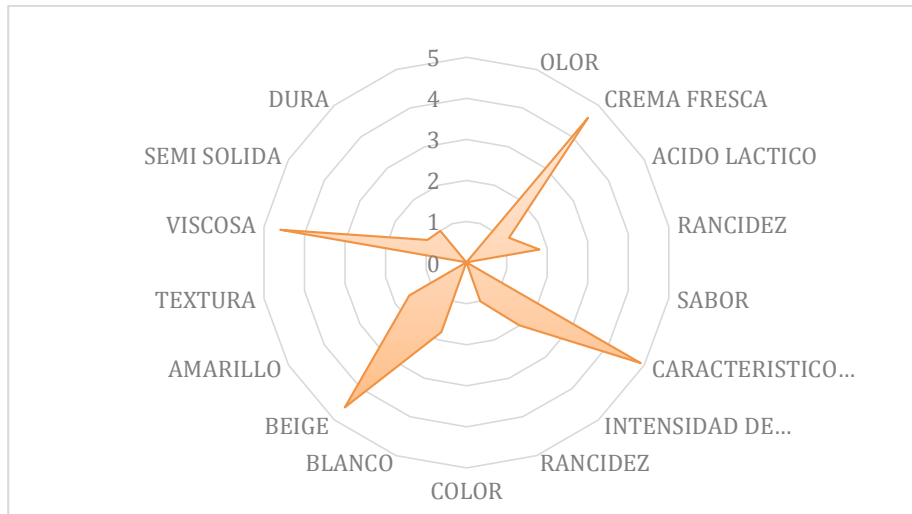


Gráfico 5. Perfil sensorial. Intensidad de los atributos de calidad de la crema de leche cruda (olor, color y sabor).

La grafica 5 permite observar la intensidad de los atributos de calidad de olor, color y sabor de la crema de leche: olor a crema fresca (4,6), sabor característico de crema de leche fresca (4,9), color beige (4,6) y textura viscosa (4,6) atributos característicos de una crema de leche fresca y adecuado para su procesamiento.

4.7.2. Perfil sensorial de la crema de leche tratada con ultrasonido (37 Hz).

En la gráfica 6, se presenta un consolidado del perfil sensorial de la crema de leche tratada con ultrasonido (37 Hz) a una temperatura de 30 °C y los tiempo de exposición evaluados (2, 5 y 10 min) durante los 10 días de almacenamiento en refrigeración (4 ± 1 °C).

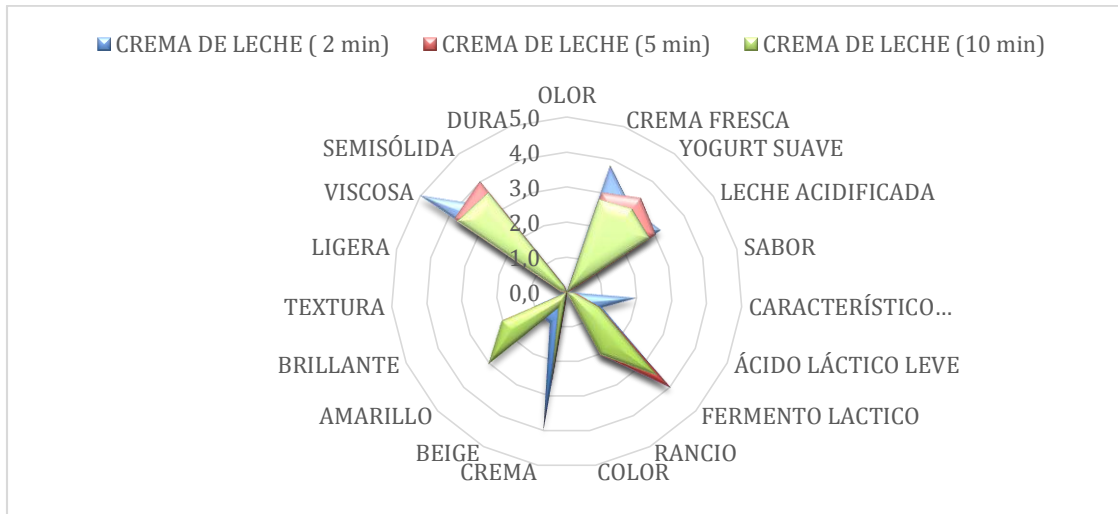


Grafico 6. Perfil sensorial. Intensidad de los atributos de calidad de la crema de leche tratada con ultrasonido en los tiempos y temperaturas (30°C) de exposición durante 10 de almacenamiento en refrigeración.

Se observa una incidencia de sabor característico a leche fresca, suave y con un toque dulce, color crema, es el color que tiene este producto ya que es un intermedio entre blanco y amarillo, olor a crema fresca pues no está acidificada y una textura viscosa por estar dentro del porcentaje de 35% no tiene una dureza representativa, en la crema de leche tratada con tiempos de exposición de 2 minutos, mientras que las muestras de crema de leche tratadas a 5 y 10 minutos presentaron características poco deseables en la crema de leche como olor leche fermentada, tenía un ligero sabor a kumis, sabor fermentado láctico, no es desagradable pero no es el típico de este producto en la marca de la empresa, y textura semisólida, el tratamiento dañó un poco la estructura de la crema natural y fresca.

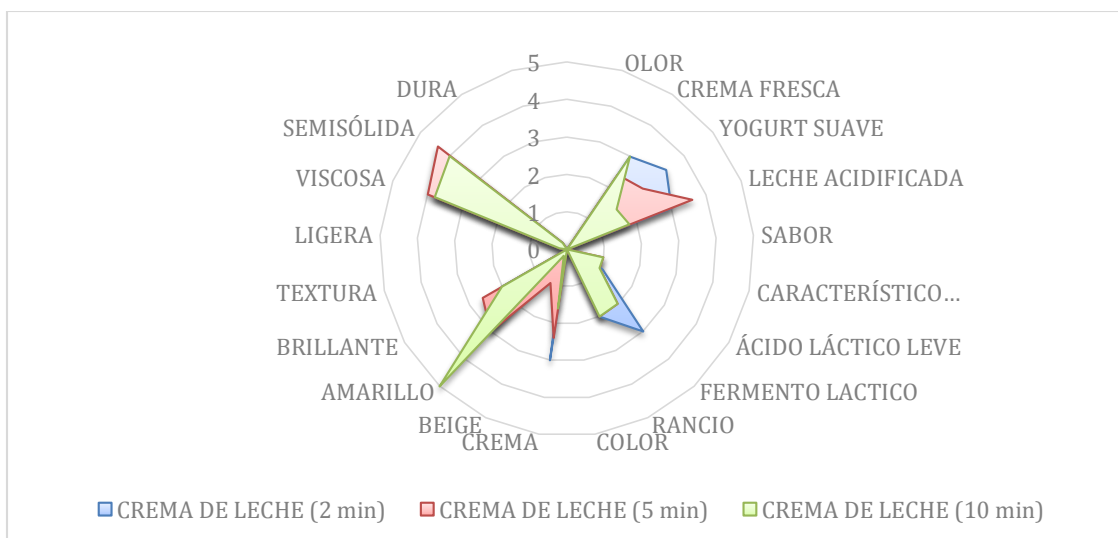
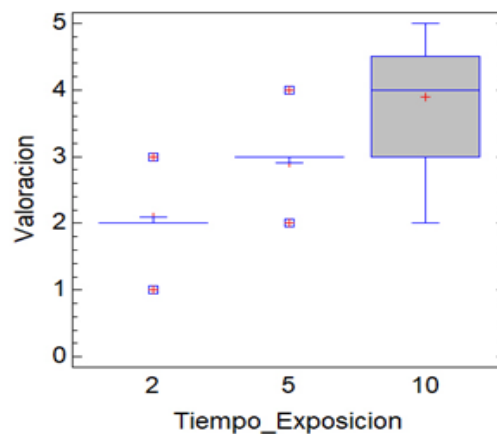


Grafico 7. Perfil sensorial. Intensidad de los atributos de calidad de la crema de leche tratada con ultrasonido en los tiempos y temperatura (40 °C) de exposición durante 10 de almacenamiento en refrigeración.

En la gráfica 7 se presenta un consolidado del perfil sensorial de la crema de leche tratada con ultrasonido (37 Hz) a una temperatura de 40 °C y los tiempo de exposición evaluados (2, 5 y 10 min) durante los 10 días de almacenamiento en refrigeración (4 ± 1 °C). Se observa una incidencia de olor a leche acidificada, baja percepción de sabor fermento lácticos, la temperatura empieza a ejercer su control, color amarillo, muy posiblemente por oxidación de las grasas y una textura viscosa que es agradable dentro de los panelistas, en la crema de leche tratada con tiempos de exposición de 5 minutos, mientras que las muestras de crema de leche tratadas a 2 y 10 minutos presentaron características poco deseables en la crema de leche como olor leche fermentada, por bajo tiempo de exposición al tratamiento, el color amarillento por oxidación de las grasas, sabor ácido láctico muy probablemente por supervivencia microbiana o enzimática, y textura semisólida grumosa por el prolongado tratamiento a esta temperatura.

4.7.3. Índice global de la calidad de las muestras de crema tratadas con ultrasonido.

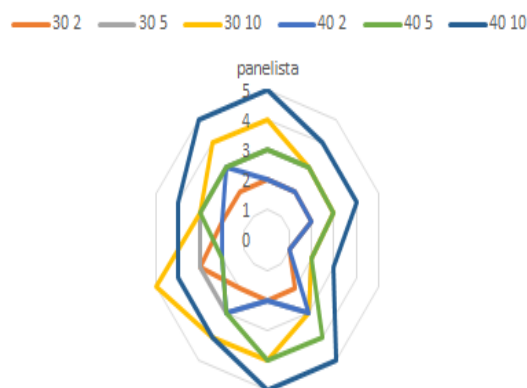
La calificación global de las muestras de crema de leche tratadas con ultrasonido realizada en el momento de establecer el perfil sensorial de cada muestra es el complemento que permite que el juez de un concepto global del producto teniendo en cuenta la valoración que el realizo de todos los atributos evaluados de manera integral.



Gráfica 8 Calificación global de las muestras de crema de leche tratadas con ultrasonido a diferentes tiempos de exposición.

En la valoración global realizada por los jueces, estos prefirieron las muestras de crema tratadas con ultrasonido a 30 y 40 °C tiempos de exposición de 2 y 5 minutos por presentar mejores características sensoriales, aspecto que fue corroborado con la prueba de preferencia empleando una escala hedónica, cuyos resultados se muestran a continuación:

Como se observa en la gráfica 8, el tiempo de exposición afecta la percepción sensorial de los jueces semi entrenados sobre la crema de leche tratada con ultrasonido a temperaturas de 30 y 40 ± 1 °C a 10 min con valoraciones de me disgusta y me disgusta mucho.



Grafica 9. Apreciación sensorial de los jueces respecto a tiempos de exposición de ultrasonido y temperaturas en crema de leche.

En terminos generales, se puede decir que el tratamiento de ultrasonido que tuvo mejor aceptación sensorial fue el de 30 y 40 °C por 2 y 5 minutos y lo que evidencia que a menor tiempo de exposición de ultrasonido mayor aceptación sensorial, presentando sabor agradable, olor acido lactico leve y color crema claro, característico de la crema de leche.

Los panelistas semientrenados no aceptaron la crema tratada a 40 °C debido a que el ultrasonido desmejoro mucho las características organolépticas presentando características como: de granulosis, arenosa y su color es amarillento, mientras que la crema de leche sin tratamiento es homogénea y su color es beige. Además, la crema de leche después del tratamiento de ultrasonido a 40 °C por 10 minutos presentó separación de fases. Se encontró que Dulcieri, (2013), considera que las micelas de caseína reflejan la luz, otorgando así el color blanco a la leche. Sin embargo,

los carotenos de la grasa poseen diferentes grados de pigmentación amarilla, lo que otorga a la crema su color amarillento; este color también puede deberse a la acción de algunas bacterias. Los microorganismos pueden alterar el color al mismo tiempo que producen otras de las alteraciones ya citadas. El color puede estar producido por el desarrollo de bacterias o mohos pigmentados en la superficie sobre la que forman un velo o anillo, o hallarse diseminada por toda la leche.

