

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO DEL PELADO Y EL TROCEADO SOBRE LA EFICACIA
DEL CLORO COMO DESINFECTANTE EN
LECHUGA, PAPA Y ZANAHORIA

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de
Posgrado en Ciencia de Alimentos para optar por el grado y título
de Maestría Académica en Ciencia de Alimentos

GABRIELA DAVIDOVICH YOUNG

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

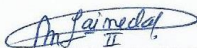
2021

DEDICATORIA

A Sara y Max:

mi luz de cada día,
mi inspiración,
mi razón de ser...

"Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencia de Alimentos."



Dra. Maria Lourdes Pineda Castro, M.Sc.
**Representante de la Decana
Sistema de Estudios de Posgrado**



Ph.D. Eric Wong González
Profesor Guía



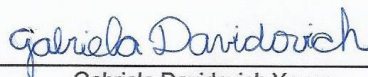
M.Sc. Marta Bustamante Mora
Lectora



M.Sc. Ruth De la Asunción Romero
Lectora



Ph.D. Marianela Cortés Muñoz
**Representante de la Directora
Programa de Posgrado en Ciencia de Alimentos**



Gabriela Davidovich Young
Sustentante

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
HOJA DE APROBACIÓN	iii
RESUMEN	vii
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 JUSTIFICACIÓN.....	1
1.2 OBJETIVOS.....	9
1.2.1 Objetivo general.....	9
1.2.2 Objetivos específicos.....	9
2. MARCO TEÓRICO	10
2.1 VEGETALES MÍNIMAMENTE PROCESADOS.....	10
2.1.1 Generalidades.....	10
2.1.2 Consumo en Costa Rica	10
2.1.3 Lechuga	11
2.1.4 Papa	13
2.1.5 Zanahoria.....	14
2.1.6 Operaciones de pelado, troceado y rallado de vegetales.....	15
2.1.7 Microbiología asociada con vegetales mínimamente procesados	18
2.1.8 Desinfección de vegetales mínimamente procesados	20
2.2 EL CLORO COMO DESINFECTANTE	22
2.2.1 Generalidades.....	23
2.2.2 Propiedades antimicrobianas del cloro	23
2.2.3 Cloro residual.....	25
2.2.4 Productos peligrosos asociados con el cloro	26
2.2.5 Factores que afectan la actividad del cloro	27
2.2.5.1 pH del agua.....	27
2.2.5.2 Concentración de cloro utilizada.....	28
2.2.5.3 Tiempo de exposición.....	28
2.2.5.4 Cantidad de materia orgánica.....	29
2.2.5.5 Temperatura	30
2.2.6 Métodos para medir cloro	31

2.3 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL PROCESO DE DESINFECCIÓN CON CLORO	32
2.3.1 Análisis microbiológicos	33
2.3.2 Análisis químicos.....	34
2.3.3 Análisis sensoriales.....	35
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
3.1 Localización:.....	38
3.2 Muestras.....	38
3.3 Preparación de los vegetales.....	38
3.4 Preparación de las disoluciones de cloro	39
3.5 Inoculación de los vegetales	40
3.5.1 Preparación del inóculo	40
3.5.2 Procedimiento de inoculación.....	40
3.6 Estudio del efecto del pelado y el troceado del vegetal sobre la concentración de cloro en el tiempo, en la disolución desinfectante	41
3.6.1 Diseño experimental	41
3.6.2 Análisis de resultados	43
3.7 Estudio del efecto del pelado y el troceado del vegetal sobre la reducción de <i>E. coli</i> durante su desinfección con cloro	43
3.7.1 Diseño experimental	43
3.7.2 Análisis de resultados	44
3.8 Estudio del efecto del pelado y el troceado del vegetal sobre el residual de cloro en el producto después de su desinfección	45
3.8.1 Diseño experimental	45
3.8.2 Análisis de resultados	45
3.9 Estudio del efecto del pelado y el troceado del vegetal sobre sus características sensoriales después de su desinfección con cloro	46
3.9.1 Diseño experimental	46
3.9.2 Análisis de resultados	46
3.10 Métodos de análisis.....	47
3.10.1 Medición de cloro total y residual	47
3.10.2 Reducción de <i>E. coli</i>	47
3.10.3 Prueba Triangular de Diferencia.....	48
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1. Determinación del efecto del pelado y el troceado del vegetal sobre la concentración de cloro, en el tiempo, en la disolución desinfectante	49

4.2	Determinación del efecto del pelado y el troceado sobre la reducción de <i>E. coli</i> durante la desinfección con cloro en los vegetales	55
4.3	Determinación del efecto del pelado y el troceado sobre el remanente de cloro en el vegetal desinfectado.....	63
4.4	Determinación del efecto del pelado y el troceado sobre las características sensoriales del vegetal desinfectado con cloro	66
5.1	Conclusiones	71
5.2	Recomendaciones	72
6.	REFERENCIAS	73
	Anexo 1. Tabla estadística utilizada para la Prueba Triangular de Diferencia de acuerdo con el procedimiento del CITA.....	86

RESUMEN

El consumo de alimentos vegetales ha ido en aumento en los últimos años y las empresas han buscado desarrollar productos novedosos y atractivos para el consumidor. La finalidad de este proyecto fue determinar el efecto del pelado y el troceado sobre la eficacia del cloro como desinfectante en lechuga, zanahoria y papa. Se estudiaron vegetales que se consumen regularmente en la dieta del costarricense en diferentes presentaciones (enteros, troceados o rallados) y se abordaron de forma integral los aspectos más relevantes relacionados con su desinfección con cloro, como lo son el aspecto microbiológico, el aspecto sensorial asociado y el aspecto químico (comportamiento de la disolución de cloro en el tiempo y residual de cloro que permanece en el vegetal).

Se evaluó el efecto del pelado y el troceado del vegetal sobre la concentración de cloro total en el tiempo, en la disolución desinfectante. Para esto, se desinfectaron los vegetales en sus diferentes presentaciones en una disolución con cloro a 200 ppm y se evaluó su concentración cada 5 minutos, durante 30 minutos. Los resultados del análisis de varianza indicaron que las concentraciones de cloro en la disolución desinfectante a los 30 minutos, en las que se desinfectaron la papa y la zanahoria ralladas, son menores que la concentración de cloro del control en este mismo tiempo. La lechuga entera y troceada, así como la papa y zanahoria entera, pelada y troceada, mostraron el mismo comportamiento que el control en el tiempo analizado.

Se determinó la reducción de *E. coli* después de 5 y 30 minutos de contacto con la disolución desinfectante de cloro a 200 ppm. De acuerdo con el análisis de varianza, no hay interacciones significativas para el caso de la lechuga y de la zanahoria, por lo que las reducciones observadas de *E. coli* no dependen del tiempo de desinfección y no hay diferencia en la reducción de *E. coli* cuando la lechuga y la zanahoria se desinfectan enteras o troceadas. Se observó en ambos casos, que el cloro como efecto simple sí tiene un efecto significativo sobre la desinfección de lechuga y zanahoria, lo que indica que hay mayores reducciones cuando se utiliza cloro en la disolución desinfectante, que cuando se utiliza una inmersión en agua. En el análisis correspondiente a la papa, se encontró que la interacción entre el factor cloro y el factor presentación de vegetal era significativa. Se realizó un nuevo análisis de datos, sin considerar el tiempo de desinfección (por no tener efecto significativo) y se detectó que desinfectar papa rallada con cloro ejerció reducciones de *E. coli* mayores que la inmersión en agua de este vegetal, con valores significativamente diferentes entre sí.

Se evaluó el efecto del pelado y el troceado del vegetal sobre su remanente de cloro después de la desinfección en disoluciones de cloro a 200 ppm durante 30 minutos. En el caso de la lechuga, se encontró diferencia significativa entre la concentración de cloro remanente en la lechuga entera y en la lechuga troceada después de la desinfección. Para el caso de la papa, no se detectó diferencia significativa en la concentración de cloro en las diferentes presentaciones de papa y para el caso de la zanahoria, se encontró diferencia significativa en la concentración de la zanahoria rallada con respecto a las demás presentaciones de zanahoria desinfectada.

Por último, se realizó un análisis sensorial (prueba triangular de diferencia), con panelistas entrenados, donde se evaluó si había diferencia en la percepción de los panelistas al probar el vegetal en sus diferentes presentaciones al desinfectarlo durante 30 minutos en una disolución de cloro a 200 ppm, en comparación con el mismo vegetal colocado por inmersión en agua potable durante el mismo tiempo. El análisis de resultados indica que los jueces entrenados encontraron diferencias en la lechuga entera desinfectada, en la papa pelada y en la papa rallada al compararla con estas presentaciones del vegetal inmersos en agua potable. Esto permite concluir que el tratamiento de desinfección con cloro puede afectar las características sensoriales del producto al prepararlo como habitualmente se hace para su consumo.

Los resultados de este proyecto de investigación son de gran utilidad para la industria ya que permiten conocer en qué circunstancias el cloro puede utilizarse para la desinfección de vegetales similares a los de este proyecto, realizando desinfecciones efectivas sin afectar su aceptación en el mercado.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Características de medición del clorímetro Chlorosense	32
Cuadro 2. Arreglo factorial utilizado en el estudio del efecto del pelado y el troceado del vegetal sobre la concentración de cloro en la disolución desinfectante	42
Cuadro 3. Tratamientos utilizados en el estudio del efecto del pelado y el troceado del vegetal sobre la reducción de <i>E. coli</i> durante su desinfección con cloro	44
Cuadro 4. Resultado de la prueba de Tukey para la evaluación del efecto del pelado y el troceado de la lechuga, papa y zanahoria sobre la concentración de cloro, en la disolución desinfectante, a 30 minutos de desinfección	52
Cuadro 5. Reducciones logarítmicas promedio (log ₁₀ UFC/g) de <i>E. coli</i> según presentación de la lechuga, presencia de cloro en la disolución (inicial 200 ppm) y tiempo de contacto con la disolución desinfectante	56
Cuadro 6. Reducciones logarítmicas promedio (log ₁₀ UFC/g) de <i>E. coli</i> según presentación de la papa, presencia de cloro en la disolución (inicial 200 ppm) y tiempo de contacto con la disolución desinfectante	57
Cuadro 7. Reducciones logarítmicas promedio (log ₁₀ UFC/g) de <i>E. coli</i> según presentación de la papa y presencia de cloro en la disolución (inicial 200 ppm)	58
Cuadro 8. Reducciones logarítmicas promedio (log ₁₀ UFC/g) de <i>E. coli</i> según presentación de la zanahoria, presencia de cloro en la disolución (inicial 200 ppm) y tiempo de contacto con la disolución desinfectante	59
Cuadro 9. Resultados de la evaluación de la concentración de cloro residual en el vegetal después de la desinfección con cloro a 200 ppm durante 30 minutos	64
Cuadro 10. Resultados de la prueba triangular de diferencia para las presentaciones del vegetal desinfectados durante 30 minutos en una disolución de cloro a 200 ppm o lavados en agua potable durante el mismo tiempo	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentración de cloro en la disolución desinfectante de diferentes presentaciones de lechuga evaluada cada 5 minutos, durante 30 minutos	50
Figura 2. Concentración de cloro en la disolución desinfectante de diferentes presentaciones de papa evaluada cada 5 minutos, durante 30 minutos	51
Figura 3. Concentración de cloro en la disolución desinfectante de diferentes presentaciones de zanahoria evaluada cada 5 minutos, durante 30 minutos	51

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: grados Celsius

cm: centímetro

g: gramo

kg: kilogramo

L: litro

log: logaritmo

min: minuto

mg: miligramo

mm: milímetro

mL: mililitro

ppm: partes por millón

µg: microgramo

UFC: unidades formadoras de colonias

s: segundo

var: variedad



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Gabriela Davidovich Young, con cédula de identidad 1-1060-0009, en mi condición de autor del TFG titulado Efecto del pelado y el troceado sobre la eficacia del cloro como desinfectante en lechuga, papa y zanahoria.

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI ☒ NO * ☐

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

Gabriela Davidovich

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 JUSTIFICACIÓN

Es claro que el consumo de alimentos vegetales ha ido en aumento en los últimos años, principalmente debido a su contenido de sustancias beneficiosas para la salud. Estudios han demostrado que el consumo de 3 a 5 porciones (375 a 500 gramos) de frutas o vegetales por día disminuye el riesgo de infarto del corazón de tipo isquémico y de tipo hemorrágico, otras enfermedades coronarias y la muerte a causa de estas afecciones (He *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2017; Zhan *et al.*, 2007). El consumo de frutas y vegetales se relaciona inversamente con la incidencia de depresión clínica (Liu *et al.*, 2016) y, también, se relaciona con menor probabilidad de presentar obesidad y de enfermar por diabetes (Lin y Mentzer-Morrison, 2002; Wu *et al.*, 2015; Cosby *et al.*, 2016; Jahns-James y Roemmick, 2016). Esto ha causado que los consumidores busquen más estos productos y los incorporen a su dieta. Por otro lado, las empresas han buscado desarrollar productos novedosos y atractivos para el consumidor incorporando vegetales en sus formulaciones (Artés *et al.*, 2009).

En el mercado se pueden encontrar los llamados “vegetales frescos” pero también cada día se encuentran, en mayor cantidad, los vegetales denominados “vegetales mínimamente procesados”, que son productos a los que se ha aplicado algún proceso corto o de poca magnitud para alargar su vida útil o facilitar su preparación por el consumidor final, al encontrarse “pre-preparados”, sin afectar su calidad de frescura. Los vegetales mínimamente procesados incluyen desde vegetales “recortados”, como cuando se separan las hojas exteriores de las lechugas, hasta otros con procesos más complicados como el pelado, el troceado, el rallado, el lavado, la desinfección y los tratamientos con antioxidantes (Francis *et al.*, 1999; Garande y Patil, 2014).

El mercado de vegetales mínimamente procesados creció exponencialmente desde sus inicios en los años ochenta. La demanda del consumidor por productos “listos para comer” o “semi preparados” es la que ha causado este fenómeno. Un ejemplo de lo anterior es el aumento en el consumo de hortalizas en Europa. Se realizó un estudio que indica que un 51,4% de las personas consumen entre 1 y 4 porciones diarias y un 14,2% consume 5 o más porciones al día. En comparación con las frutas, las hortalizas presentan una mayor frecuencia de consumo. Además, se espera que este mercado continúe su crecimiento a través de los años (Eurostat, 2019).

Por otro lado, en Europa se ha estimado un crecimiento del 30% en la producción de frutas y vegetales entre los años 2008 y 2018, siendo el 60% de esta producción asociada con vegetales y el restante 40% se atribuye a frutas. Esto representa económicamente un ingreso anual de 57 billones de euros. Los vegetales que se cultivan en mayor proporción son el tomate,

la cebolla y la zanahoria (Rossi, 2019). En Estados Unidos, la agricultura contribuye a la economía del país en más de 100 billones de dólares anuales, con más de 2 millones de establecimientos destinados a este fin en todo el país. Se ha observado un incremento del doble de las ventas en productos agrícolas entre los años 2012 y 2019, así como un mayor consumo de frutas y vegetales entre las personas (Lepley, 2019).

Costa Rica tampoco escapa de esta tendencia mundial del aumento de consumo de frutas y hortalizas frescas, mínimamente procesadas. Según datos del Programa Integral de Mercadeo Agropecuario, en el país, en el año 2015 la población reportó consumir 1 porción de fruta y 3 porciones de hortalizas al día; este dato de consumo de hortalizas es 1% mayor que el reportado para el año 2012. Además, el 45,2% de los hogares consultados indican mantener el consumo de frutas y hortalizas, mientras que 28,7% indica haber aumentado el consumo. Por último, el estudio reveló que la prioridad de compra de los consumidores para ese año fue la categoría de hortalizas. Este mismo estudio demostró que, para el año 2015, el volumen de consumo de vegetales frescos per cápita anual en Costa Rica fue de 112,57 kilogramos, lo cual se considera un volumen importante dentro de la dieta. Este dato puede compararse con el obtenido en el período 2003 – 2004 donde el volumen de consumo per cápita anual fue de 80 kilogramos (PIMA, 2017). Además, al sumar el consumo de frutas y vegetales de los costarricenses, se obtiene que el valor es más alto que el recomendado por la Organización Mundial de la Salud. Otros datos publicados en un periódico nacional indican que las familias en Costa Rica incrementaron el consumo de hortalizas y vegetales entre 2009 y 2013, de acuerdo con los resultados de un estudio de tendencias presentado por PIMA. Según este estudio, en el año 2014, la papa era el favorito de los consumidores entre las hortalizas, con 20,8 kilos por persona al año. En segundo lugar, estaba el tomate con 19,9 kilogramos, luego el repollo, el chayote y la zanahoria (Barquero, 2014). Según las estadísticas, para el año 2015, el tomate presentó el primer lugar en consumo con un 12,9%, seguido por la papa con un consumo de 12,4%, el repollo con 8,1%, la zanahoria con 8,0% y la lechuga con 7,8%. Estas 5 hortalizas concentran el 55,1% del total de hortalizas consumidas para ese año y se mantiene el comportamiento mostrado en los años anteriores (58,9% en 2000, 53,87% en 2001, 53,5% en 2002, 54,5% en 2003-2004, 55,6% en 2009 y 54,9% en 2012 para las mismas hortalizas citadas) (PIMA, 2017).

Todo esto demuestra que los vegetales son cada vez más importantes en el consumo diario de las personas, tanto en Costa Rica como en otros lugares del mundo. A pesar de la gran aceptación que han tenido estos productos, a través de los años ha existido una preocupación por su inocuidad. De acuerdo con un estudio publicado en el año 2018, los brotes de enfermedades de transmisión por alimentos han ido en aumento, en Estados Unidos, pasando de menos de 700 brotes en el año 2009 a más de 900 brotes en el año 2015 (Dewey-Mattia, *et al.*, 2018). La Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), ha identificado entre las frutas y hortalizas mayormente asociadas con brotes

al melón, la lechuga y las hortalizas de hoja, el tomate, la cebolla y las hierbas (FDA, 2007). Debido a que las hortalizas son productos cuyo cultivo se asocia con la tierra, existe microbiota normal, microbiota de deterioro y microbiota patógena importante de considerar. Tanto las bacterias como los hongos dominan; sin embargo, algunos virus y parásitos son también de cuidado (Doyle y Buchanan, 2013).

En general, este tipo de alimento no debería poseer patógenos o, por lo menos, no debería contenerlos en cantidades que puedan causar problemas de inocuidad; sin embargo, se ha visto que hay patógenos asociados con vegetales listos para comer y se han dado brotes por el consumo de este tipo de alimentos. Según la FDA, desde el año 1990 hasta el año 2005, ha habido al menos 713 brotes asociados con frutas y vegetales en Estados Unidos. De éstos, 13 brotes se relacionaron con tomates, 11 con melones y 24 con vegetales de hoja verde como lechuga y espinaca. Además, entre el año 1996 y el año 2004, la FDA respondió a 14 brotes que involucraron directamente tomates o vegetales de hoja verde como vehículos de los patógenos. Estos brotes causaron alrededor de 859 casos de enfermedad. Además, otro dato interesante es el que indica que, entre el año 1995 y el 2005, hubo 19 brotes causados por *Escherichia coli* O157:H7, asociados con lechuga o espinaca fresca (Georgetown University, 2010).

En los últimos años, los brotes asociados con vegetales que registra el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés) son los siguientes: *Salmonella* Typhimurium en ensaladas listas para consumo (2021), *E. coli* O157:H7 en hortalizas de hoja (2020), *Cyclospora* sp. en ensalada lista para consumo (2020), *Cyclospora* sp. en albahaca (2019), *E. coli* O157:H7 en lechuga romana (2018), *Cyclospora* sp. en bandejas de vegetales y en ensaladas (2018), *Salmonella* sp. en coles (2018), *E. coli* O157:H7 en vegetales verdes de hoja (2017), *Salmonella* sp. y *E. coli* O157:H7 en brotes distintos por alfalfa (2016) y *Listeria monocytogenes* en ensaladas empacadas (2016). Esto demuestra que las enfermedades transmitidas por vegetales continúan siendo de gran importancia (CDC, 2021). Específicamente relacionados con zanahoria, se reportan 31 brotes entre los años 1998 y 2017, causando 756 personas enfermas y 17 hospitalizadas. Estos brotes fueron causados por Norovirus, *Bacillus cereus*, *Salmonella*, *Clostridium botulinum*, *Shigella* y *Staphylococcus aureus* (Pensack-Rinehart y Bunning, 2019).

No solamente los brotes son de preocupación para la industria de vegetales mínimamente procesados, sino que hay aspectos asociados con su naturaleza o su procesamiento, que hacen que el tema de inocuidad sea difícil de manejar. Por ejemplo, el cortado y el rallado destruyen las células superficiales de los vegetales, dañan sus capas superficiales y permiten que salga líquido del vegetal hacia los equipos de proceso y hacia los demás vegetales. Los cortadores, rebanadores y ralladores son fuentes de contaminación puesto que generalmente poseen espacios de difícil acceso para limpiezas y desinfecciones profundas.

El hecho de que haya superficies cortadas en el vegetal permite que por estos lugares los microorganismos invadan el resto del alimento y se multipliquen. La humedad y el exudado que resulta de cortar los vegetales proveen las condiciones para el rápido crecimiento de microorganismos en comparación con el vegetal intacto. Es por esto que durante las operaciones de troceado y rallado de vegetales, se incrementa el número de microorganismos presentes en estos alimentos. La literatura reporta que el hecho de exponer los vegetales a diferentes tipos de troceado puede incrementar la carga microbiana en 6 a 7 veces, inclusive (Francis *et al.*, 1999; Aguilera, 2005; Allende, *et al.*, 2006; FDA, 2008).