Otro parámetro importante dentro de las características de una buena crema de leche es el sabor y según la percepción sensorial de los panelistas el tratamiento de ultrasonido a 37Hz que presentó mejores características fue a 30 °C y 40 °C por 2 y 5 min (ver anexo 4).

La percepción de los panelistas al momento de realizar la evaluación sensorial fue de gran importancia al momento de emitir los juicios así como su experiencia, adquirida en la empresa Freskaleche S.A.S. lo que ayudó a determinar que la crema de leche con tratamiento de ultrasonido de 37 Hz a 30 y 40 °C por 2 y 5 minutos fueron las muestras con mayor aceptación sensorial.

Rodríguez *et al.* (2014), investigó, variadas percepciones dentro de un grupo de panelistas las características sensoriales de la leche, a través de la percepción de los consumidores se lograron generar palabras consensuales como: color blanco, color amarillo, sabor agrio, sabor dulce y sabor salado, que permitieron caracterizar las leches estudiadas. Es importante establecer una estrategia que permita cuantificar la intensidad de las palabras generadas por los consumidores, a través de un panel entrenado, y asociar dichas intensidades con datos de preferencia, con la finalidad de comprobar si las palabras consensuales generadas, explican la preferencia o rechazo de los consumidores sobre las leches sujetas a estudio, con la finalidad de generar el mapa de productos, determinar las palabras generadas permitan describir las leches, evaluar el efecto de discriminación del panel de consumidores y la estabilidad del mapa de productos. Las principales características sensoriales de las leches mediante el panel de consumidores, generando 209 palabras, de las cuales, los colores blanco y amarillo y el sabor agrio, dulce y salado fueron las más comunes, describiendo las principales características de las leches analizadas. Las elipses de confianza revelaron que el panel de consumidores fue discriminante, lo que generó estabilidad al mapa de productos y confiabilidad en los resultados <0.05 .

Wang (2018), concluyó que las preferencias de los consumidores de los productos alimenticios dependen de una variedad de factores, muchos de los cuales están relacionados con la experiencia sensorial y las percepciones durante el procesamiento oral de los alimentos; y en las interacciones entre la saliva y los alimentos ingeridos. La estructura de los alimentos afecta el proceso de evaluación sensorial de los alimentos. Además, se discute cómo la fisiología oral afecta la percepción de los

alimentos y cómo se pueden alterar y predecir todas estas variables. Aunque la aceptabilidad se usa comúnmente para examinar el gusto por los productos alimenticios, más estudios ahora enfatizan la importancia de medir las conceptualizaciones de los consumidores, como las emociones para los productos alimenticios. También es importante identificar cómo los consumidores perciben los atributos sensoriales de los productos alimenticios, como lo ilustra la creciente participación de los consumidores en la caracterización del producto. Shouteten (2015), usó un cuestionario de formato de rueda para obtener perfiles emocionales y sensoriales para productos alimenticios utilizando una herramienta de consumo práctica. Los términos seleccionados fueron específicos del producto y el enfoque de aplicar la tasa de aplicar todo (RATA) se utilizó como una técnica de escalado. Tres experimentos diferentes demostraron que la Rueda EmoSensory® podía discriminar dentro y entre categorías de productos alimenticios. El sistema olfativo tiene que procesar el ilimitado mundo químico de los olores. Todo comienza en la nariz, en la cual las moléculas odorantes volátiles entran en ritmo con nuestra. Como todos los demás sentidos, el olfato puede mostrar variaciones genéticas, de género y de envejecimiento en el rendimiento. Además, la función olfativa puede verse afectada por el estrés, el ritmo circadiano y, en las mujeres, por el estado neuroendocrino reproductivo. Duchamp (2016).

4.8 INFLUENCIA DEL ULTRASONIDO SOBRE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DE LA CREMA DE LECHE TRATADA

De la gráfica 10 se observa que la temperatura de exposición a 30 °C es más efectiva para preservar la acidez de la crema de leche (0,38 °Th), debido a que presenta varios resultados con un pH mayor a 4.5; mientras que la exposición de temperatura a 40 °C presenta pH por debajo de 4.5, indicando que esta temperatura no favorece la conservación de la acidez durante el tiempo de almacenamiento.

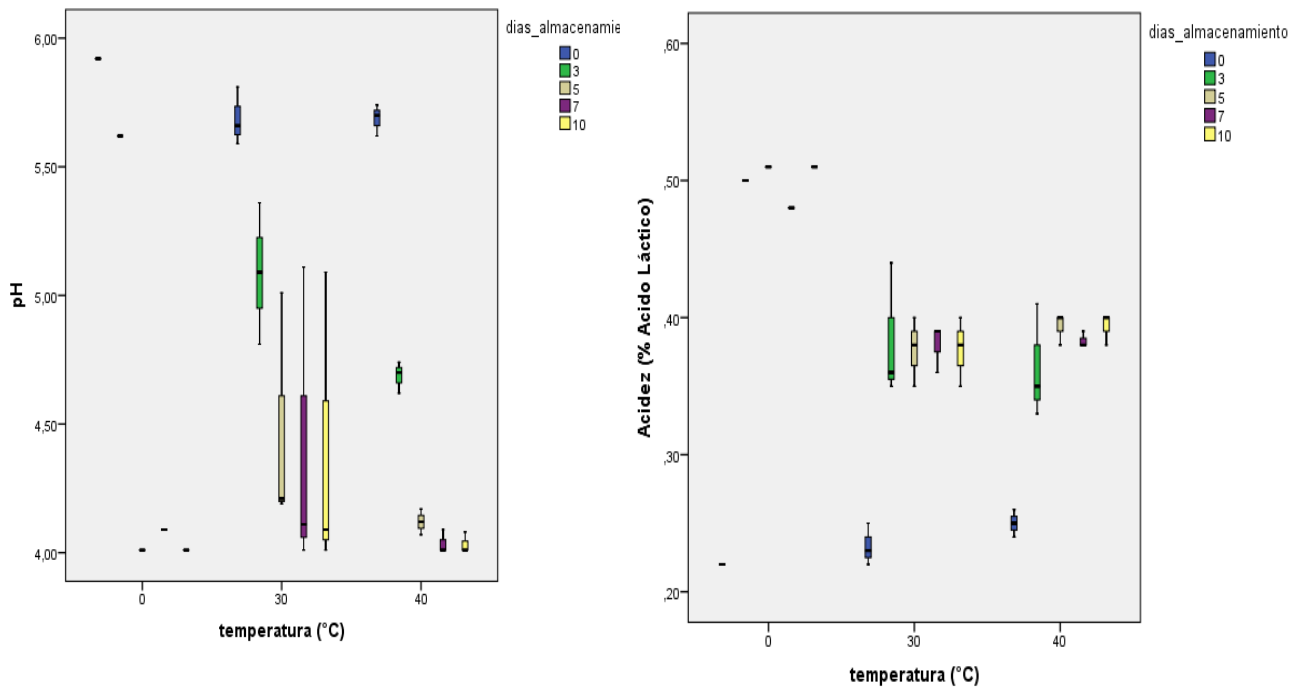


Gráfico 10. Diagrama de cajas y bigotes del pH y acidez de la crema de leche en las dos temperaturas de exposición durante su almacenamiento.

A partir de la tabla 9 y 10 del análisis de ANOVA aplicado para la acidez y el pH en función de la Temperatura, se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas dado que el *p-valor* es mayor al nivel de significancia. Sin embargo, en el gráfico de cajas y bigotes se pudo observar un cambio tanto en la acidez como en el pH, debido a que el tratamiento realizado a la crema cruda no deja un producto libre de enzimas y microorganismos, por consiguiente la maduración de la crema puede seguir en condiciones de refrigeración y cambiar no solo sus características fisicoquímicas sino también las microbiológicas.

Tabla 9. Anova para acidez en función de Temperatura de exposición durante su almacenamiento

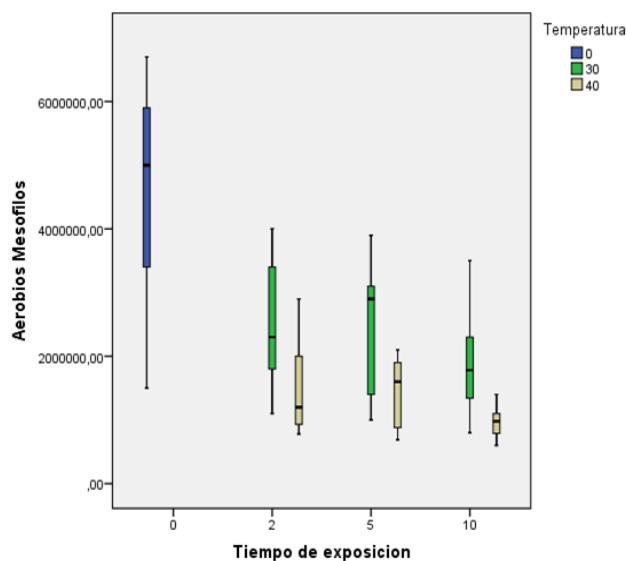
<i>Fuente</i>	<i>Suma Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>p-valor</i>
Entre grupos	0,663053	1	0,663053	1,54 2	0,2246
Intra grupos	12,0377	28	0,429918		
Total (Corr.)	12,7007	29			

Tabla 10. Anova para el pH en función de Temperatura de exposición durante su almacenamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	p-valor
Entre grupos	0,000333333	1	0,000333333	0,09	0,7713
Intra grupos	0,108333	28	0,00386905		
Total (Corr.)	0,108667	29			

Según lo observado en la gráfica 10, se aprecia que las dos temperaturas tienen un comportamiento similar en la producción de ácido láctico dentro de la crema de leche, originado por microorganismos, durante los 10 días que se mantuvo refrigerada, con ello se concluye que el efecto de la temperatura no es de gran relevancia para preservar el producto semielaborado concordando con los resultados obtenidos por Cameron (2009), quien establece que el uso de ultrasonido en la pasteurización, continúa siendo de gran interés para la industria láctea, ha demostrado ser eficaz para la destrucción de *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* y *Listeria monocytogenes*, sin efectos perjudiciales sobre el total de proteínas o contenido de caseína de la leche pasteurizada.

De la gráfica 11 se observa que el conteo de los mesófilos aerobios es reducido entre 2 y 3 logaritmos con respecto a la muestra patrón (crema de leche cruda sin tratamiento) y los tratamientos (30 y 40 °C), durante el tiempo de exposición desde 2 a 10 min, lo cual es corroborado con lo encontrado por Ahmed *et al.*, (2017), quien afirma que el ultrasonido en combinación con el calor es una tecnología alternativa para la reducción de esporas microbianas, las cuales son características de los grupos mesófilos aerobios coincidiendo con lo reportado por Vercet (1999)



Gráfica 11. Diagrama de cajas y bigotes de los mesófilos aerobios influenciados por tiempo de exposición y temperatura.

Como se observa en la tabla 11, el recuento de coliformes presento una variación en los tiempos de exposición durante los días de almacenamiento con la aplicación del ultrasonido. Sin embargo, el análisis de ANOVA mostro diferencias estadísticamente significativas ($p\text{-valor} \leq \alpha$), es decir, $0,0014 \leq 0,05$.

Tabla 11. ANOVA para Coliformes totales por días de almacenamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>p-valor</i>
Entre grupos	5,00295E9	3	1,66765E9	7,15	0,0014
Intra grupos	5,59762E9	24	2,33234E8		
Total (Corr.)	1,06006E10	27			

Coincidiendo con Ince (2001) quien encontró que la concentración de *Escherichia coli* en agua desionizada sometida a tratamiento de ultrasonido (20 KHz), se redujo notoriamente después de adicionar sólidos (gránulos de cerámica, partículas metálicas de zinc y carbón activado) al medio, posiblemente a causa de un aumento en el fenómeno de cavitación. También se ha argumentado que el contenido graso presente en la leche podría estar ejerciendo un efecto protector contra el efecto del ultrasonido para *Listeria innocua*, siendo más efectiva la inactivación en leches con menor contenido de grasa (Bermúdez, 2008).

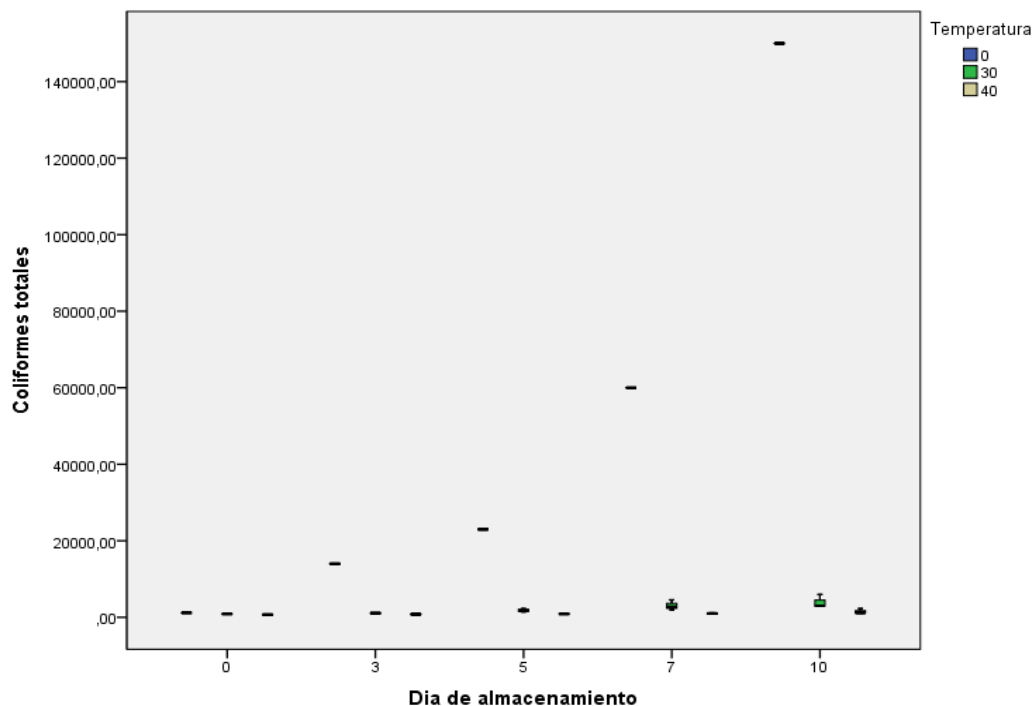


Gráfico 12. Coliformes totales influenciados por los días de almacenamiento y temperatura

En la gráfica 12 se muestra que el recuento de coliformes totales permanece constante en los 10 días de tratamiento del tratamiento de la crema de leche, coincidiendo con Chandrapala *et al.*, (2012), quien demostró que las curvas de crecimiento microbiano se considera como otra alternativa de procesos térmicos tales como temperaturas de refrigeración durante el almacenamiento. Mientras que Lee (2003) obtuvo mediante tratamiento ultrasónico durante 10 minutos, una reducción de aproximadamente 4,0 ciclos y 0,8 ciclos logarítmicos para *Salmonella sp.*, en agua de peptona y leche achocolatada, respectivamente y Lilliar (1994) reportó la reducción de la concentración en *Salmonella* en piel de pollo sumergida en agua clorinada en un rango de 2,5 a 4,0 ciclos logarítmicos.

De otra parte, Ordoñez (1987) estudió el uso del ultrasonido asistido por temperaturas inferiores a 62 °C logrando una reducción del valor de D para *S. aureus* del 63 % en buffer de fosfato y del 43 % en leche UHT. Igualmente Knorr (2004) encontró que los tratamientos de ultrasonido durante 300 segundos a potencias de 24,6 W y 42,0 W reducen la concentración de *E. coli* en 1.0 y 2.0 ciclos logarítmicos, respectivamente.

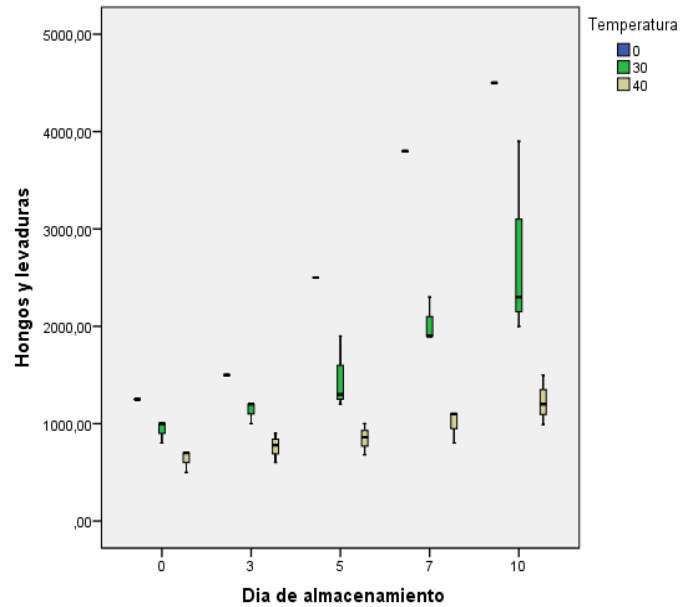


Grafico 13. Hongos y levaduras influenciados por días de almacenamiento y temperaturas.

En la gráfica 13 se encontró que la disminución en el conteo de hongos y levaduras en ambos tratamientos siendo mayor en el tratamiento a 40 °C durante los 10 días de almacenamiento. Corroborado por Barbosa *et al.*, (2008) muestra que las bacterias se adhieren a los glóbulos grasos en la medida que el tratamiento de ultrasonido puede alterar las membranas lipídicas de las células generando adelgazamiento de las membranas celulares, y diferentes rugosidades superficiales.

Aparentemente estas nuevas condiciones, llevan a los microorganismos adherirse con mayor fuerza y esconderse entre los glóbulos grasos, lo cual representa un efecto protector del calor y la cavitación, esto implicando baja disminución de las bacterias que ayudan a la acidificación de la crema durante su almacenamiento. Lopez-malo, 2005, encontró que el uso del ultrasonido por sí solo en la industria alimentaria para la inactivación fúngica es actualmente inviable. Coincidiendo con los resultados encontrados por Wu *et al.* (2015); la inactivación microbiana se debe al tratamiento por ultrasonido. Sin embargo, Combinación de ultrasonido, antimicrobianos y calor muestra una promesa considerable, El futuro del ultrasonido en la industria alimentaria para fungicidas y bactericidas los propósitos son los procesos multifactoriales que combinan antimicrobianos, pH reducido y / o aw con termosonicación, manosonicación y / o manotermosonicación, al ser más eficientes energéticamente y dar lugar a la reducción de valores D en comparación con el calor convencional tratados, estos procesos multifactoriales necesitan ser más estudiado para generar la base de tratamientos ultrasónicos factibles en pasteurización.

4.9 DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DEL EFECTO DEL ULTRASONIDO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS, ENZIMÁTICAS, Y SENSORIALES DE LA CREMA DE LECHE TRATADA.

La relación entre las características de la crema de leche tratadas con ultrasonido (37 Hz) se observa en la tabla 12, de la cual se infiere que los aerobios mesófilos, coliformes totales, hongos y levaduras son inversamente proporcionales a: los diferentes tiempos de exposición, a las temperaturas y el pH. Sin embargo son directamente proporcionales a los días de almacenamiento en refrigeración (10 días) y la acidez. Según Amiri en 2018, estudió la incidencia del descenso de pH y el tratamiento de la crema batida como mejoraba sus características de viscosidad y textura y observaron que mejoraban mucho cuando introducían proteína de suero concentrado. El análisis mostró que el tratamiento térmico a valores de pH más bajos y un mayor tiempo de las soluciones de proteína de suero concentrada aumentaba la viscosidad (crema batida), la firmeza y la disminución de la sinéresis y el exceso de la crema batida, lo que conducía a una mejor estabilidad en los productos finales. El resultado mostró que en la crema batida que contenía proteína del suero concentrada modificado que se había tratado con un mayor tiempo de tratamiento térmico y valores de pH más bajos tenía propiedades texturales deseables.

Tabla 12. Análisis de correlación del efecto del ultrasonido sobre las características de crema de leche durante el almacenamiento.

	Temperatura (°C)	Tiempo exposición (min)	Días almacenamiento	Aerobios M (UFC/ml)	Coliformes totales (UFC/ml)	Hongos y Levadura (UFC/ml)	pH	Acidez (°Th)
Temperatura (°C)	1							
Tiempo exposición (min)	0,5092729	1						
Días almacenamiento	0	0	1					
Aerobios M. (UFC/ml)	-0,6958869	-0,4713669	0,60897300	1				
Coliformes totales (UFC/ml)	-0,6024248	-0,3555895	0,28844355	0,71728289	1			
Hongos y Levaduras (UFC/ml)	-0,6303803	-0,4408431	0,56615886	0,92706927	0,7214624	1		
pH	0,66647566	0,44162526	-0,5778791	-0,9530956	-0,7936623	-0,9087069	1	
Acidez	-0,5673247	-0,4141480	0,6403024	0,93946308	0,7777055	0,9606312	-0,9478118	1

De otra parte se infiere que la acidez y el pH son inversamente proporcionales por lo tanto se establece que el tratamiento de ultrasonido (37 Hz) con temperatura (30 y 40 °C), arrojó excelentes resultados en la reducción microbiana presente en la crema de leche cruda, como es el caso de las bacterias de tipo mesófilo, cuya principal función es producir ácido a partir de la lactosa de la leche y es un factor altamente deteriorante en las características de este producto, lo cual se corroboró con lo estudiado por Khanal (2014), quien en su estudio observó que el tratamiento combinado de pasteurización (63 °C / 30 min) seguido de ultrasonido eliminó aproximadamente 6 ufc/ml de estas células en leche desnatada, obteniendo que el tratamiento de ultrasonidos causó una reducción significativa de *Bacillus spp.*; células vegetativas de *Bacillus coagulans* (ATCC ® 12245), *Anoxybacillus flavithermus* (DSM 2641), *Bacillus sporothermodurans* (DSM 10599), *Bacillus licheniformis* (ATCC ® 6634) y *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC ®15952). De igual forma, Vijayakumar (2015) encontró que la termosonicación disminuyó el tamaño del glóbulo de grasa en leche descremada y crema, y el efecto de homogeneización aumentó con el tiempo de tratamiento. La termosonicación a potencias promedio de 104 W (133 µm p-p) y 115 W (152 µm p-p) durante 1 y 3 min destruyó coliformes y más del 99 % de las bacterias aeróbicas totales. El recuento total de bacterias aeróbicas en la leche desnatada y termosonicada, y en muestras de crema, fue inferior a 20,000 ufc / ml en 30 días. Por otra parte, O'Donnell, 2010 considera que el mecanismo de muerte microbiana se debe principalmente al efecto del ultrasonido sobre la envoltura celular, causando adelgazamiento de las membranas celulares, poros en las membranas y producción de radicales libres. Se ha demostrado también que la cavitación puede generar inactivación de enzimas como la pectinmetilesterasa, polifenoloxidasas y peroxidasas, responsables del deterioro de jugos de frutas y vegetales, así como de enzimas diferentes asociadas a la calidad de la leche.