Estos productos son tejidos vivos que respiran, por lo que su conservación es un proceso especialmente complejo en el que participan células dañadas y células intactas. Como principio de conservación de este tipo de productos, se aplican barreras de conservación que, unidas, logran aumentar la vida útil del producto y asegurar la inocuidad del alimento. Lo anterior se refiere a que se utilizan varias condiciones que juntas logran disminuir el riesgo de crecimiento microbiano, pero no lo eliminan en forma absoluta. Para este sistema se han utilizado varias barreras como la refrigeración, la desinfección con cloro y el empaque en atmósferas modificadas (Allende, *et al.*, 2006).

Existe una gran variedad de métodos que se utilizan para reducir la población microbiana en los vegetales mínimamente procesados. Cada método tiene diferentes ventajas y desventajas, que van a depender del tipo de vegetal, de la forma de cosecharlo, del tipo de proceso, entre otras variables. La necesidad de lavar y desinfectar estos vegetales es cada día mayor para garantizar su inocuidad y prevenir brotes. Es por esto que el desarrollo de protocolos eficaces de lavado y desinfección es sumamente importante (do Prado *et al.*, 2020; FDA, 2001; FDA, 2008).

Con respecto a la desinfección, generalmente los vegetales mínimamente procesados se lavan y posteriormente se desinfectan por medio de inmersión en disoluciones de agua con agentes desinfectantes. Este procedimiento reduce la carga bacteriana inicial de los productos, permitiendo que con el tiempo disminuya la posibilidad de que causen enfermedades (al reducir patógenos) o haya problemas de deterioro. La disolución de lavado puede ser agua potable únicamente, aunque la eficacia del lavado se ve incrementada al utilizar antimicrobianos, entre los cuales se encuentran: cloro gaseoso, hipoclorito de calcio y de sodio, dióxido de cloro, peróxido de hidrógeno, ozono y ácido peracético (FAO y OMS, 2008).

El cloro sigue siendo uno de los desinfectantes mayormente utilizados en la industria alimentaria y de ahí la importancia de estudiar sus propiedades como agente desinfectante en vegetales, así como en otros alimentos. Además, el cloro es el agente desinfectante más usado en productos frescos, pero tiene un efecto limitado para eliminar bacterias en superficies de frutas y verduras. De acuerdo con el Código de Regulaciones Federales (CFR, por sus siglas en inglés)

de la FDA (2018), se pueden utilizar soluciones con hipoclorito de sodio, potasio o calcio con hasta 200 ppm de cloro disponible para la desinfección de vegetales.

Los efectos del cloro sobre las bacterias patógenas inoculadas sobre los productos frescos han sido investigados y los resultados han sido divergentes. Se ha encontrado que tratamientos con cloro a concentraciones de 100 a 200 ppm (cloro libre) no han sido efectivos en la desinfección de algunos vegetales como lechuga, repollo, zanahoria y perejil (Li *et al.*, 2001; Garg *et al.*, 1990; FDA, 2001). En otros estudios, hojas de perejil desinfectadas con 150 ppm de cloro libre mostraron una reducción del patógeno *Shigella sonnei* en más de 6 logaritmos (UFC/g). Los autores indican que esta reducción es alta, en comparación con estudios realizados en otros vegetales y a mayores concentraciones, y que esto puede deberse a la sensibilidad de la bacteria a la desinfección con cloro, así como a la relación superficie/peso de las hojas de perejil (Wu *et al.*, 2000). Otro estudio indica reducciones de 2 logaritmos para alcachofas desinfectadas con cloro a 200 ppm y de 3 logaritmos para borraja (planta medicinal comestible) en esas mismas condiciones (Sanz, *et al.*, 2002). Keskinen y colaboradores (2009) mencionan que obtuvieron reducciones de 1 log UFC/g de *E. coli* O157:H7 al desinfectar hojas de lechuga con soluciones de cloro en agua de concentración de 200 ppm con un tiempo de contacto de 2 minutos. En cuanto a microorganismos no patógenos, Adingba *et al.* (2018) indican que la reducción del microorganismo *Listeria innocua* en repollo chino rallado es de 0,36-0,95 log UFC/g, usando hipoclorito de sodio (NaOCl) a 20- 100 ppm de concentración por un tiempo de contacto de 10 minutos, por ejemplo.

El efecto de la disminución de microorganismos en vegetales usando cloro puede ser limitado, ya que la desinfección de hojas de diferentes vegetales para ensalada ya sea usando cloro o ácidos orgánicos, usualmente no reduce la carga microbiana en más de 2 a 3 logaritmos. Sin embargo, distintos estudios concluyen que hay una mayor reducción de distintos microorganismos al realizar desinfecciones con cloro u otros desinfectantes, en comparación con los vegetales que se lavan solamente con agua potable (Wu, *et al.*, 2000; Sanz, *et al.*, 2002; Keskinen, *et al.*, 2009). Un ejemplo de esto es que la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por su siglas en inglés) en conjunto con la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2008), publicaron estudios que indican que se pueden dar las siguientes reducciones microbiológicas en vegetales al utilizar desinfecciones con hipoclorito de sodio en concentraciones de 50 a 200 ppm y tiempos de contacto de 1 a 20 minutos: 0,2 a 1,7 log UFC/g de *Listeria monocytogenes*, 0,3 a 2,0 log UFC/g de *Salmonella* sp., 0,3 a 1,7 log UFC/g de *E. coli* O157:H7 y 0,2 a 6,0 log UFC/g de *Shigella* sp.

Es por ello que es sumamente importante estudiar distintos vegetales de consumo popular, así como sus diferentes formas de procesamiento (pelado, troceado o rallado, entre otros) ya que cada vegetal se comporta de forma distinta durante la desinfección y estos aspectos influyen en los resultados que se logren obtener.

Según lo anterior, no es lo mismo desinfectar vegetales de distinta naturaleza, como por ejemplo, vegetales con mayor contenido de agua, cáscaras más gruesas o delgadas, mayor contenido de algún tipo de nutriente, entre otros. El tipo de vegetal va a influir en la efectividad del protocolo de desinfección que se aplique y también el tipo de presentación de ese mismo vegetal, es decir, si está entero, pelado, troceado o rallado, podría influir en la efectividad de la desinfección. De ahí la importancia de este proyecto de investigación.

Hay una importante relación entre la desinfección con cloro y la materia orgánica que pueda estar presente en la disolución. Esta disolución posee materia orgánica asociada con los vegetales, la cual puede provenir de la tierra, de ramas de árboles, de insectos o de los vegetales. El cloro disponible en la disolución desinfectante entra en contacto con la materia orgánica y se inactiva el ácido hipocloroso (que es el que ejerce la acción desinfectante), por lo que disminuye el cloro residual o disponible para inactivar los microorganismos meta. Entre mayor cantidad de materia orgánica haya asociada con los vegetales a desinfectar, mayor será la inactivación del ácido hipocloroso, impidiendo una adecuada desinfección del alimento (Ritenour *et al.*, 2007; Nou y Luo, 2010; Waters y Hung, 2014).

La literatura no es clara en cuanto a si en el proceso de desinfección con cloro el efecto bactericida se da en los primeros minutos de la desinfección, cuando el cloro total se está uniendo a todos los componentes presentes en la disolución de cloro, o si la desinfección es más efectiva cuando el cloro total ha disminuido. En este último caso sería el cloro libre remanente el que ejerce el mayor efecto bactericida. Hay un estudio que indica que la reducción de *E. coli* O157:H7 se dio en el primer minuto de desinfección con cloro y no en mayor tiempo (tiempo total de 30 minutos); sin embargo, este estudio solamente evaluó este patógeno y lechuga cortada (Van Haute, *et al.*, 2013). Por esto es de gran importancia estudiar el efecto que tiene el tiempo de desinfección sobre la reducción de la carga microbiana de diferentes presentaciones de vegetales, así como el comportamiento de la concentración de cloro en la disolución desinfectante. Estos dos temas se abordan como objetivos de este proyecto.

Hay tres aspectos importantes a considerar cuando se va a evaluar si un tratamiento de desinfección con cloro es efectivo: el análisis microbiológico, el análisis químico y el análisis sensorial. Estos tres aspectos son los que determinan el diseño o los parámetros de desinfección que se van a utilizar en cuanto a concentración de desinfectantes, tiempo de contacto, proporción de alimento a desinfectar con respecto al volumen de desinfectante, entre otras condiciones. El primer aspecto considera si la desinfección logra reducir la carga microbiológica en la forma deseada, lo cual se realiza por medio de los análisis microbiológicos. El segundo considera si la concentración de desinfectante utilizada está dentro de las regulaciones nacionales o internacionales, y si el alimento puede representar un peligro químico a la hora de consumirse. El último aspecto por considerar es el análisis sensorial del alimento desinfectado, que se realiza

porque los tratamientos de desinfección agresivos podrían afectar la calidad sensorial del alimento hasta el punto en que podría dejar de ser atractivo para el consumidor.

Durante la desinfección de alimentos con cloro, el cloro libre puede producir otras reacciones que son de interés para la ciencia de alimentos, así como en salud pública por su asociación con problemas en la salud del ser humano. Una de las preocupaciones de utilizar cloro como desinfectante en alimentos es el hecho de que se han encontrado productos tóxicos que se forman a partir de las reacciones del cloro con otros compuestos o materia orgánica. Estos compuestos son los productos tóxicos derivados del cloro, entre los cuales se encuentran los trihalometanos y los ácidos haloacéticos. Se ha demostrado que este tipo de compuestos causan cáncer en animales de laboratorio y se cree que lo mismo puede suceder en el ser humano. Se asume que la mayoría de los productos tóxicos que se producen después de clorar el agua potable también podrían formarse en la desinfección de frutas y vegetales, debido a que los precursores que se han detectado en el agua potable y que dan origen a estos productos tóxicos, tienen su origen en las plantas. Estos compuestos considerados tóxicos, están regulados en el agua potable para evitar peligro a la salud humana (Richardson *et al.*, 1998; Olmez y Kretzschmar, 2009; Lee y Huang, 2019).

Aunque los productos tóxicos asociados con la desinfección de alimentos con cloro han sido de gran preocupación y se considera que el cloro en altas concentraciones podría generar un peligro químico a nivel de inocuidad, ha sido difícil determinar concentraciones de estos productos tóxicos o sus precursores directamente en los alimentos. No se han encontrado estudios publicados que hayan logrado medir concentraciones de cloro directamente en los alimentos. De ahí la importancia de utilizar las herramientas disponibles para la medición de cloro, para tratar de estandarizar protocolos que permitan medir cloro residual directamente en los tejidos vegetales, como los que se van a estudiar en este proyecto.