Durante los tiempos y temperaturas que se aplicó el ultrasonido a 37 Hz, se encontró que las enzimas (peroxidasa y fosfatasa alcalina) no fueron inactivadas por lo tanto es necesario que se investiguen otras longitudes de ondas y tiempos más prolongados de exposición. Las enzimas peroxidasa y fosfatasa alcalina se encuentran presentes en productos lácteos entre estos la crema de leche. Así mismo, se encuentran presentes en las frutas las cuales han sido estudiadas por Bermúdez-Aguirre en 2011, demostrando la utilidad de la termosonicación para el procesamiento de zumo de manzana a baja temperatura, para una mayor inactivación de enzimas y microorganismos, el zumo de manzana fresco se termosonicó utilizando ultrasonido en baño (25 kHz, 30 min, 0,06 W cm (-3)) y ultrasonido con sonda de sonicación (20 kHz, 5 y 10 min, 0,30 W cm (-3)) a 20, 40 y 60 ° C para la inactivación de enzimas (polifenolasa, peroxidasa y pectinmetilesterasa) y microflora (recuento total en placa, levadura y moho). De acuerdo con Vijayakumar (2015) quien estudió los efectos del calor y el

ultrasonido combinados (termosonicación) sobre la actividad total de plasmina y varias características de calidad de la leche desnatada y la crema. La actividad de la enzima en muestras de leche desnatada termosonizada medida al final de 30 días fue de 5 a 10 veces mayor que el día 0, pero permaneció estable en la crema termosonizada.

5. CONCLUSIONES

El tratamiento con ultrasonido (37 Hz) a temperaturas de 30 y 40 °C de la crema de leche cruda es una alternativa de conservación durante el almacenamiento de la crema de leche antes de su tratamiento final para la empresa Freskaleche SAS.

La reducción de la carga inicial del grupo de microorganismos mesófilos aerobios fue del 62 %, evidenciando que el mejor tratamiento de ultrasonido fue el de 40 °C, a 10 minutos de exposición al ultrasonido. La reducción de coliformes totales fue del 96 % con el tratamiento de 5 minutos a 40 Hz durante 10 días de almacenamiento.

La efectividad del tiempo de exposición y la aplicación de temperaturas (30 y 40 °C) durante los 10 días de almacenamiento de la crema de leche fue a 40 °C con una reducción de 79 % en coliformes totales con respecto al recuento de los mesófilos aerobios en los tres tiempos de exposición 2, 5 y 10 minutos. El tratamiento de ultrasonido a 30 y 40 °C a 37 Hz a: 2, 5 y 10 minutos de tratamiento, no fue efectivo para el grupo de hongos y levaduras, debido a las características en su pared celular mas fuertes que los otros microorganismos.

No se encontró un efecto del ultrasonido a 30 y 40 °C de temperatura durante los días de almacenamiento sobre las características químicas de acidez y pH en la crema de leche tratada

La temperatura de exposición a 30 °C es más efectiva para preservar la acidez de la crema de leche (0,38 °Th) con un pH mayor a 4.5 indicando que esta temperatura favorece la conservación de la acidez durante 10 días de almacenamiento en refrigeración, siendo una alternativa tecnológica para mejorar su calidad antes de la Ultrapasteurización.

Los tratamientos con ultrasonido de 37 KHz a 30 y 40 °C a diferentes tiempos de exposición (2, 5, 10 minutos) no fueron efectivos para inactivar las enzimas fosfatasa alcalina y la peroxidasa, presentes en la crema de leche cruda de manera natural.

Los tratamientos de ultrasonido con 40 °C por periodos de tiempo más prolongados (5 y 10 minutos) en la crema de leche no fueron aceptadas por los panelistas con valoraciones de “me disgusta” y “me disgusta mucho”, al presentar sabor ácido láctico, olor rancio y desagradable.

Se concluye que los tratamientos de ultrasonido evaluados tienen un efecto en la reducción de la flora bacteriana, manteniendo el pH y la acidez en la crema de leche, evidenciado por los panelistas quienes

no percibieron cambios significativos en la percepción sensorial en las muestras tratadas con 30 °C por 5 minutos de exposición, el tratamiento de 40 °C por 2 minutos de exposición.

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar análisis de textura de las muestras de crema de leche con y sin tratamiento de ultrasonido para identificar si existe un efecto sobre sus características a las dos temperaturas y tiempo de almacenamiento (10 días), con esto tendremos otro parámetro de percepción sensorial de los panelistas.

Se recomienda continuar con estudios de la aplicación del ultrasonido en crema de leche cruda donde se involucren otras variables como: tiempos de exposición (15, 20 y 30 minutos), otras longitudes de onda de ultrasonido y su combinación con temperaturas.

Se recomienda realizar estudios de vida útil de la crema de leche cruda tratada con ultrasonido, permitiendo alargar la vida en anaquel del producto en la empresa.

Dar a conocer a las directivas de la empresa los resultados para que se proyecten los posibles costos de inversión versus beneficios de aplicación a escala industrial.

Llevar a escala industrial la aplicación del ultrasonido en volúmenes más grandes y verificar su efectividad.

Enfocar estudios de aplicación de ultrasonido con longitudes de onda más altas de 37HZ en crema de leche para verificar su eficacia en la inactivación de enzimas y eliminación de esporas microbianas.

Llevar a cabo estudios donde se involucren otras enzimas de interés para la industria láctea.

Realizar estudios de ultrasonido en leche cruda entera para evaluar si al extraer la crema sigue teniendo comportamientos favorables durante el proceso.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEKUNTE, A., TIWARI, B. K., SCANNELL, A., CULLEN, P. J., & O'DONNELL, C. (2010). Modelling of yeast inactivation in sonicated tomato juice. *International Journal of Food Microbiology*, 137(1), 116e120.

AHMED, A., ISMAIL, M., AND FARID, M., 2017. Investigation of the use of ultrasonication followed by heat for spore inactivation. *Food Bioprod. Process*, 104: 32-39.

AJLOUNI, S., SIBRANI, H., PREMIER, R., TOMKINS, B. (2006). Ultrasonication and fresh produce (Cos lettuce) preservation. *Journal of Food Science* 71: M62-M68.

ALAIS, C. y LACASA, A. (2003). *Ciencia de la leche*. Editorial Reverté. Barcelona, España. Pág. 229-253, 323-433.

ALARCON, A., PEÑA, I., CARILLO, L., HUERTA, M., REYS, R., JANACUA, H., (2018). Ultrasound application to improve meat quality, *Descriptive Food Science*, Pag. 153-172

ALCALDÍA MUNICIPAL DE AGUACHICA CESAR (2002). Plan de Ordenamiento Territorial Aguachica Cesar 2001 – 2010 Disponible en: http://cdim.esap.edu.co/Bancoconocimiento/Aguachica_cesar_pot_2001-2010/Aguachica/cesar_pot_2001-2010.asp, consultado el 5 de abril de 2015

ALEGRIA, C., PINHEIRO, J., GONÇALVES, E.M., FERNANDES, I., MOLDAO, M., ABREU, M., 2009. Quality attributes of shredded carrot (*Daucus carota* L. cv. Nantes) as affected by alternative decontamination processes to chlorine. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 61–69.

ALEXANDRE, E.M.C., BRANDAO, T.R.S., SILVA, C.L.M., 2012. Efficacy of non-thermal technologies and sanitizer solutions on microbial load reduction and quality retention of strawberries. *Journal of Food Engineering* 108, 417–426.

ALEXANDRE, E.M.C., BRANDAO, T.R.S., SILVA, C.L.M., 2013. Impact of non-thermal technologies and sanitizer solutions on microbial load reduction and quality factor retention of frozen red bell peppers. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 17, 199–205.

ÁLVAREZ, I., MANAS, P., VIRTO, R., CONDON, S. (2006). Inactivation of *Salmonella Senftenberg* 775W by ultrasonic waves under pressure at different water activities. *International Journal of Food Microbiology* 108: 218-225.

AMIRI, A., MOUSAKHANI-GANJEH, A., TORBATI, S., GHAFARINEJHAD, G., KENARI, R., Impact of high-intensity ultrasound duration and intensity on the structural properties of whipped cream, *International Dairy Journal*, Volume 78, March 2018, Pages 152-158.

AOAC, 2002a. Bacterial and Coliform Counts in Milk. Dry Rehydratable Film Methods. Sec. 17. 7. 03. Method 986.33, In: *Official Methods of Analysis of AOAC International*, AOAC International, Gaithersburg, MD.

AOAC, 2002b. Coliform and *Escherichia coli* Counts in Foods: Dry Rehydratable Film Methods. Sec. 17.3.04, Method 991.14. In: Cunniff, P.A. (Ed.), *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th Edn., AOAC International, Gaithersburg, MD, pp: 13-15.

AOAC, 2002c. Yeast and Mold Counts in Foods. Sec. 17.2.09, Method 997.02, In: *Official Methods of Analysis of AOAC International*. AOAC International, Gaithersburg, MD

ARZENI, C., P_EREZ, O. E., & PILOSO, A. M. R. (2012). Functionality of egg white proteins as affected by high intensity ultrasound. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 308e316. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.03.009>.

ASHOKKUMAR, M., MASON, T.J., 2007. Sonochemistry. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. Wiley, New York, NY.

AWAD,S.T., MOHARRAM, H.A., SHALTOUT,O.E., ASKER, D., YOUSSEF, M.M., Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review *Food Research International*, *Food Research International*, Volume 48, N° 2, October 2012, Pag 410-427.

BAGAMBOULA, C.F., UYTTENDAELE, M., DEBEVERE, J., 2002. Acid Tolerance of *Shigella Sonnei* and *Shigella Flexneri*. *Journal of Applied Microbiology* 93(3), 479-486.

BARBOSA, G., BERMÚDEZ, D. (2008). Microstructural effects in thermosonicated yogurt and other dairy products: understanding and exploiting the science. Symposium Dairy Foods: Emerging non thermal food processing technologies – their potential in dairy systems. Journal of Animal Science. Vol. 86. [En línea]. [Consultado 1 dic. 2011]. Disponible en <http://adsas.org/METINGS /2008/abstracts /0553.pdf> >.

BERMÚDEZ - AGUIRRE, D. Y BARBOSA-CANOVAS, G.V. (2008). Study of butter fat content in milk on the inactivation of *Listeria innocua* ATCC 51742 by thermo-sonication. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 9: 176-185.

BERMÚDEZ - AGUIRRE, D. Y BARBOSA-CANOVAS, G.V. (2011). Power ultrasonic fact sheet , non termal processing technologies for foodmames, Iowa: Blacwell publishing Ltda 621-622.

BEYZA, H., HILAL, C., y HAMPARSUM, H. (2007). The use of ultrasonic waves in food technology. Research Journal of Biological Sciences. Vol. 2, No. 4. p. 491 – 497.

BRENNAN, J.G., 2006. Food Processing Handbook. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 177-224.

BROEKMAN, S., POHLMANN, O., BEARDWOOD, E.S., DE MEULENAER, E.C., 2010. Ultrasonic treatment for microbiological control of water systems. Ultrasonic Sonochemistry 17, 1041–1048.

BUDHKAR Y.A., BANKAR S.B., SINGHAL R.S., (2014) , 2 edición, milk and milk products microbiology of Cream and Butter, pag 728-737.

BURGOS, J., CONDON, S., LÓPEZ, P., ORDÓÑEZ, J.A., SALA, F.J. (1994). Sterilization by manothermosonication. PCT int. Pat. Appl. WO 93/19619.

BUTZ, P., TAUSCHER, B., 2002. Emerging technologies: chemical aspects. Food Research International 35 (2/3), 279–284

CAMERON, M., McMaster y L., Britz, T. (2009). Impact of ultrasound on dairy spoilage microbes and milk components. Dairy Science Technology, 89: 83-98.

CAMPO, Y., VILLADA, D., (2015). Efecto del ultrasonido en las propiedades físicas de la leche entera, Universidad Francisco de Paula Santander.

CAO, S., HU, Z., PANG, B., WANG, H., XIE, H., WU, F., 2010. Effect of ultrasound treatment on fruit decay and quality maintenance in strawberry after harvest. *Food Control* 21 (4), 529–532.

CÁRCEL, J.A., BENEDITO, J., SANJUÁN, N., SÁNCHEZ, E. (1999). Aplicación de los ultrasonidos en las industrias de productos lácteos y derivados (y II). (Ultrasonidos de alta intensidad). *Alimentación, Equipos y Tecnología* Septiembre: 135-141.

CÁRCEL, J.A. (2003). Influencia de los ultrasonidos de potencia en procesos de transferencia de material. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia..

CARCEL, J.A., GARCIA-PEREZ, J.V., BENEDITO, J., MULET, A., 2012. Food process innovation through new technologies: use of ultrasound. *Journal of Food Engineering* 110, 200–207.

CELIS, MAURICIO. (2009). Procesos Fundamentales Físico-Químicos y Microbiológicos Especialización y Maestría en Medio Ambiente Laboratorio de Química. F.R. Bahía Blanca – U.T.N.Disponible en: http://www.edutecne.utn.edu.ar/sem_fi_qui_microb_09/microbiologia_leche.pdf, consultado el 11 de diciembre de 2014.

CHANDRAPALA, J., OLIVER, C., KENTISH, S., ASHOKKUMAR, M., 2012. Ultrasonics in food processing. *Ultrasonics Sonochemistry* 19, 975–983.

CHEMAT, F.; HUMA, Z. y KHAN, M.K., (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. No. 18. p. 813 – 835.

CHEN, F., SUN, Y., ZHAO, G., LIAO, X., HU, X., WU, J., WANG, Z., 2007. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography mass-spectrometry. *Ultrasonics Sonochemistry* 14, 767–778.

CHEN, J.P., TAI, C.Y., (2007). Effects of different drying treatments on the stability of carotenoids in Taiwanese mango (*Mangifera indica* L.). *Food Chemistry* 100: 1005-1010.

CHEN, Z., ZHU, C., 2011. Combined effects of aqueous chlorine dioxide and ultrasonic treatments on postharvest storage quality of plum fruit (*Prunus salicina* L.). *Postharvest Biology and Technology* 61, 117–123.

CHOULIARA E., GEORGOGIANNI, K. G., KANELLOPOULOU, N., y KONTOMINAS, M.G. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry, *Innovative food Science & Emerging Technologies*, Volume 9, Issue 2, April 2008, Pages 161-169.

CICCOLINI, L., TAILLANDIER, P., WILHEM, A.M., DELMAS, H., STREHAIANO, P., 1997. Low frequency thermo-ultrasonication of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions: effect of temperature and of ultrasonic power. *Chem. Eng. J.* 65, 145–149.

CORREA, H. (2005). Código de Buenas Prácticas de Producción de Leche, Disponible en: http://minagri.gob.pe/portal/download/pdf/direccionesyoficinas/dgca/normatividad-lacteos/Colombia/Codigo_de_Buenas_Practicas_de_Produccion_de_Leche.pdf. Consultado el 5 de abril de 2015

COUPLAND, J.N. (2004). Low intensity ultrasound. *Food Research International*, 37: 537–543.

CRUZ R., VIEIRA M., SILVA C., (2008), Effect of heat and thermosonication treatments on peroxidase inactivation kinetics in watercress (*Nasturtium officinale*), *J. Food Eng.* 72 8–15.

D'AMICO, D.J., SILK, T.M., WU, J., GUO, M., 2006. Inactivation of microorganisms in milk and apple cider treated with ultrasound. *Journal of Food Protection* 69 (3), 556–563.

DOLATOWSKI, Z.; STADNIK, J., y STASIAK, D. (2007). Applications of ultrasound in food technology. *Acta Scientiarum Polonorum, Technology Alimentary*. Vol. 6, No. 3. p. 89 – 99.

DUCHAMP, P., CHRISTINE,, KUSZEWSKI, N., BALY, C., 3 - Olfactory perception and integration, Flavor, From Food to Behaviors, Wellbeing and Health Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition 2016, Pages 57-100.

DULCIERI C, GUZMAN E, ZALDIVAR N (2013) Parámetros físico-químicos de la leche cruda. *Revista de Producción Animal* 25(1) pág., 1-4.

EARNSHAW, R.G., 1998. Ultrasound a new opportunity for food preservation. In: Povey, M.J.W., Mason, T.J. (Eds.), *Ultrasound in Food Processing*. Blackie Academic Professional, London, UK, pp. 183–192.

ELIZQUIVEL, P., SANCHEZ, G., SELMA, M.V., AZNAR, R., 2012. Application of propidium monoazide-qPCR to evaluate the ultrasonic inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in fresh-cut vegetable wash water. *Food Microbiology* 30, 316–320.

FEDEGAN, <http://www.contextoganadero.com/economia/consumo-de-leche-aumento-en-colombia-durante-2014>, consultado 20 junio 2015.

FELLOWS, P., 2000. *Food Processing Technology: Principles and Practice*, 2nd ed. CRC Press, New York.

FENG, H., BARBOSA-CANOVAS, G., & WEISS, J. (2010). *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. (2011th Ed.). Springer, London, pp. 545–558.

FLINT, E. B., & SUSLICK, K. S. (1991). The temperature of cavitation. *Science*, 253(5026), 1397e1399. <http://dx.doi.org/10.1126/science.253.5026.1397>.

FRAZIER, W. (1993). *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza, España. Editorial ACRIBIA.

GARCÍA – PÉREZ, J.; CÁRCEL J.; BENEDITO P. y MULET A. (2007). Power ultrasound mass transfer enhancement in food drying. *Institution of Chemical Engineers*. Vol. 85, No. 3. p. 247 – 254.

GASTÉLUM, G.G., AVILA-SOSA, R., LÓPEZ-MALO, A., PALOU, E., 2012. *Listeria Innocua* Multi-Target Inactivation by Thermo-Sonication and Vanillin. *Food and Bioprocess Technology* 5(2), 665-671.

GHAEDIAN, R., DECKER, E.A., MCCLEMENTS, D.J. (1997). Use of ultrasound to determine cod fillet composition. *Journal of Food Engineering* 62: 500-504.

GIL y RUIZ, (2010) *Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*, capítulo 3.

GIL, M.I., SELMA, M.V., LOPEZ-GALVEZ, F., ALLENDE, A., 2009. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology* 134, 37–45.

GIL, M.L., ALLENDE, A., SELMA, M.V., 2011. Treatments to assure safety of fresh-cut fruits and vegetables. In: Martin-Belosa, O., Soliva-Fortuny, R. (Eds.), *Advances in Fresh-cut Fruit and Vegetables Processing*. CRC Press, USA, pp. 211–223.

GOGATE, P. R., & KABADI, A. M. (2009). A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 60-72.

GUERRERO, S. y ALZAMORA, S. (2004). El rol del ultrasonido en la preservación de alimentos. *La alimentación Latinoamericana*. No. 244. p. 18 – 21.

GUERRERO, S., LOPEZ-MALO, A., ALZAMORA, S.M., (2001). Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2, 31–39.

GUERRERO, S., LOPEZ-MALO, A., ALZAMORA, S.M., 2001. Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2, 31–39.

GUERRERO, S., TOGNON, M., ALZAMORA, S.M., 2005. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to the combined action of ultrasound and low weight chitosan. *Food Control* 16 (2), 131–139.

GUNASEKARAN, S., AY, C. (1996). Milk coagulation cut-time determination using ultrasonics. *Journal of Food Process Engineering* 19: 63-73.

HASSAN, A. N. y FRANK, J. F. (2002). microorganisms associated with milk. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Pages 447–457.

HEER G. E. (2007). *MICROBIOLOGIA DE LA LECHE*. Facultad de Ciencias Veterinarias – UNL. Cátedra de Tecnología de la leche, pag 14-18.

HERRERO A. y ROMERO DE ÁVILA M. (2006). Innovaciones en el procesado de alimentos: tecnologías no térmicas. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*. Vol. 50, No. 4. p. 71 – 74.

HOOVER, D.G. (2001).Ultrasound. *Journal of Food Science, Supplement Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies*, 93-95.

HU, H., WU, J., LI-CHAN, E. C. Y., ZHU, L., ZHANG, F., XU, X., (2013). Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. *Food Hydrocolloids*.

HUANG, T., XU, C., WALKER, K., WEST, P., ZHANG, S., WEESE, J., 2006. Decontamination efficacy of combined chlorine dioxide with ultrasonication on apples and lettuce. *Journal of Food Science* 71 (4), 134–139.

IIDA Y., TUZIUTI, T., YASUI, K., KOZUKA, T., TOWATA, A., 2008. Protein release from yeast cells as an evaluation method of physical effects in ultrasonic field. *Ultrason. Sonochem.* 15, 995–1000.

INCE, N., BELEN, R. (2001). Aqueous phase disinfection with power ultrasound: process kinetics and effect of solid catalysts. *Environmental Science and Technology*, 35

JANG, J.H., MOON, K.D., Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activities on fresh-cut apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid, *Food Chem.* 124 (2011) 444–449.

JAVANAUD, C. (1988). Applications of ultrasound to food systems. *Ultrasonics* 26:117-123.

JAY, J. (2009). *Microbiología moderna de los alimentos*. Tercera edición. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España.

KADKHODAEI, R., POVEY, M.J.W., 2008. Ultrasonic inactivation of *Bacillus* α -amylase I effect of gas content and emitting face of probe. *Ultrasonic Sonochemistry* 15, 133–142.

KARKI, B., LAMSAL, B. P., JUNG, S., VAN LEEUWEN, J. (HANS), POMETTO, A. L., III, GREWELL, D., (2010). Enhancing protein and sugar release from defatted soy flakes using ultrasound technology. *Journal of Food Engineering*, 96 (2) ,270 a 278

KEATING, P.F., 2002. *Introducción a la Tecnología de Alimentos* pag 141-170

KENTISH, S., ASHOKKUMAR, M., 2011. The physical and chemical effects of ultrasound. In: Feng, H., Barbosa-Cánovas, G.V., Weiss, J. (Eds.), *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Springer, London, pp. 1–12.

KHANAL, S., ANAND, S., MUTHUKUMARAPPAN, K., HUEGLI, M., Inactivation of thermophilic aerobic sporeformers in milk by ultrasonication, *Food Control*, Volume 37, March 2014, Pages 232-239.

KNIPS, V., (2014). Los países en desarrollo y el sector lechero mundial. Disponible en: http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/es/ppipi/docarc/execsumm_wp30.pdf Consultado 10 de abril de 2015

KNOERZER, K., R. BUCKOW, F.J. TRUJILLO AND P. JULIANO, 2015. Multiphysics simulation of innovative food processing technologies. *Food Eng. Rev.*, 7(2): 64- 81.

KNORR, D.; ZENKER, M.; HEINZ V. y LEE D. (2004). Applications and potential of ultrasonic in food processing. *Trends in food science and technology*. No. 15. p. 261 – 266.

KNORR, D., FROEHLING, A., JAEGER, H., REINEKE, K., SCHLUETER, O., SCHOESSLER, K., 2011. Emerging technologies in food processing. *Annual Review of Food Science and Technology* 2, 203–235.

KODA, S., MIYAMOTO, M., TOMA, M., MATSUOKA, T., MAEBAYASHI, M., 2009. Inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans* by ultrasound at 500 kHz. *Ultrason. Sonochem.* 16 (5), 655–659.

KRISE, K. M. (2011). The effects of microviscosity, bound water and protein mobility on the radiolysis and sonolysis of hen egg white (PhD Thesis).

KULDILOKE, J., 2002. Effect of Ultrasound, Temperature and Pressure Treatments on Enzyme Activity and Quality Indicators of Fruit and Vegetable Juices. (Ph.D. Thesis) Technische Universität Berlin.

KUTRUFF, H. (2012). *Ultrasonics. Fundamentals and applications*. Elsevier, Londres, Reino Unido. pag 395-404.

LAUTERNBORN, W., OHL, C.D., 1997. Cavitation bubbles dynamics. *Ultrasonics Sonochemistry* 4, 67–75.

LEE, D. U., HEINZ, V., Y KNORR, D. (2003). Effects of combination treatments of nisin and high-intensity ultrasound with pressure on the microbial inactivation in liquid whole egg. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4: 387-393.

LEE, J., KENTISH, S., ASHOKKUMAR, M., 2005. Effect of surfactants on the rate of growth of an air bubble by rectified diffusion. *The Journal of Physical Chemistry. B* 109 (30), 14595–14598.