Al estudiar el residual de cloro que puede permanecer en los vegetales después de su desinfección, se podrá conocer si este permanece inmerso en los tejidos vegetales y si se está consumiendo en cierta cantidad al ingerirlos dentro de la dieta. Además, este resultado puede dar una idea de si se podrían formar otros compuestos tóxicos, derivados del cloro, cuando estos vegetales reciban procesamientos posteriores, como por ejemplo, la cocción del alimento.

A veces, el cloro residual en los vegetales produce olores y sabores que no son aceptados por los consumidores. El cloro tiene un olor y sabor distintivo descrito como fuerte y penetrante. Es un desinfectante efectivo, pero puede afectar fácilmente la calidad de un alimento, en detrimento de su calidad sensorial. Aun en niveles bajos, puede producir sabores discordantes en alimentos procesados (McGlynn, 2007). Un ejemplo de esto es un estudio que demostró que zanahorias cortadas que fueron tratadas con cloro tuvieron una menor aceptación entre consumidores. Cabe mencionar que estas zanahorias tenían una carga microbiológica menor que las no desinfectadas (Erickson, 2010). Otro estudio indica que hay diferencias entre el tipo

de tratamiento con cloro utilizado (cloro acuoso o cloro gaseoso), el vegetal utilizado (zanahoria, lechuga o repollo) y los resultados de los análisis sensoriales que se llevaron a cabo (Gómez-López *et al.*, 2008).

De acuerdo con lo anterior, aunque un tratamiento de desinfección con cloro sea efectivo en reducir una población microbiana determinada o cumpla su objetivo en cuanto a niveles de cloro residual que permanezcan en los tejidos vegetales, es sumamente importante evaluar el aspecto sensorial, para garantizar que el alimento continúe siendo aceptado y consumido por el mercado meta.

Con base en lo expuesto, este proyecto tuvo la finalidad de determinar el efecto del pelado y el troceado sobre la eficacia del cloro como desinfectante en lechuga, zanahoria y papa. Además de estudiar vegetales que se consumen regularmente en la dieta del costarricense en diferentes presentaciones, el proyecto aborda de forma integral todos los aspectos relacionados con la desinfección con cloro, como lo son el aspecto microbiológico, el aspecto sensorial asociado con el proceso de desinfección y el aspecto químico, tanto a nivel del comportamiento de la disolución de cloro en el tiempo, como a nivel del residual de cloro que permanece en el vegetal. Estos aspectos analizados en vegetales con diferentes presentaciones de uso cotidiano (enteros, troceados o rallados), permitieron evaluar los efectos de interés en diferentes presentaciones de lechuga, papa y zanahoria.

Los resultados de este proyecto de investigación son de gran utilidad para la industria, ya que permiten conocer en qué circunstancias el cloro puede utilizarse para la desinfección de vegetales similares a los estudiados en este proyecto, realizando desinfecciones efectivas sin afectar su aceptación en el mercado.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del pelado y el troceado sobre la eficacia del cloro como desinfectante en lechuga, zanahoria y papa, así como sobre el cloro residual y la calidad sensorial de estos vegetales después de su desinfección.

1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto del pelado, el troceado y el rallado del vegetal, sobre la concentración de cloro en el tiempo en la disolución desinfectante.
- Determinar el efecto del pelado y el troceado del vegetal, sobre la reducción de *E. coli* durante su desinfección con cloro.
- Determinar el efecto del pelado y el troceado del vegetal, sobre su residual de cloro, después de su desinfección.
- Determinar el efecto del pelado y el troceado del vegetal, sobre sus características sensoriales después de su desinfección con cloro.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 VEGETALES MÍNIMAMENTE PROCESADOS

2.1.1 Generalidades

En las últimas décadas hubo un incremento notable en el consumo de frutas y vegetales frescos. Estudios han demostrado que dietas altas en este tipo de alimentos, acompañadas de niveles bajos de grasa, mejoran notablemente la salud de los consumidores. Es por esto que se promueve el consumo de frutas y vegetales, en al menos 5 porciones por día, lo cual incluye de 2 a 3 tazas de vegetales frescos o cocidos según la edad (CDC, 2017; Eurostat, 2019).

La demanda de vegetales frescos mínimamente procesados ha llevado a un incremento de la variedad de este tipo de productos que están disponibles para el consumidor. Los vegetales mínimamente procesados incluyen desde vegetales “recortados” (como cuando se separan las hojas exteriores de las lechugas), hasta otros con procesos más complejos como el pelado, el troceado y el rallado, el lavado, la desinfección o la adición de antioxidantes (Francis *et al.*, 1999; Garande y Patil, 2014).

Los productos mínimamente procesados recién cortados también son conocidos como “ligeramente procesados”, “parcialmente procesados” o “pre preparados”. Como ejemplos de estos productos podemos citar: papas peladas, papas troceadas, lechuga o repollo en tiras, ensaladas mixtas, hongos troceados, ajos pelados y vegetales frescos en bandejas. El propósito de comercializar vegetales mínimamente procesados es ofrecer al consumidor vegetales inocuos en cuanto a aspectos químicos y microbiológicos, conservar las cualidades de sabor, color y textura del alimento y proveer de comodidad a los consumidores en cuanto a la preparación del alimento (Cantwell y Suslow, 1999; Wasim-Sidiqui y Shafiur-Rahman, 2015).

Todos estos vegetales pertenecen al grupo de las hortalizas, entre las cuales están también los tubérculos, donde se clasifica la papa. En cuanto a composición, en general, las hortalizas se caracterizan por contener entre 10 y 20% de materia seca, cuyos componentes principales son: 1-5% de compuestos nitrogenados, 0,1-0,3% de grasas, 1% de fibra y 1% de minerales. Los tubérculos tienen un elevado contenido de almidón, lo que contribuye con el porcentaje de materia seca (Belitz *et al.*, 2012).

2.1.2 Consumo en Costa Rica

En Costa Rica el consumo de vegetales u hortalizas ha ido en aumento a través de los años. Para el año 2015, el consumo per cápita anual de los costarricenses fue de 112,57 kilogramos, lo cual se considera una cantidad importante dentro de la dieta. Este dato puede

compararse con el obtenido en el año 2012 donde el consumo per cápita anual fue de 100,46 kilogramos y con el período 2003 – 2004, donde fue de 80 kilogramos. Además, al sumar el consumo de frutas y vegetales de los costarricenses, se obtiene que el valor es más alto que el recomendado por la Organización Mundial de la Salud (PIMA, 2017). Por otro lado, un estudio de la Caja Costarricense de Seguro Social determinó que en el 2010 solo dos de cada 10 personas consumían frutas y vegetales, mientras que en el 2018 fueron cuatro de cada 10 personas (El País, 2019), lo que demuestra el aumento en el consumo de este tipo de alimentos.

En nuestro país hay 5 vegetales que representan más del 50% del consumo de vegetales en la dieta de los costarricenses. Estos 5 vegetales han sido los mismos en diferentes estudios realizados por PIMA en el período del año 2002 al año 2012 y en los resultados del año 2015. Los vegetales mencionados anteriormente son, según el nivel de consumo:

1. Tomate
2. Papa
3. Repollo
4. Zanahoria
5. Lechuga

Para el año 2015, los dos primeros representaban cada uno entre un 12,9% y 12,4% de los vegetales consumidos por el costarricense, mientras que el repollo, la zanahoria y la lechuga representaron cada uno 8,1%, 8,0% y 7,8% respectivamente (PIMA, 2017). Además, según García- Barquero (2015), los productos más solicitados en las Ferias del Agricultor del Área Metropolitana son chile dulce, repollo, tomate y zanahoria.

Generalmente, el tomate se compra entero, en su presentación original o natural, mientras que los demás vegetales mencionados son comprados en su presentación original, así como con procesamientos mínimos como el pelado, el troceado y el rallado.

Entre el 45% y el 50% de los encuestados entre el año 2000 y 2015 en el Estudio de Tendencias de Consumo de Frutas, Hortalizas, Pescados y Mariscos en las Familias de Costa Rica indican que consumen vegetales diariamente (PIMA, 2017). Además, los datos de PIMA (2017) indican que la preferencia por los vegetales no se ve afectada por las estaciones lluviosa o seca del país, por la disponibilidad en los diferentes puntos de venta que se visitan o porque la persona viva en una zona donde se produce un producto en particular.

2.1.3 Lechuga

La lechuga, cuyo nombre científico es *Lactuca sativa*, es una planta perteneciente a la familia de las Compositae, que posee una raíz pivotante, con numerosas raíces laterales, las

cuales se desarrollan principalmente en la parte superficial del suelo, sobre los primeros 30 centímetros de profundidad (Tarigo *et al.*, 2004). Posee un tallo muy corto y las hojas forman una roseta que varía tanto de tamaño como de forma, textura y color, dependiendo de la variedad que se cultive. Una vez que pasa la madurez comercial, bajo condiciones ideales de clima se forma un tallo floral que puede llegar a medir de 1 a 1,2 metros, dependiendo de la variedad. La inflorescencia se compone en capítulos de 15 a 25 flores cada uno y con una coloración amarillenta (Galván *et al.*, 2008).

Algunos de los tipos de lechuga que existen en el mercado internacional son (Infoagro, 2003):

- Romanas: *Lactuca sativa* var. *longifolia*. No forman un verdadero cogollo, las hojas son oblongas, con bordes enteros y nervio central ancho. Destacan la Romana y la Baby.
- Acogolladas: *Lactuca sativa* var. *capitata*. Estas lechugas forman un cogollo apretado de hojas. Entre estas están las siguientes: Batavia, Mantecosa o Trocadero y Iceberg.
- De hojas sueltas: *Lactuca sativa* var. *inrybacea*. Son lechugas que poseen las hojas sueltas y dispersas. En esta categoría se encuentran la Lollo Rossa, Red Salad Bowl y Cracarelle
- Lechugas espárragos: *Lactuca sativa* var. *augustana*. Son aquellas que se aprovechan por sus tallos, teniendo las hojas puntiagudas y lanceoladas. Se cultivan principalmente en China y la India.

En Costa Rica se siembran principalmente las "arrepolladas", que son la lechuga americana, representada por la variedad "Great Lakes" o Grandes Lagos, de textura suave y flexible, hojas crespadas y de color verde oscuro. El otro tipo que se siembra es la del tipo "mantequilla" o de hojas blandas, también llamada criolla o "Boston", de color verde claro o amarillento, de textura suave y que forma cabezas de mediano tamaño (Cerdas y Montero, 2004).

Las principales zonas productoras de lechuga americana están en los cantones de Oreamuno, Cartago, Paraíso, Alvarado, Alfaro Ruiz y Escazú. Los meses de mayor oferta son de julio a noviembre (PIMA, 2001).