LEE, H., ZHOU, B., LIANG, W., FENG, H., MARTIN, S. E., 2009. Inactivation of Escherichia Coli Cells with Sonication, Manosonication, Thermosonication, and Manothermosonication: Microbial Responses and Kinetics Modeling. *Journal of Food Engineering* 93(3), 354-364.

LEE, H., FENG, H., 2011. Effect of power ultrasound on food quality. In: Feng, H., Barbosa-Cánovas, G.V., Weiss, J. (Eds.), *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Springer, London, pp. 559–582.

LEISTNER, I., 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55, 181–186.

LEONG, T., JULIANO, P., JOHANSSONA L., MAWSON R., MCARTHUR S., MANASSEHA R., Temperature effects on the ultrasonic separation of fat from natural whole milk ,*Ultrasonics Sonochemistry*, Volume 21, Issue 6, November 2014, Pages 2092-2098.

LILLARD, H.S. (1994). Decontamination of poultry skin by sonication. *Food Technology* diciembre: 72-73.

LLULL, P., SIMAL, S., BENEDITO, J., ROSSELLÓ, C. (2002). Evaluation of textural properties of a meat-based product (sobrassada) using ultrasonic techniques. *Journal of Food Engineering* 53: 279-285.

LOPEZ-GOMEZ, P.S., PALOP, F.A., PERIAGO, P.M., MARTINEZ-LOPEZ, A., MARIN-INIESTA, F., BARBOSA-CANOVAS, G.V., 2009. Food safety engineering: an emergent perspective. *Food Engineering Review* 1, 84–104.

LÓPEZ-MALO, A., PALOU, E., JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, M., ALZAMORA, S.M., GUERRERO, S., 2005. Multifactorial fungal inactivation combining thermosonication and antimicrobials. *Journal of Food Engineering* 67 (1–2), 87–93.

MADALOU, A., MOUSAVI, ME., EMAM-DJOMEH,Z., EHSANI,M. y SHEEHAN,D., (2009). Sonodisrupción de micelas de caseína reemsambladas a diferentes valores de pH. *Ultrasonidos Sonochemistry*, 16(5) Pag 644-648

MAJID, I., AHMAD, G., NANDA, V., (2015). Ultrasonication and food technology: A review, cogen food & agriculture, volumen 1.

MAKINO, K., MOSSOBA, M.M., RIESZ, P., 1983. Chemical effects of ultrasound on aqueous solutions. Formation of hydroxyl radicals and hydrogen atoms. *Journal of Physical Chemistry* 87 (8), 1369–1377.

MANAS, P., PAGAN, R., 2005. Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1387–1399.

MARTINEZ. M, J.M. Pastor, et al, *Manual de medicina Física*, ed. Casanova, 1998, Pág. 17, 294-296.

MASON, T.; PANIWNYK, L. y LORIMER, J. (1991). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*. Vol. 3. p. 253 – 260.

MASON, T.J., CORDEMANS, E.D. (1996). Ultrasonic intensification of chemical processing and related operations: A review. *Trans IchemE*. 74: 511-516.

MASON, T.J., PANIWNYK, L., LORIMER, J.P. (1996b). The use of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry* 3: S253-S256.

MASON, T.J., LORIMER, J.P. (2002). *Applied sonochemistry. The uses of power ultrasound in chemistry and processing*. Wiley-VCH, Weinheim, Alemania.

MASON, T., F. CHEMAT AND M. ASHOKKUMAR, 2015. Power ultrasonic for food processing. *Appl. HighIntensity Ultras.*, 27: 815-843

MAWSON, R.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M.; UDABAGE, S. y GOLDING, M. (2008). Membrane and other processing technologies for dairy fluids: Effectiveness of ultrasound in enhancing productivity. *Symposium Dairy Foods: Emerging non-thermal food processing technologies – their potential in dairy systems. Journal of Animal Science*. Vol. 86. E-Suppl. Dairy Science. Vol. 91. [en línea]. [consultado 12 Ene. 2013]. Disponible en: <http://adsas.org/METINGS/2008/abstracts/0553.pdf>.

MCCLEMENTS, D.J. (1997). Ultrasonic characterization of food and drinks: Principles, methods and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 37: 1-46.

MCCLEMENTS, D.J., (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science and Technology* 6 (9), 293–299.

MESTRES L. J. A. (2004). *Productos lácteos. Tecnología* Universidad Politécnica de Catalunya. Zaragoza, España, pag 19-86.

MISRA, N.N., KOUBAA, M., ROOHINEJAD, S., JULIANO, P., ALPAS, H., INACIO, R.S., SARAIVA, J.A., AND BARBA, F.J., 2017. Landmarks in the historical development of twenty first century food processing technologies. *Food Res. Int.*, 97: 318-339

MIZRACH, A. (2004). Assessing plum fruit quality attributes with an ultrasonic method. *Food Research International* 37: 627-631.

MORATA B. A. *Nuevas Tecnologías de Conservación De Alimentos (2ª Edición)*, Antonio Madrid Vicente, Editor, 2011

MULET, A.; CÁRCEL J.; SANJUÁN, N. y BON, J. (2003). New food drying technologies – use of ultrasound. *Food Science and Technology International*. Vol. 9, No. 3. p. 215 – 221.

NASCIMENTO, L. C., LIMA, L. C. O., PICOLLI, R. H., FIORINI, J. E., DUARTE, S. M. S., SILVA, J. M. S. F., (2008). Ozônio e ultrassom: processos alternativos para o tratamento do café despolpado. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(2), 282e294.

NTC 399, 2002. *Raw Milk*. 4thEdn., National Institute of Technical Standards and Certification. ICONTEC.

O'DONNELL, C.P., TIWARI, B.K., BOURKE, P., CULLEN, P.J., 2010. Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science and Technology* 21 (7), 358–367.

ORDÓÑEZ, J.; CAMBERO, M.; FERNÁNDEZ, L.; GARCÍA, M.; HOZ, G. y SELGAS, M. (1998). *Tecnología de los alimentos. Volumen II, Alimentos de Origen Animal*. Editorial Síntesis. Madrid.

ORDÓÑEZ, J.A., AGUILERA, M.A., GARCÍA, M.L., SANZ, B. (1987). Effect of combined ultrasonic and heat treatment (Thermoultrasonication) on the survival of a strain of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Research* 54: 61-67.

PAGÁN, R., MAÑAS, P., ÁLVAREZ, I. Y CONDÓN, S. (1999). Resistance of *Listeria monocytogenes* to ultrasonic waves under pressure at sublethal (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures. *Food Microbiology*, 16: 139-148.

PAGÁN, R.; RASO, J.; ALVAREZ, I. y VIRTO, R. (2000). Inactivación microbiana por ultrasonidos: aplicaciones en la conservación de alimentos. *Alimentación, equipos y tecnología*. Vol. 19, No. 9. p. 77- 86.

PATIL, S., BOURKE, P., KELLY, B., FRÍAS, J. M., & CULLEN, P. J. (2009). The effects of acid adaptation on *Escherichia coli* inactivation using power ultrasound. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(4), 486e490.

PATIST, A. y BATES, D. (2008). Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. No. 9. p. 147 – 154.

PATIST, A., BATES, D., (2010). Industrial applications of high power ultrasonics. In: Feng, H., Barbosa-Canovas, G., Weiss, J. (Eds.), *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Springer, London, pp. 598–619.

PHULL, S.S., MASON, T.J., (1999). The use of ultrasound in microbiology. In: Mason, T.J. (Ed.), *Advances in Sonochemistry*, vol. 5. JAI Press, USA, p. 197.

PIYASENA, P., MOHAREB, E., MCKELLAR, R.C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology* 87 (3), 207–216.

POVEY, M.J.W. (1998). Rapid determination for food materials properties. En *Ultrasound in Food Processing*. Eds. Povey, M.J.W., Mason, T.J., Capman&Hall, Londres, Reino Unido.

QUAN, K., (2011). Novel application of power ultrasonic spray. In: Feng, H., Barbosa-Canovas, G., Weiss, J. (Eds.), *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Springer, London, pp. 535–544.

QUARTLY-WATSON, T. (1998). The importance of power ultrasound in cleaning and disinfection in the poultry industry-a case study. En *Ultrasound in Food Processing*. Eds. Povey, M.J.W., Mason, T.J., Chapman&Hall, Londres, Reino Unido.

RAJ, B., RAJENDRAN, V., PALANICHAMY, P. (2004). *Science and technology of ultrasonics*. Alpha Science International, Oxford, Reino Unido.

RAVENTOS S. M, (2005). *Industria alimentaria: tecnologías emergentes*, ediciones UPC

RAVIYAN, P., ZHANG, Z., & FENG, H. (2005). Ultrasonication for tomato pectinmethylesterase inactivation: effect of cavitation intensity and temperature on inactivation. *Journal of Food Engineering*, 70(2), 189e196.

RAY BIBEK, (2010) *MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS (4ª ED)*, MCGRAW HILL.

RIENER, J., NOCI, F., CRONIN, D. A., MORGAN, D. J., & LYNG, J. G. (2009). Characterisation of volatile compounds generated in milk by high intensity ultrasound. *International Dairy Journal*, 19(4), 269e272.

RIVERA, C.S., VENTURINI, M.E., ORIA, R., BLANCO, D., (2011). Selection of a decontamination treatment for fresh *Tuber aestivum* and *Tuber melanosporum* truffles packaged in modified atmospheres. *Food Control* 22 (3–4), 626–632.

RODRIGUEZ J., JUAREZ M., HERMAN E., MARTINEZ C., TORRUCO J., PAZ E., RAMIREZ E., *Ecosistemas y recursos agropecuaria*, vol.1 no.3 Villahermosa. 2014, Análisis sensorial descriptivo de algunas leches comerciales consumidas en Tuxtepec, Oaxaca, México.

SAGONG, H.G., LEE, S.Y., CHANG, P.S., HEU, S., RYU, S., CHOI, Y.J., (2011). Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *International Journal of Food Microbiology* 145 (1), 287–292.

SALA, F. J., J. BURGOS, S. CONDÓN, P. LÓPEZ Y J. RASO. (1995). “Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes”. En “New methods of food preservation”. Ed. G. W. Gould. Pág. 176-204.

SAMS, A.R., FERIA, R., (1991). Microbial effects of ultrasonication of broiler drumstick skin. *Journal of Food Science* 56 (1), 247–248.

SÃO JOSÉ, J.F.B., VANETTI, M.C.D., (2012). Effect of ultrasound and commercial sanitizers in removing natural contaminants and *Salmonella enterica* Typhimurium on cherry tomatoes. *Food Control* 24 (1–2), 95–99.

SAPERS, G.M., (2001). Efficacy of washing and sanitizing methods of disinfection of fresh fruit and vegetable products. *Food Technology and Biotechnology* 39 (4), 305–311.

SCHNEIDER, I., ZAHN, S., SCHINDLER, C., ROHM, H., Ultrasonic excitation affects friction interactions between food materials and cutting tools, *Ultrasonics*, Volume 49, Issues 6–7, June 2009, Pages 588-593.

SCHOUTETEN, J., DE STEUR H., DE PELSMAEKER, S., LAGAST, S., DE BOURDEAUDHUIJ, I., GELLYNCK, X., *Food Research International*, an integrated method for the emotional conceptualization and sensory characterization of food products: The EmoSensory® Wheel, Volume 78, December 2015, Pages 96-107.

SCOUTEN, A.J., BEUCHAT, L.R., (2002). Combined effects of chemical, heat and ultrasound treatments to kill *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. *Journal of Applied Microbiology* 92, 668–674.

SEYMOUR, I.J., BURFOOT, D., SMITH, R.L., COX, L.A., LOCKWOOD, A. (2002). Ultrasound decontamination of minimally processed fruits and vegetables. *International Journal of Food Science and Technology* 37: 547-557.