La corta o cosecha de la lechuga se realiza tomando con una mano la cabeza de la hortaliza y, con un cuchillo filoso en la otra mano, se corta a ras del suelo. Se eliminan en el campo hojas sucias, quemadas por el sol, con enfermedades y con daños causados por insectos (Cerdas y Montero, 2004).

Las lechugas, en general, se caracterizan por tener en su composición, altos porcentajes de agua. El peso seco es de alrededor de 5,1% (Belitz *et al.*, 2012). La lechuga es muy susceptible a la pérdida de agua, debido a que tiene una gran superficie expuesta al ambiente, por lo que se debe cortar en las primeras horas del día. Los síntomas de pérdida de agua se reflejan como pérdida de firmeza y turgencia en las hojas y un deterioro en su apariencia. Estas

pierden su apariencia fresca y se ven marchitas. Las plantas se deben manejar con mucho cuidado porque la nervadura de las hojas se quiebra fácilmente, fenómeno que ocurre muy a menudo durante el empaclado en campo. Cuando esto sucede, la zona dañada se oscurece, se torna color café (pardeamiento) y se incrementa el riesgo de pudriciones porque se facilita el ingreso de enfermedades (patógenos) y porque el tejido dañado se deteriora rápidamente. Los daños en las nervaduras pueden ocurrir por golpes, por una presión excesiva al manejar el producto o durante el empaque. La manipulación poco cuidadosa o excesiva también puede llevar a daños en las hojas, que deterioran significativamente la apariencia y obligan a eliminar parte del producto (hojas externas) (Cerdas y Montero, 2004).

2.1.4 Papa

La papa, *Solanum tuberosum*, es un tubérculo que pertenece a la familia de las solanáceas e incluye 2000 especies diversas entre las que se encuentran el tomate y la berenjena. Es una planta anual, herbácea, cuya parte comestible es el tubérculo. Se caracteriza porque existen muchas variedades que se cultivan a nivel mundial (Menéndez y Hernández, 2003).

El cultivo de papa en Costa Rica ha ido en aumento a través de los años. En los años 2007 y 2008, la producción de papa alcanzó las 66000 toneladas anuales, mientras que en el 2009 la producción fue de 74600 toneladas, lo que representa un 5% más con respecto a años anteriores (CNP, 2010). En el período del 2010 al primer semestre del 2015, la producción promedio anual fue de 63801 toneladas métricas, mientras que para el final del año 2015, la producción aumentó a 79102 toneladas métricas (CNP, 2015). El consumo per cápita de papa era de 8,59 kg/persona/año en 1961 y pasó a 11,62 en 1985. Esta tendencia al alza se mantuvo hasta el 2012 cuando se registraron 20,84 kg/persona/año (Coto, 2017). El CNP (2015) reportó un promedio de consumo per cápita anual de entre 12 y 17 kilogramos para el período de 2010 a 2014.

Según datos de CNP (2015), el cantón de Alvarado y el cantón Central de Cartago comprenden el 54% de la producción de papa a nivel nacional. Si bien otras regiones destinan a esta siembra áreas mucho menores, poseen rendimientos bastante altos que sobrepasan el promedio, como es el caso de Naranjo y Zarcero. La segunda zona de mayor producción es el cantón de Zarcero, ubicado en la provincia de Alajuela. Los distritos en donde se produce el tubérculo principalmente son Tapezco, Palmira y Las Brisas (Avilés y Piedra 2017).

En Costa Rica, se cultivan variedades de papa como las siguientes, que son difíciles de distinguir entre sí, ya que son similares a simple vista (Aviles y Piedra, 2017):

- Floresta: se cultiva en las faldas del Volcán Irazú.

- Granola: se cultiva en Tierra Blanca de Cartago.
- Maleke: se adapta a varias zonas de cultivo en Costa Rica.
- Durán: se ha cultivado en la zona media de Cartago. Se introdujo en La Cima de Dota y en la zona alta de Las Juntas de Abangares con buenos resultados.
- Kamuk: se cultiva en las faldas de los volcanes Irazú y Turrialba. En ocasiones puede distinguirse de las anteriores por ojos color rosado en su exterior.
- Yema de huevo: se siembra en la zona de La Cima de Dota y en las faldas del Volcán Turrialba.

Por último, se encuentran las variedades Paskí y Única, las cuales se distinguen por su cáscara color rojo.

Además, están también inscritas en la Oficina Nacional de Semillas (ONS) las variedades Idiafrit, Desiree y Birris (ONS, 2015).

Para que la papa sea considerada un producto de alta calidad debe ser firme, de aspecto fresco, libre de insectos y deformaciones severas, limpia, entera, libre de olores extraños y de enfermedades por hongos. Además, se consideran papas de tamaño grande las que tienen diámetros mayores a los 100 mm, medianas las que van de 45 a 100 mm y pequeñas las que tienen de 25 a 44 mm de diámetro (PIMA, 2001).

En cuanto a su composición, las papas tienen un peso seco de 22,2%. De este peso, el 18,9% está del compuesto por carbohidratos y además, el 14,1% de los carbohidratos son almidón. Debido a lo anterior, las papas son consideradas un vegetal “almidonoso” o de alto contenido de almidón (Belitz *et al.*, 2012).

Según un informe del año 2002, a nivel nacional, la comercialización de papa se realizaba en su mayoría de forma fresca (sin procesamiento posterior), pues solo un 15% de la producción se destinó a uso industrial (Brenes *et al.*, 2002). Por otro lado, en el 2015 se reportó falta o escasez de papa para uso industrial, principalmente para destinarse a uso en industrias de chips o snacks (CACIA, 2015). Esto indica que la papa es un producto de importancia nacional tanto de forma fresca, como procesada.

2.1.5 Zanahoria

La zanahoria se conoce botánicamente como *Daucus carota* y es de la familia de las umbelíferas. Es de raíz fusiforme que penetra profundamente en la tierra de la cual salen las hojas aladas que rodean el tallo. Dentro de esta familia también se encuentran vegetales como

el apio, el culantro y el perejil (Hernández, 1993; Bolaños, 1998; Pensack-Rinehart y Bunning, 2019).

Hay numerosas variedades de zanahoria entre las cuales destacan: Chantenay, Danvers, Mercado de París, Emperador y Nantes. Anteriormente en nuestro país se utilizaba para la producción, semilla de zanahoria tipo Chantenay, pero con el pasar del tiempo se han seleccionado y producido nuevas variedades como la zanahoria tipo Nantes, la cual es más larga y de mejor calidad que la Chantenay e híbridos como el llamado Bolero F1 y el Bangor F1, este último mayoritariamente (Richmond-Zumbado y Méndez-Soto, 2010; Vega *et al.*, 2012).

La zanahoria se cultiva principalmente en la provincia de Cartago, donde se da la producción del 80% de la zanahoria del país. Los principales cantones que la producen son Cartago, Oreamuno y Alvarado; sin embargo, también hay producción en Alajuela en la zona llamada Alfaro Ruíz (PIMA, 2001; Richmond *et al.*, 2011; Vega *et al.*, 2012).

Para que sea considerada de alta calidad, la zanahoria debe tener aspecto fresco, ser firme, limpia, entera, no bifurcada, desprovista de raíces secundarias, sin consistencia leñosa y libre de insectos o putrefacción causada por bacterias y hongos (PIMA, 2001).

En su composición, la zanahoria tiene 11,8% de peso seco, del cual 8,7% (la mayor parte) pertenece a carbohidratos (Belitz *et al.*, 2012).

En un estudio que se realizó en Ferias del Agricultor del Área Metropolitana se determinó que el 57% de los compradores adquirirían zanahoria en sus compras de hortalizas (García-Barquero, 2015). Aunque el consumo tradicional de zanahoria ha sido a través de los años de forma fresca, con el tiempo se ha utilizado este vegetal para otras presentaciones de vegetales mínimamente procesados y para jugos como el de naranja-zanahoria (Hernández, 1993; PIMA, 2010).

2.1.6 Operaciones de pelado, troceado y rallado de vegetales

Los consumidores esperan que los productos mínimamente procesados sean visualmente aceptables y atractivos. Estos productos deben tener una apariencia fresca, una consistencia apreciable a través del empaque y estar libres de defectos (Cantwell y Suslow, 1999; Wasim-Sidiqui y Shafiur-Rahman, 2015). Los tejidos de las frutas y vegetales frescos están vivos y por ello responden a los cortes realizados durante su preparación con un aumento en su actividad fisiológica y una mayor susceptibilidad al deterioro, pues al quitar la piel y disminuir su tamaño, se rompen tejidos y se expone una mayor área a las condiciones ambientales externas, favoreciendo la pérdida de humedad, el ablandamiento de los tejidos, la pérdida de aromas, los cambios de color, el deterioro enzimático y la entrada de microorganismos indeseables (Montero

et al., 2009; Wasim-Sidiqui y Shafiur-Rahman, 2015). Es aquí donde cobra importancia el manejo que se le da a estos alimentos en las plantas de proceso para que conserven esas características tan apreciadas por el consumidor final.

La preparación de los vegetales mínimamente procesados tiene una serie de pasos los cuales se dividen en operaciones unitarias específicas. Cada operación debe realizarse adecuadamente para asegurarse que la calidad, la vida útil y la inocuidad del producto final sean satisfactorias (Gorny, 1998; Wasim-Sidiqui y Shafiur-Rahman, 2015). La innovación y las mejoras tecnológicas han acompañado el avance de estos productos en los mercados internacionales. Se ha logrado mejorar los procesos para reducir los daños físicos durante la preparación, manipulación y procesamiento de los vegetales y las frutas mínimamente procesadas, mejorar las condiciones de higiene y las buenas prácticas de manufactura, reduciendo así el riesgo de contaminación y evitando daños físicos innecesarios en estos alimentos (Montero *et al.*, 2009).

Las operaciones que se utilizan en vegetales mínimamente procesados corresponden a operaciones de reducción de tamaño. Estas operaciones aumentan la superficie del alimento, en este caso los vegetales, de acuerdo con el tipo y fuerza que se aplique, utilizando diferentes equipos. La reducción de tamaño se logra mediante el troceado, el triturado y la molienda. La fuerza que se aplica durante estas operaciones incluye corte, compresión, cizalla e impacto. De esta forma, el material se reduce a partículas más pequeñas (Saravacos y Maroulis, 2011). El tamaño final del vegetal va a depender del uso que se le quiera dar posteriormente.

Para la operación de pelado, se utilizan generalmente tres tipos de proceso: el manual, el abrasivo y el químico. El primero, provee un producto de mayor calidad y da un mayor rendimiento; sin embargo, es extremadamente laborioso y consume mucho tiempo. Por otro lado, el pelado abrasivo utiliza un rodillo con una superficie abrasiva para remover la piel o cáscara del vegetal. También utiliza agua durante el proceso para favorecer el efecto del pelado. Los rendimientos pueden ser variables dependiendo del equipo y el producto, entre otros (FAO, 1995; Gorny, 1998; Wasim-Sidiqui y Shafiur-Rahman, 2015). El pelado químico consiste en sumergir el producto en una disolución alcalina a altas temperaturas. Esto permite suavizar la cáscara o piel para separarla del tejido interior. Se puede utilizar soda cáustica a una concentración de 0,5 - 3% y a una temperatura aproximada de 93 °C por un período de 30 s a 3 min. Las frutas o vegetales con la cáscara suave pasan posteriormente por agua a presión para que remueva totalmente la cáscara y los residuos de soda cáustica. En ocasiones, la fruta u hortaliza pelada con químicos se sumerge después en una disolución de ácido (normalmente ácido cítrico) o en agua hirviendo para neutralizar cualquier residuo cáustico y para evitar reacciones enzimáticas de pardeamiento. Hay vegetales que responden mejor al pelado químico que otros. Por ejemplo, hay dificultad para el pelado químico de la papa, en la cual se utilizan disoluciones de soda cáustica de hasta 10%, ya que se deben disolver componentes de la cáscara que no se suavizan a concentraciones menores (FAO, 1995; Wasim-Sidiqui y Shafiur-Rahman, 2015). La literatura

reporta, como tecnologías emergentes, el pelado enzimático para frutas cítricas, el pelado térmico para vegetales de cáscara gruesa y el pelado infrarrojo para frutas como melocotones (Wasim-Sidiqui y Shafiur-Rahman, 2015).

El cortado es una operación que se realiza por medio de utensilios o equipos que tengan cuchillas, sierras o alambres delgados. Los factores que influyen en los cortes son el tipo de producto a cortar, el filo de la herramienta para cortar, la fuerza del corte, la dirección de la fuerza del corte y la velocidad de corte. Además, la efectividad del corte va a depender del filo de la cuchilla y del ángulo de corte. El corte será de mayor calidad entre más delgado sea el filo de la cuchilla y más angosto sea el ángulo de corte (Saravacos y Maroulis, 2011 y Wasim-Sidiqui y Shafiur-Rahman, 2015).

Dentro de los equipos que existen para el cortado de vegetales, están las troceadoras o rebanadoras. Estos equipos permiten trocear o rebanar frutas y vegetales, entre otro tipo de alimentos, a partículas con grosor entre 0,7 y 7 cm. Las troceadoras consisten en uno o más cuchillos o discos que rotan, ajustados para cortar el alimento en el grosor deseado. Algunas veces las cuchillas se mueven hacia el producto y otras, es el alimento el que se mueve hacia la cuchilla del equipo. Los alimentos se colocan de forma automática o manual en bandejas o agujeros que los llevan hacia las cuchillas o discos rotatorios que los cortan. El grosor de cada pieza de alimento depende del ajuste que se dé a las cuchillas y en la mayoría de los equipos, este ajuste es variable y puede usarse para obtener varios grosores. El equipo garantiza cierta uniformidad en los cortes que realiza. La calidad del corte depende de la velocidad de este, la consistencia y temperatura del alimento y la calidad de las cuchillas. Las troceadoras que permiten cortar los alimentos en forma de cuadrados (cubicadoras), primeramente, cortan el alimento en tiras y posteriormente lo cortan al tamaño deseado por medio de cuchillas inclinadas que están colocadas en un rotor (Saravacos y Maroulis, 2011; Wasim-Sidiqui y Shafiur-Rahman, 2015).

El rallado de vegetales se utiliza para obtener cortes más finos o delgados que tienen diferentes usos en la industria de alimentos. Existen ralladores de diferentes formas y tamaños, los cuales poseen cuchillas con orificios que realizan la operación. Lo más importante es elegir el tamaño de la apertura en el disco, con la cuchilla apropiada, para el tipo de rallado que se desea obtener. Existen ralladores manuales, como los planos que sirven para rallar el alimento directamente en recipientes, los ralladores de cuatro lados o de “cajón” que tienen los orificios que rallan (de distintos tamaños) en sus cuatro lados y los ralladores automáticos, que son discos que generalmente se acoplan a equipos cortadores (Siti Mazlina *et al.*, 2010).

En el cortado y el rallado, los cuchillos e instrumentos utilizados deben mantenerse limpios, desinfectados y afilados. Cualquier alimento que tenga algún signo de descomposición debe separarse y no cortarse en ese punto debido a que expondría la superficie a microorganismos y potencialmente permitiría la contaminación cruzada con los demás vegetales

que sigan en el proceso. Equipos o cuchillos sin suficiente filo van a crear mayores daños físicos en los vegetales, que posteriormente afectarán su apariencia, calidad microbiológica y calidad sensorial (Gorny, 1998; Wasim-Sidiqui y Shafiur-Rahman, 2015).

Algunas desventajas de la reducción de tamaño de los vegetales son las siguientes: incremento en el uso de energía para el procesamiento, costo del equipo, el cual aumenta conforme se requieren menores tamaños y cortes más precisos, cambios en el sabor o el aroma del vegetal, pérdida de nutrientes, como por ejemplo, vitaminas en el proceso de troceado de frutas y vegetales, influencia en la textura e incremento del ataque microbiológico (debido al aumento en la superficie del alimento y a la liberación de sustancias nutritivas) (Saravacos y Kostaropoulos, 2002).

Las operaciones de pelado, troceado y rallado, aunque son muy importantes como tratamientos de vegetales mínimamente procesados, crean superficies donde los patógenos se pueden adherir con mayor facilidad. Además, estas operaciones permiten la salida de nutrientes que pueden ser fácilmente utilizados por distintos patógenos (Sapers *et al.*, 2005). Por ejemplo, un estudio que compara la adhesión de 24 cepas de *Listeria* sp. a la superficie de repollo demostró que todas las cepas podían adherirse con mayor facilidad a repollo troceado que a hojas de repollo enteras (niveles de 1 a 2 log mayores en repollo troceado que en repollo en hoja) (Erickson, 2010).

Durante estas operaciones existe también la posibilidad de contaminación del producto con una mayor cantidad de microorganismos al pasar por los diferentes equipos o contaminación cruzada entre bacterias provenientes de diferentes productos que se transfieren por los equipos de la planta de proceso (Barrantes, 2005; Erickson, 2010, Sapers *et al.*, 2005; Wasim-Sidiqui y Shafiur-Rahman, 2015).

2.1.7 Microbiología asociada con vegetales mínimamente procesados

Los vegetales listos para comer que se encuentran disponibles para el consumidor y que han sido mínimamente procesados, generalmente retienen la mayoría de su microbiota después del procesamiento, pudiendo convertirse en un problema de inocuidad o de calidad después de su almacenamiento (Francis *et al.*, 1999; Novak *et al.*, 2003).

Los vegetales listos para comer contienen poblaciones diversas de microorganismos y en estos se pueden encontrar recuentos de bacterias de 10^5 a 10^8 UFC/g. Del 80% al 90% de estas bacterias son bacilos Gram negativos. También se ha detectado la presencia de bacterias ácido lácticas en ensaladas mixtas y en zanahoria rallada. Además, es común encontrar mohos y levaduras como parte de esta microbiota. Además, cuando los vegetales mínimamente

procesados se mantienen en refrigeración, hay crecimiento de bacterias psicrótrofas (Francis *et al.*, 1999, Novak *et al.*, 2003; Sapers, *et al.*, 2005).

El microorganismo *Escherichia coli* se encuentra presente como microbiota normal del tracto gastrointestinal de humanos y animales y se ha visto presente en vegetales y frutas como contaminante por medio del contacto con el suelo (por presencia de heces de animales), aguas contaminadas y otras fuentes. También se ha encontrado incidencia de *Salmonella* sp. la cual generalmente correlaciona con los recuentos de *E. coli* como indicador de contaminación fecal. Además, el patógeno *Listeria monocytogenes* se encuentra ampliamente distribuido en los suelos y se ha aislado frecuentemente de vegetales. Este último es un microorganismo psicrótrofo, por lo que ha demostrado sobrevivir en vegetales incluso en ambientes de almacenamiento y distribución en refrigeración (Francis y O'Beirne, 2002; Salfinger y Tortorello, 2015).

El aumento de la superficie cortada hace que la disponibilidad de nutrientes sea mayor en los vegetales mínimamente procesados que en los frescos o sin procesar, lo cual favorece el crecimiento microbiano. Además, el hecho de manipularlos, aunque sea con procesos mínimos, aumenta la probabilidad de contaminación con patógenos como *Escherichia coli* patógenas, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Salmonella* sp. Estos son los patógenos mayormente asociados con este tipo de vegetales (Cantwell y Suslow, 1999; Novak *et al.*, 2003; Salfinger y Tortorello, 2015).

Al cortar los vegetales se liberan los nutrientes en fluidos que se generan por el daño mecánico del vegetal, favoreciendo la proliferación de microorganismos tanto en el producto, como en el ambiente de procesamiento donde se encuentran (equipos, utensilios y otros). El procesamiento mínimo de vegetales incluye entonces, etapas de lavado y desinfección que permiten disminuir la cantidad de microorganismos presentes (Novak *et al.*, 2003; Wasim-Siddiqui y Shafiur-Rahman, 2015), sin embargo, como señalan Eifert y Sanglay (2002), para mantener características similares a los productos frescos, no pueden aplicarse procesos de desinfección severos, por lo que la eficacia de los procesos de desinfección es limitada.

En general, el hecho de realizar operaciones como cortar, trocear, pelar y rallar, entre otros procesos mínimos, podría tener desventajas, entre las cuales se encuentran (Edgar y Aidoo, 2001; Wasim-Siddiqui y Shafiur-Rahman, 2015):

- propagar la microbiota inicial del vegetal causando un deterioro más rápido
- incrementar la superficie del vegetal, lo cual aumenta la probabilidad de ataque de los microorganismos al tener mayor área donde pueden ejercer contacto
- afectar de forma negativa las propiedades sensoriales de los vegetales por aumento en la actividad enzimática y en la tasa de respiración celular

Otros autores señalan que pequeñas diferencias en la microarquitectura de la estructura del vegetal pueden contribuir a que distintos patógenos puedan adherirse con mayor o menor facilidad al tejido vegetal (Novak *et al.*, 2003). Por ejemplo, un estudio encontró que una mayor cantidad de cepas de *Salmonella* sp. se adhiere a lechuga romana que a repollo. Otro estudio señala que, en repollo cortado, las características de su superficie influyen en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* (Erickson, 2010).

2.1.8 Desinfección de vegetales mínimamente procesados

La inocuidad en los vegetales mínimamente procesados es una preocupación que ha ido aumentando en las industrias con el paso de los años, debido a que se han reportado varios brotes asociados con este tipo de alimentos (Novak *et al.*, 2003; Sapers, 2005)

La desinfección de verduras y frutas es un tratamiento destinado a reducir la carga microbiológica presente en forma natural en estos alimentos, o aquella que se incorpora a través de las distintas etapas que ocurren desde su cultivo hasta que el producto se consume (López *et al.*, 2001). La FDA, en su Guía para Minimizar los Peligros Microbiológicos en Frutas y Vegetales (2008), define la desinfección como: “el tratamiento que se le da a los vegetales limpios por medio de un proceso que sea efectivo para destruir o reducir sustancialmente la cantidad de microorganismos de importancia en salud pública, así como otros microorganismos no deseados, sin afectar la calidad del alimento o su inocuidad”.