SHARMA, M., BEUCHAT, L.R., (2004). Sensitivity of *Escherichia Coli* O157:H7 to Commercially Available Alkaline Cleaners and Subsequent Resistance to Heat and Sanitizers. *Applied and Environmental Microbiology* 70(3), 1795-1803.

SIMAL, S., BENEDITO, J., CLEMENTE, G., FEMENÍA, A., ROSSELLÓ, C. (2003b). Ultrasonic determination of the composition of a meat-based product. *Journal of Food Engineering* 58: 253-257.

SORIA, A. C., & VILLAMIEL, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(7), 323–331.

SCHÖSSLER, K., H. JÄGER, C. BÜCHNER, S. STRUCK AND D. KNORR, 2014. Non-Thermal Processing Ultrasonication. 2nd Edn. Reference Module in Food Science: From Encyclopedia of Food Microbiology, pp: 985-989

SPREER, EDGAR, 1991, Lactologia industrial, Editorial acribia, pag 345-360

SUSLICK, K.S., (1989). The chemical effects of ultrasound. Scientific American 80–87.

SUSLICK, K.S., (1998). Sonochemistry, 4th ed. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, vol. 26. J. Wiley Sons, New York, pp. 517–541.

RODRIGUEZ-CATURLA, M.Y., VALERO DÍAZ, A., VALLEJO, J.L.R., GARCÍA-GIMENO, R.M., COSANO, G.Z., (2012). Effect of Pre-Incubation Conditions on Growth and Survival of *Staphylococcus Aureus* in Sliced Cooked Chicken Breast. Meat Science 92(4), 409-416.

RODRIGUEZ J., JUAREZ M., HERMAN E., MARTINEZ C., TORRUCO J., PAZ E., RAMIREZ E., Ecosistemas y recursos agropecuaria, vol.1 no.3 Villahermosa. 2014, Análisis sensorial descriptivo de algunas leches comerciales consumidas en Tuxtepec, Oaxaca, México.

TEOREMA. (2009). Conservación de alimentos, un reto constante. Revista Teorema Ambiental. Editorial 3W. México. [En línea]. [Consultado 15 ene. 2009]. Disponible en <http://www.teorema.com.mx/articulos.php?id_sec=52&art=210&id_ejemplar=79>.

TEREFE, N.S, GAMAGE, N., VILKHU, K., SIMONS, L., MAWSON, R., VERSTEEG, V., (2009). The kinetics of inactivation of pectin methylesterase and polygalacturonase in tomato juice by thermosonication, Food Chem. 117, 20–27.

THAKUR, B.R., SINGH, R.K., NELSON, P.E., Quality attributes of processed tomato products: a review, Food Rev. Int. 12 (1996) 375–401.

TIWARI, B.K., MASON, T.J., (2012). Ultrasound processing of fluid foods. In: Cullen, P.J., Tiwari, Brijesh K., Valdramidis, Vasilis P. (Eds.), Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods. Academic Press, London, pp. 135–167.

TORLEY, P. y BHANDARI, B. (2007). Ultrasound in food processing and preservation. Handbook of Food Preservation. 2da Edición. Editor Shafiur Rahman. p. 730 – 732.

TSUKAMOTO, I., CONSTANTINOIU, E., FURUTA, M., NISHIMURA, R., MAEDA, Y., (2004). Inactivation effect of sonication and chlorination on *Saccharomyces cerevisiae*. *Calorimetric Analysis. Ultrason. Sonochem.* 11 (3–4), 167–172.

UGARTE-ROMERO, E., FENG, H., MARTIN, S. E., CADWALLADER, K. R., & ROBINSON, S. J. (2006). Inactivation of *Escherichia coli* with power ultrasound in apple cider. *Journal of Food Science*, 71(2), E102eE108. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb08890.x>

UGARTE-ROMERO, E., FENG, H., MARTIN, S.E., (2007). Inactivation of *Shigella Boydii* 18 IDPH and *Listeria Monocytogenes* Scott a with Power Ultrasound at Different Acoustic Energy Densities and Temperatures. *Journal of Food Science* 72(4), M103-M107.

VALERO, M., RECROSIO, N., SAURA, D., MUÑOZ, N., MARTY, N., & LIZAMA, V. (2007). Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing. *Journal of Food Engineering*, 80(2), 509e516.

VERCET, A., LOPEZ, P., BURGOS, J. inactivation of heat resistant pectinmethylesterase from orange by manothermosonication, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 432–437.

VERCET, A., BURGOS, J., y LOPEZ-BUESA, P. (2001). Manothermosonication of foods and food-resembling systems: effect on nutrient content and non-enzymatic browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 483-489.

VERCET, A., SÁNCHEZ, C., BURGOS, J., MONTAÑÉS, L., LÓPEZ, P. (2002). The effects of manothermosonication on tomato pectic enzymes and tomato paste rheological properties. *Journal of Food Engineering* 53: 273-278.

VIJAYAKUMAR, S., GREWELL, D., ANNANDARAJAH, C., BENNER, L., CLARK, S., Quality characteristics and plasmin activity of thermosonicated skim milk and cream, *Journal of Dairy Science*, Volume 98, Issue 10, October 2015, Pages 6678-6691.

VILLAMIEL, M. (2006). Aplicación de ultrasonidos en alimentos. *Revista Consumer Eroski*. [En línea] [Consultado 12 abril 2013]. Disponible en: <http://www.consumer.es/seguridadalimentaria/cienciaytecnología/2006/05/10/23462.Php>.

VILLAMIEL, M., Y DE JONG, P. (2000). Influence of High-Intensity Ultrasound and Heat Treatment in Continuous Flow on Fat, Proteins, and Native Enzymes of Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 472-478.

WALKLING-RIBEIRO, M., NOCI, F., RIENER, J., CRONIN, D.A., LYNG, J.G., MORGAN, D.J., (2009). The Impact of Thermosonication and Pulsed Electric Fields on *Staphylococcus Aureus* Inactivation and Selected Quality Parameters in Orange Juice. *Food and Bioprocess Technology* 2(4), 422- 430.

WALSTRA, P. (2003). *Physical chemistry of foods* (pp. 397e436). New York, NY, USA: Marcel Dekker Incorporated.

WANG, X., CHEN, J., Reference Module in Food Science, Food Sensory Perception Influenced by Structure and/or Food–Saliva Interactions, 2018.

WANG, Y., HU, Y., WANG, J., LIU, Z., YANG, G., GENG, G., (2011). Ultrasound-assisted solvent extraction of swainsonine from *Oxytropis ochrocephala* Bunge. *J. Med. Plant Res.* 5 (6), 890–894.

WEISS, J., GULSEREN, I., KJARTANSSON, G., (2011). Physicochemical effects of high intensity ultrasonication on food proteins and carbohydrates, *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*, Pag 239-285.

WRIGLEY, D., & LLORCA, N. (1992). Decrease of *Salmonella typhimurium* in skim milk and egg by heat and ultrasonic wave treatment. *Journal of food protection (USA)*, 55, 678–680.

Wu, T., X. Yu, A. Hu, L. Zhang, Y. Jin and M. Abid, 2015. Ultrasonic disruption of yeast cells: Underlying mechanism and effects of processing parameters. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 28: 59-65.

YOUNG, D.Y., FREDD, R.A., FORD, L., 2009, *Fisica universitaria* volume 1, pag 487-527

ZELA S/N JESÚS MARÍA, (2005). *Aspectos Nutricionales Y Tecnológicos De La Leche*, Cap 2; pag 11 a 21.

ZENKER, M., HEINZ, V., & KNORR, D. (2003). Application of ultrasound-assisted thermal processing for preservation and quality retention of liquid foods. *Journal of Food Protection*, 66(9), 1642e1649.

ZHAO, B., BASIR, O.A., MITTAL, G.S., Consumer perceptions of foods processed by innovative and emerging technologies: A conjoint analytic study innovative food Science & Emerging Technologies, Volume 8, Issue 1, March 2007, Pages 73-83.

ZHOU, B., FENG, H., LUO, Y., (2009). Ultrasound enhanced sanitizer efficacy in reduction of Escherichia coli O157:H7 population on spinach leaves. Journal of Food Science 74 (6), 308–313.

8. ANEXOS

ANEXO 1

FORMATO EVALUACIÓN DE LA INTENSIDAD DE ATRIBUTOS EN CREMA DE LECHE CRUDA

FORMATO EVALUACIÓN INTENSIDAD DE ATRIBUTOS											
INTENSIDAD	VALORACIÓN DE LA ESCALA										
ATRIBUTOS A EVALUAR	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OLOR											
CREMA FRESCA											
ACIDO LACTICO											
RANCIDEZ											
SABOR											
CARACTERISTICO CREMA LECHE FRESCA											
ACIDO LACTICO LEVE											
ACIDO LACTICO INTENSO											
RANCIDEZ											
COLOR											
CREMA CLARO											
CREMA MEDIO											
CREMA INTENSO											
AMARILLO											
TEXTURA											
LIQUIDA											
POCO FLUIDA											
VISCOSA											
DURA											

VALORACIÓN	ESCALA INTERPRETACIÓN
0	NINGUNA PERCEPCIÓN
1 A 3	POCA INTENSIDAD DEL ATRIBUTO EVALUADO
4 A 6	SE PERCIBE EN CIERTO GRADO EL ATRIBUTO EVALUADO
7 A 10	EL ATRIBUTO SE PERCIBE INTENSAMENTE

COMENTARIOS:

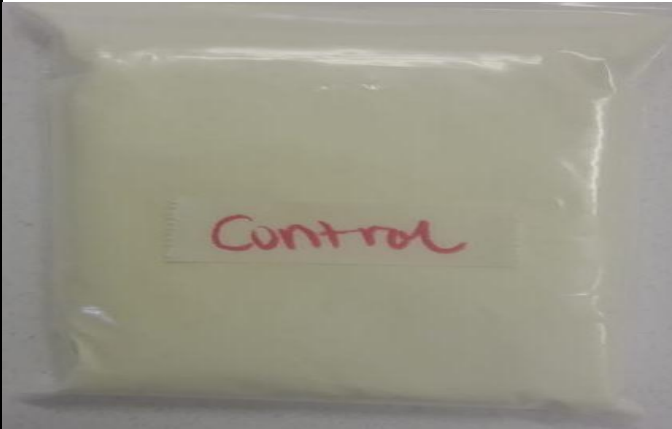
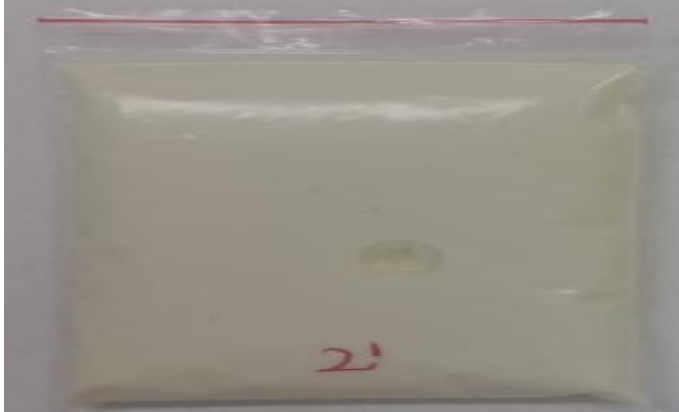

ANEXO 2.