Existe una gran variedad de productos de uso doméstico e industrial destinados a reducir la microbiota de los vegetales mínimamente procesados, entre otros alimentos. Entre estos se encuentran cloro en disolución, cloro gaseoso, dióxido de cloro, ácidos orgánicos, ozono, peróxido de hidrógeno, fosfato trisódico y agua electrolizada (Wasim-Siddiqui y Shafiur-Rahman, 2015). Los desinfectantes que generan peróxido de hidrógeno son antimicrobianos eficaces y cada vez se generan más formulaciones comerciales que contienen una mezcla de peróxido de hidrógeno, ácido peracético y ácido acético. Estos son considerados agentes oxidantes. Formulaciones como la mencionada anteriormente, tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana, actúan con rapidez y generalmente no se ven afectadas por la materia orgánica (Moreno, 2011). Los ácidos orgánicos han cobrado auge en los últimos años como alternativas de desinfección más amigables con el ambiente y más naturales, aunque en estudios han demostrado reducir únicamente 1 log de la población microbiana estudiada (Francis y O’Beirne, 2002.) Otro ejemplo del uso de ácidos orgánicos se presenta en el estudio de Francis y colaboradores (1999), donde inocularon *Listeria monocytogenes* en lechuga y lograron una reducción de 0,2 a 0,5 log.

En vegetales donde se necesita una reducción de la población microbiana alta, como en las semillas de alfalfa, se han probado desinfectantes como hipoclorito, dióxido de cloro, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, etanol, fosfato trisódico, hidróxido de calcio y productos comerciales que se recomienden como desinfectantes y que sean seguros para usarse en alimentos. En este estudio en particular, el dihidróxido de calcio fue el más efectivo en reducir la carga microbiológica de *Salmonella* sp. y *E. coli* O157:H7 inoculados en alfalfa (Holliday *et al.*, 2001).

La efectividad del método utilizado para reducir la carga microbiológica generalmente depende del tipo de tratamiento que se utilice, el tipo y la fisiología del microorganismo que se desea reducir, características del alimento como textura, tipo de superficie y otros, el tiempo de exposición, la concentración del desinfectante, así como el pH y la temperatura de la disolución desinfectante. Cabe resaltar que muchas veces la concentración del desinfectante se ve limitada, debido a que concentraciones altas podrían causar un efecto negativo sobre las características sensoriales del producto final (FDA, 2001).

En la actualidad, uno de los productos mayormente utilizados por la industria alimentaria para la desinfección de vegetales mínimamente procesados es el cloro. Generalmente, se usan disoluciones de hipoclorito en concentraciones de 50 a 200 mg/L (FAO y OMS, 2008). Según la FDA (2018), se pueden usar disoluciones acuosas de hipoclorito de sodio, potasio o calcio (con o sin bromuros) para desinfectar superficies de contacto con alimentos en concentraciones de hasta 200 ppm de cloro disponible. Para la desinfección de vegetales frescos, se puede usar hipoclorito de sodio en concentraciones de 200 ppm; sin embargo, se recomienda enjuagar estos vegetales con agua potable después de su desinfección. Además, la recomendación del Panel Auditor Científico de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) indica que un desinfectante debe reducir como mínimo 2 log de la población de patógenos o microorganismos meta en frutas y hortalizas (Beuchat *et al.*, 2001), mientras que la FDA recomienda que la reducción sea de 5 logaritmos (Venkitanarayanan *et al.*, 2002); sin embargo, como se ha comprobado que estas reducciones de 5 logaritmos son difíciles de lograr, reducciones de 3 logaritmos se consideran adecuadas (Chang, 2015). Así mismo, la FDA (2008) indica que las reducciones con cloro son de alrededor de 2 logaritmos y que se deben acoplar a otras prácticas como buenas prácticas agrícolas, buenas prácticas de manufactura, entre otras. Los tiempos de contacto del alimento con la disolución desinfectante de cloro varían de acuerdo con el tipo de proceso productivo o industria, aunque, generalmente se utilizan tiempos de desinfección que van de 1 a 20 minutos (FAO y OMS, 2008).

Existen ventajas al utilizar cloro para desinfectar vegetales tales como (Katsuyama, 1993 y FAO y OMS, 2008):

- inactiva los microorganismos de forma rápida
- es seguro para el consumidor y su uso está permitido y regulado por la FDA

- es económico
- es soluble en agua
- puede medirse su concentración fácilmente en la disolución desinfectante

Por otra parte, también hay desventajas al utilizar el cloro como desinfectante en alimentos. El cloro puede causar daños en equipos (corrosión), no tiene mucho poder desinfectante residual en comparación con otros desinfectantes y su concentración se ve afectada por la cantidad de materia orgánica presente en el alimento o en la disolución desinfectante (Katsuyama, 1993; FAO y OMS, 2008).

En la mayoría de los países, las inmersiones de los vegetales en soluciones de cloro han sido permitidas desde hace años y se usan en los vegetales de las ensaladas listas para comer con el objetivo de disminuir la carga microbiológica. Sin embargo, siempre han existido preocupaciones acerca de la efectividad de la metodología de inmersión en la reducción de la carga microbiana y en garantizar alimentos inocuos al consumidor. Se cree que el método de inmersión podría no eliminar efectivamente los patógenos presentes y más bien puede eliminar la microbiota que está compitiendo con éstos, permitiendo el crecimiento de los patógenos en etapas posteriores del proceso (Francis y O'Beirne, 1997). Varios autores estudiaron la desinfección de algunos vegetales con una disolución de hipoclorito de sodio y el uso de dióxido de cloro, ambos a 100 ppm, y determinaron que el uso de dióxido de cloro por aspersión era más efectivo que el método de inmersión y que el uso de hipoclorito de sodio (Chung *et al.*, 2011). Es así como se continúa estudiando el uso del cloro para desinfectar vegetales, en diferentes concentraciones y por diferentes metodologías de contacto con la matriz correspondiente.

Como el cloro reacciona con la materia orgánica, los compuestos que puedan provenir de vegetales cortados o fisuras en su estructura podrían neutralizar el cloro antes de que ejerza su efecto sobre los microorganismos. Adicionalmente, la naturaleza hidrofóbica de algunas cáscaras o cutículas de vegetales podrían prevenir que el cloro u otros desinfectantes alcancen los microorganismos meta (FDA, 2001 y López, 2003).

Es por esto que existen múltiples estudios que tratan de imitar condiciones existentes en la industria, donde se desinfectan vegetales enteros inoculados con distintos microorganismos y se evalúa la eficacia de diferentes desinfectantes o métodos de desinfección. Existen pocos estudios que comparen los mismos vegetales en diferentes presentaciones, como por ejemplo, comparar los vegetales enteros en su presentación original o natural, con los mismos vegetales pelados, troceados en diferentes formas y rallados, entre otros, de ahí la importancia de este estudio.

2.2 EL CLORO COMO DESINFECTANTE

2.2.1 Generalidades

El cloro es un elemento no metálico que está ampliamente distribuido en la naturaleza, aunque no en su forma libre. Para producir las disoluciones desinfectantes de cloro, se usa cloruro de sodio en presencia de agua y una corriente eléctrica, lo cual produce gas cloro. Este gas es posteriormente secado, enfriado y presurizado para su comercialización o se convierte en su forma líquida para usarlo de esta forma. La reacción química que resulta de añadir el cloro gaseoso al agua es la siguiente (Eifert y Sanglay, 2002):

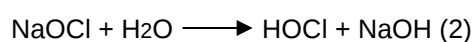


Según la reacción anterior, el cloro aplicado al agua en su forma molecular o de hipoclorito sufre una hidrólisis inicial para producir cloro libre consistente en cloro molecular acuoso, ácido hipocloroso y ion hipoclorito. La proporción relativa de estas formas depende del pH y la temperatura (Franson, 2002; Patnaik, 2004).

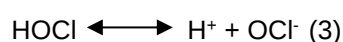
2.2.2 Propiedades antimicrobianas del cloro

Las propiedades antimicrobianas que se atribuyen al cloro provienen de la acción del ácido hipocloroso (HOCl) producto de la hidrólisis del cloro (como lo demuestra la ecuación anterior) (Eifert y Sanglay, 2002; Henao, 2003; Patnaik, 2004).

Las soluciones de hipoclorito son las que se usan generalmente para desinfectar distintas zonas de las industrias que procesan alimentos, como superficies en contacto con alimentos, equipos, utensilios de trabajo e inclusive paredes, pisos y otras partes de las instalaciones. También se usan para desinfectar algunos alimentos. El cloro comercial generalmente es una disolución de hipoclorito de sodio en agua, a diferentes concentraciones, que varían desde el 2% hasta el 5%. La reacción que se produce al combinar el hipoclorito de sodio con el agua es la siguiente (Eifert y Sanglay, 2002):



El ácido hipocloroso (HOCl) es el compuesto antimicrobiano más efectivo de todas las fracciones que pueden producirse al reaccionar el cloro. El ácido hipocloroso puede seguir reaccionando de la siguiente forma: (Eifert y Sanglay, 2002)



Esta disociación del ácido hipocloroso depende del pH. El HOCl prevalece entre más ácido sea el pH y por el contrario, a pH básico prevalece el ion hipoclorito (OCl⁻) (Marín y Barrantes, 1998; Eifert y Sanglay, 2002). Entonces, cuando se utiliza cloro en los procesos de desinfección, las moléculas de ácido hipocloroso constituyen el producto biológicamente activo

dentro del tratamiento. Sin embargo, su presencia en concentración adecuada depende de las condiciones en que sea disuelto el producto comercial. En particular, debe controlarse el pH del medio (Marín y Barrantes, 1998; Garmendia y Vero, 2006).

La literatura indica que un pH entre 6,5 y 7,5 se considera ideal para la estabilidad de las disoluciones de cloro que se van a utilizar en desinfección. Como se mencionó anteriormente, el efecto de variaciones en el pH se refleja en la orientación de las reacciones asociadas con el cloro; es decir va a haber una mayor o menor pérdida de cloro como cloro gaseoso de acuerdo con el pH de la disolución. A mayor acidez (bajo pH), mayor es la tendencia a liberar cloro gaseoso. Además, cabe mencionar que la temperatura, la cantidad de materia orgánica, el tiempo de exposición al cloro, entre otros, son factores que también van a afectar la eficacia y eficiencia de la desinfección con cloro (Marín y Barrantes, 1998; Waters y Hung, 2014)

El cloro en disolución acuosa no es estable. La exposición a la luz solar o luz artificial fuerte, así como la constante agitación, aceleran la reducción del cloro (Franson, 1992; Garmendia y Vero, 2006). Por esto, cuando se utiliza el cloro como desinfectante, es importante tomar en cuenta estos factores para su debido recambio entre un uso y otro.