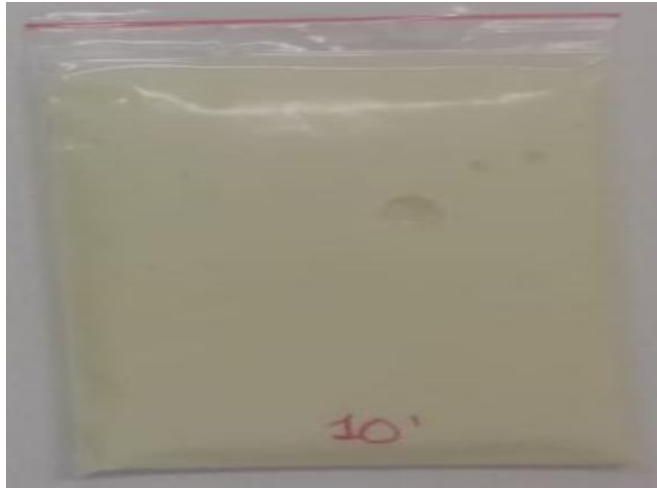
FORMATO PERCEPCIÓN SENSORIAL GLOBAL DE LA CREMA DE LECHE
PRUEBA HEDONICA

NOMBRE: _____		FECHA: _____	
NOMBRE DEL PRODUCTO: _____			
Frente a usted hay tres (3) muestras codificadas de crema de leche las cuales fueron sometidas a 37 KHz , temperatura de 30°C, por 2(A) ,5(B) y 10 (C) minutos, y almacenada por 10 días a temperatura de refrigeración . Se deben tener para los criterios de selección su sabor, color y olor, cada muestra se debe probar una a la vez y marque con una X su juicio según su preferencia.			
ESCALA	MUESTRAS		
	(A)	(B)	(C)
1. ME GUSTA MUCHO			
2. ME GUSTA			
3. NI ME GUSTA NI ME DISGUSTA			
4. ME DISGUSTA			
5. ME DISGUSTA MUCHO			
COMENTARIOS:			

ANEXO 3.

INTENSIDAD DE COLOR DE LA CREMA DE LECHE SIN TRATAR Y TRATADA

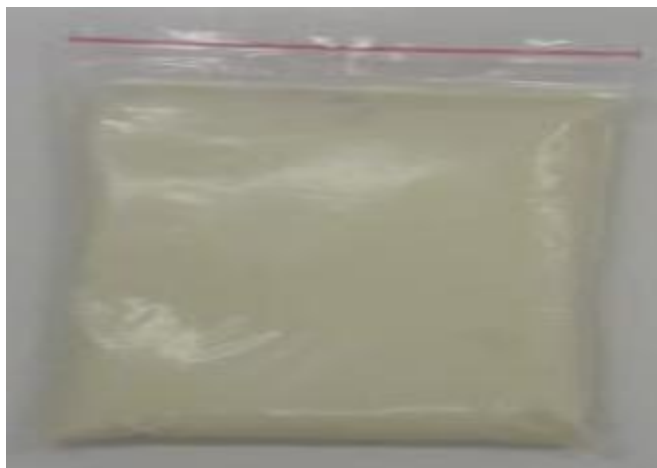
CREMA TRATADA CON ULTRASONIDO - COLOR

Crema sin tratamiento (control)

Crema tratada a 30°C/2 minutos

Crema tratada a 30°C/5 minutos



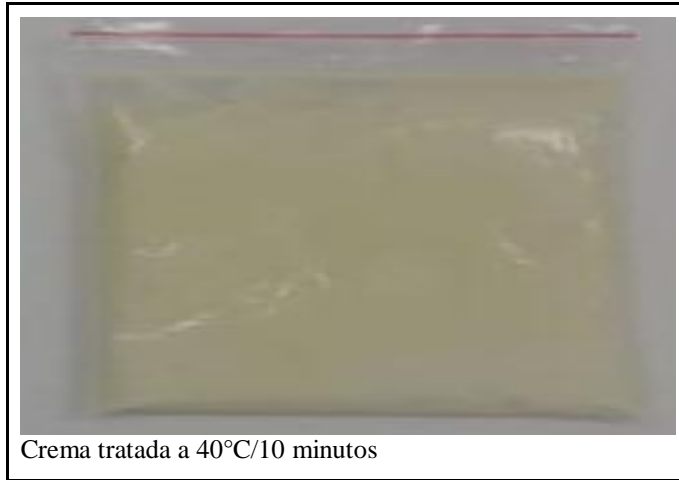
Crema tratada a 30°C/10 minutos



Crema tratada a 40°C/2 minutos



Crema tratada a 40°C/5 minutos



Crema tratada a 40°C/10 minutos

Fuente, Pino, A., 2017.

ANEXO 4

EVIDENCIAS FOTOGRÁFICAS DE LA EVALUACION SENSORIAL DE LA CREMA





Fuente, Pino, A., 2017.

Anexo 5

EVIDENCIAS FOTOGRAFICAS DE LOS RECUENTOS MICROBIOLÓGICOS DE LA CREMA DE LECHE

Recolección de las muestras de crema de leche



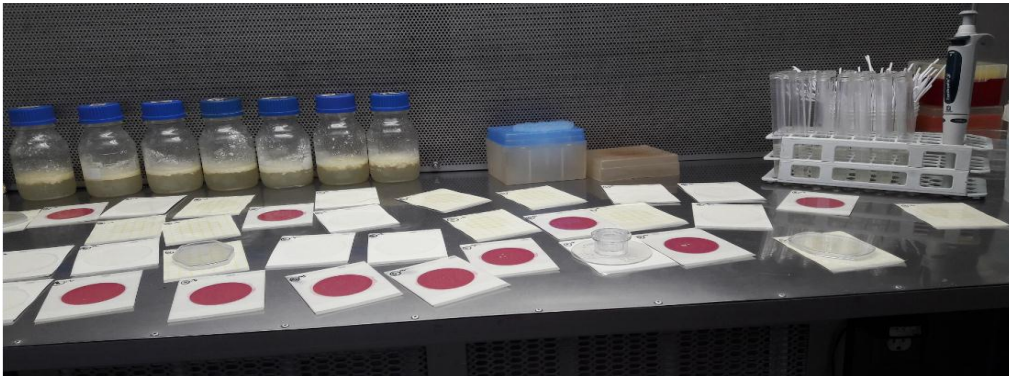
Tratamiento de la crema de leche en baño ultrasónico



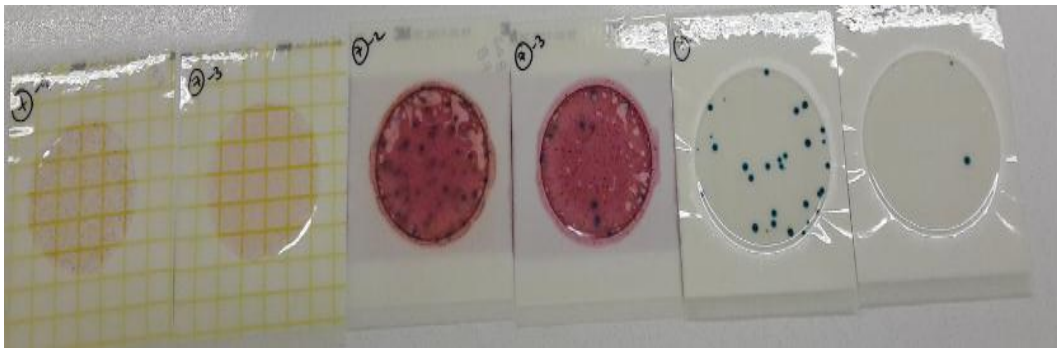
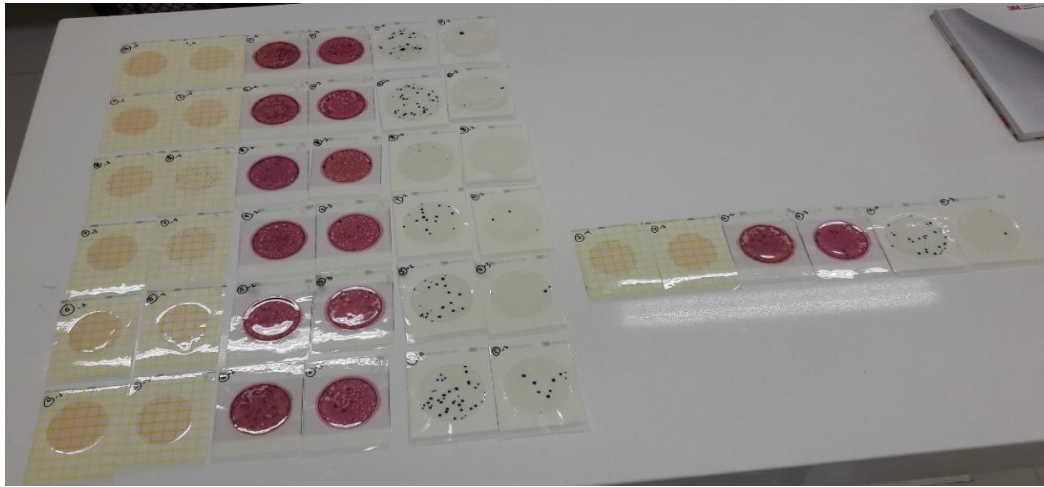
Crema de leche tratada en 37 HZ y 40°C por 10 minutos



Siembra microbiológica de las muestras de crema de leche



Resultados microbiológicos muestras crema de leche



Fuente, Pino, A., 2017.

Anexo. 6

ESCALA HEDÓNICA DE LA CREMA DE LECHE TRATADA EVALUADA POR LOS PANELISTAS PARA LA CREMA TRATADA

Crema tratada a 30°C

Panelista	A (2 minutos)	B (5 minutos)	C (10 minutos)
1	Tiene buen color, aunque la acidez se siente un poco marcada	Me gusta tiene un sabor a mantequilla muy ligero agradable	tiene un color amarillo no muy usual para la crema de leche, su textura es arenosa y no es muy suave
2	Tiene sabor a yogurth, no me agrada mucho	Sabor agradable, buena textura y olor suave	sabor y olor agradable
3	El sabor del ácido láctico es agradable, y el color es muy natural	Tiene un color apetitoso y agradable	Tiene un color intenso , y agradable aunque la textura un poco arenosa
4	Me gusta mucho tiene un sabor agradable y suave	Tiene un color apetitoso y agradable, textura suave	color agradable y buena textura y buen sabor
5	Me gusta tiene un sabor a suero costeño su textura es suave	sabe bien y es cremosa	sabe bien y presenta un rico olor a mantequilla
6	Tiene un sabor a mantequillas agradable y es muy cremosa	tiene un color agradable	su textura es granular, el sabor es muy rico y su olor es agradable
7	Tiene una textura muy suave y el color es muy parecido a la muestra control	su textura es buena , y el color es agradable	no me gusta su textura, pero tiene buen sabor y olor
8	Es suave y cremosa	el olor es muy rico y es suave	no me gusta su color no es el tipico de la crema de la empresa, su olor es agradable pero su textura es arenosa
9	Me gusta tiene un sabor agradable y suave	es apetitosa y suave	sabe bien y es cremosa
10	Buen color, olor y textura	Buen color , olor y maneja una textura agradable	textura arenosa

Crema Tratada a 40°

Panelista	A (2 minutos)	B (5 minutos)	C (10 minutos)
1	Tiene buen color, y sabor	sabe bien y tiene un olor agradable	presenta una coloración atípica para la crema de leche sobre todo para postres, no me gusta
2	buen sabor y olor , textura agradable	Sabor agradable, buena textura y olor suave	sabor y olor agradable, el color es intenso y la textura es no característica
3	El sabor del ácido láctico es agradable, y el color típico	Es agradable y tiene buena textura	Textura arenosa, color no usual para el producto
4	Me gusta mucho tiene un sabor agradable y es suave al entrar en la boca	Tiene un color y sabor agradable, textura muy suave	color agradable y buena textura y buen sabor
5	Es suave, presenta buenas características organolépticas	El color está intenso pero el sabor es agradable	el sabor es agradable pero su textura no
6	Tiene un sabor a agradable y es cremosa	tiene un color y sabor agradable, pero la textura no es suave	no me gusta el color no es parejo y la textura no es la típica
7	Su textura es buena , y el color es agradable	Su textura es buena , y el color es agradable	no me gusta su textura, pero tiene buen sabor y olor
8	Es suave, cremosa , presenta buen sabor	el olor es muy agradable	textura no usual en crema de leche
9	Me gusta tiene un sabor agradable y suave	es apetitosa y suave	sabe bien pero el color no es agradable
10	Buen color, olor , suave y apetitosa	Buen color , olor y maneja una textura agradable	no me gusta la textura granular y el color no es el típico

Fuente, Pino, A., 2017.