La literatura indica que inmersiones durante un minuto a concentraciones menores de 40 mg/L son suficientes para realizar una eficaz operación de limpieza de frutas y vegetales, aunque se emplean por lo general entre 75 y 100 mg/L para compensar las pérdidas de cloro. En la práctica se reportan niveles de 100 a 200 mg/L de cloro en las soluciones de lavado de los vegetales (Marín y Barrantes, 1998; FAO y OMS, 2008).

Otro estudio indica que, al sumergir lechuga en tiras, en disoluciones de 100 ppm de cloro por 5 min, se logran reducciones de la carga microbiana de alrededor de 0,5 a 1 log (Francis y O'Beirne, 1997). Zhang y Farber (1996) mencionan que el cloro tiene una acción limitada sobre los patógenos presentes en vegetales mínimamente procesados. Los autores indican que se observan reducciones de 1,3 a 1,7 log UFC/g al sumergir hojas de lechuga en cloro a 200 mg/mL durante 10 minutos. Lo mismo sucede con inmersiones de tomate en 320 mg/mL de cloro durante 2 minutos, donde la reducción de *Salmonella* sp. no llega a los 2 logaritmos por cm² (Zhuang *et al.*, 1995).

Por un lado, el cloro es fácil de adquirir a nivel comercial y es un producto relativamente barato con respecto a otros desinfectantes. Sin embargo, en la actualidad se considera también que el cloro es de difícil manejo a nivel industrial, por el reto de mantener la concentración deseada y por el hecho de tener que desecharlo de forma apropiada (Takeuchi y Frank, 2001).

La literatura propone varios mecanismos por medio de los cuales el cloro actúa sobre los microorganismos, causando la reducción de la carga microbiológica en los alimentos y en otro tipo de superficies. En general, el cloro se encarga de la disrupción de las membranas,

desnaturalización de proteínas, rompimiento de ácidos nucleicos e inhibición del metabolismo de los microorganismos (Henao, 2003).

El ácido hipocloroso destruye las células de los microorganismos por medio de la inhibición de la oxidación de la glucosa. Este proceso se realiza cuando los compuestos o fracciones del cloro interactúan con enzimas que tienen grupos sulfhidrilo e impiden la síntesis de carbohidratos. Cabe mencionar que el ácido hipocloroso tiene una estructura similar a la del agua, lo que le facilita el ingreso a la célula microbiana (Eifert y Sanglay, 2002).

Otro de los mecanismos propuestos indica que, una vez que el ácido hipocloroso penetra la célula bacteriana, a través de su membrana citoplasmática, actúa sobre proteínas y ácidos nucleicos y ataca grupos amino, grupos indol y el hidroxifenol de la tirosina, impidiendo la síntesis de proteínas y dañando el ADN celular (Henao, 2003).

2.2.3 Cloro residual

Cuando se agrega cloro al agua, parte del cloro reacciona primero con la materia orgánica y los metales que puedan estar presentes. Este cloro no se encuentra disponible para ejercer su efecto de desinfección, condición que se conoce como demanda de cloro del agua (CDC, 2010).

Según el Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC, 2010), el cloro total se divide en dos partes:

- Cloro combinado: la cantidad de cloro que reacciona con nitratos y no está disponible para desinfección.
- Cloro libre: el cloro disponible para inactivar microorganismos. Al cloro libre se le ha denominado también cloro residual.

Al desinfectar vegetales, la materia orgánica en el agua, proveniente por ejemplo de tierra, hojas y otros materiales, inactivará el ácido hipocloroso y rápidamente puede reducir la cantidad de cloro disponible o cloro residual. El cloro que se combina con la materia orgánica ya no puede actuar contra los microorganismos; sin embargo, puede ser todavía medido por los equipos o kits que miden cloro total (Ritenour *et al.*, 2007). En otras palabras, la materia orgánica interfiere con la acción desinfectante y forma una barrera protectora de tal forma que los microorganismos son protegidos del efecto del cloro (Herruzo, 2000).

Otro aspecto importante del cloro residual es su disponibilidad para combatir los microorganismos de interés. Si se analiza el agua de desinfección y se encuentra que todavía existe cloro libre en ella, se comprueba que la mayoría de los microorganismos peligrosos ya fueron eliminados y aún queda cloro disponible en el agua; por lo tanto, es seguro consumir los

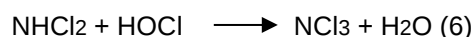
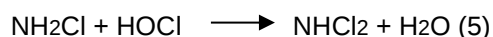
alimentos desinfectados de esta forma (OMS, 2009). Por el contrario, como indica ampliamente la literatura, cuando se realiza la medición de cloro residual y se encuentra que sus niveles no son detectables en el agua de desinfección, se sabe que el total de cloro reaccionó con la materia orgánica, con el ambiente que rodeaba el proceso de desinfección o con los microorganismos en cuestión y que podría no haber sido suficiente para realizar el proceso de desinfección deseado.

2.2.4 Productos peligrosos asociados con el cloro

Durante la desinfección de alimentos con cloro se ha encontrado que el cloro libre puede producir otras reacciones que son de interés en ciencia de alimentos, así como en salud pública, por su asociación con productos tóxicos. Cuando se utiliza el cloro como desinfectante y este se combina con materia orgánica, se producen los llamados productos resultantes de la desinfección o DBPs (siglās en inglés de “disinfection byproducts”). Estos productos se asocian con peligros potenciales en los seres humanos y con disminución en la eficacia de desinfección por formación de nuevos productos que no poseen poder desinfectante (Lee y Huang, 2019).

El cloro libre reacciona fácilmente con el amoníaco y ciertos compuestos de nitrógeno formando cloro combinado. La reacción del cloro con el amoníaco produce cloraminas: monoclорamina, dicloramina y tricloruro de nitrógeno. La presencia y concentraciones de estas formas dependen principalmente del pH, la temperatura, la proporción inicial cloro-nitrógeno, la demanda absoluta de cloro y el tiempo de reacción. Tanto el cloro libre como el combinado pueden estar presentes simultáneamente (Franson, 1992).

Las reacciones que ilustran la producción de cloraminas son las siguientes (Zhang, 2007):



Una de las preocupaciones de utilizar cloro como desinfectante en alimentos es el hecho de que se han encontrado productos tóxicos que se producen a partir de las reacciones del cloro con otros compuestos. Se ha demostrado que la cloración del agua puede producir sustancias químicas que causan cáncer en animales de laboratorio. Los más importantes son el cloroformo, el bromodiclorometano y el compuesto conocido como MX (3-cloro-4-(diclorometil)-5-hidroxi-2(5H)-furanona). Se asume que la mayoría de los productos tóxicos que se producen después de clorar el agua potable podrían formarse también en la desinfección de frutas y vegetales,

debido a que los precursores que se han detectado en el agua potable y que dan origen a estos productos tóxicos, tienen su origen en las plantas (Richardson *et al.*, 1998; Lee y Huang, 2019).

Otra preocupación asociada con la desinfección con cloro son los compuestos orgánicos, como los trihalometanos y los ácidos haloacéticos que se forman de la combinación del cloro con residuos orgánicos. Estos podrían tener impacto en el ambiente y en la salud del ser humano (Olmez y Kretzschmar, 2009; Lee y Huang, 2019). Por esto se continúan investigando alternativas a la desinfección con cloro, aunque este último continúa siendo la alternativa más accesible y económica para la industria (FDA, 2001; Lee y Huang, 2019).

2.2.5 Factores que afectan la actividad del cloro

Diversos factores físicos o químicos pueden optimizar o reducir el poder desinfectante del cloro. Estos factores hacen que la interacción del cloro con el agua sea compleja y lleve a confusiones y desacuerdos acerca de cuál es el mejor uso que puede dársele a este desinfectante (Gorny, 2001). A continuación, se hace una breve descripción de los diferentes factores que pueden influenciar la actividad del cloro en un proceso de desinfección e impedir que el proceso sea efectivo.

2.2.5.1 pH del agua

El pH de una disolución de cloro tiene un efecto muy importante en su actividad antimicrobiana. Como se mencionó anteriormente, un pH entre 6,5 y 7,5 se considera ideal para la estabilidad de las soluciones de cloro que se van a utilizar en desinfección debido a que a mayor acidez (bajo pH), mayor es la tendencia a liberar cloro gaseoso (Marín y Barrantes, 1998; Waters y Hung, 2014).

Además, las soluciones de cloro con pH por arriba de 8 son relativamente inefectivas contra los patógenos. Por debajo de pH 6, el cloro es más corrosivo para el equipo y la actividad se pierde rápidamente. A un pH alrededor de 7 se mantendrá cerca del 80 % del cloro en la forma disponible (ácido hipocloroso) con muy poco gas formado (Ritenour *et al.*, 2007). Es en este punto (80% a 95% de cloro libre detectado) donde ocurre la acción antimicrobiana de forma más rápida y efectiva (Suzlow, 2001). Esta efectividad a distintos valores de pH se explica porque las soluciones de cloro contienen moléculas de HOCl (ácido hipocloroso) y sus iones H^+ y $-OCl$ en equilibrio. De ellos, la forma no disociada del ácido (HOCl) es la forma que ejerce el efecto microbicida en los microorganismos. El equilibrio entre estas sustancias químicas se ve afectada por el pH. A medida que desciende el pH, el equilibrio favorece la forma letal del ácido (HOCl) (Waters y Hung, 2014).

2.2.5.2 Concentración de cloro utilizada

La concentración de cloro a utilizar va a depender de múltiples factores, como lo son las regulaciones con respecto al uso del desinfectante en un alimento en particular, el costo de la operación de desinfección, el efecto de la concentración de cloro sobre la calidad sensorial del producto y la microbiota asociada con el tipo de alimento que se desee desinfectar. Aunque se ha reportado que bajas concentraciones de ácido hipocloroso (< 40 ppm) matan en un minuto la mayoría de los patógenos, concentraciones más altas (100 a 150 ppm) son comúnmente usadas para compensar las pérdidas de cloro en el proceso de desinfección (Ritenour *et al.*, 2007). Actualmente, muchos autores están utilizando concentraciones cercanas a 150 - 200 ppm, debido a que esta es la concentración máxima permitida por la FDA para desinfección de vegetales (Bermudez-Aguirre, D. y Barbosa-Canovas, 2013; Neo, *et al.*, 2013; Posada-Izquierdo *et al.*, 2013).

Hay estudios que en los que se han utilizado concentraciones de cloro de 100 a 200 ppm para desinfección de lechuga, repollo, zanahoria y perejil (Li *et al.*, 2001; Garg *et al.*, 1990). En otros, desinfectaron hojas de perejil con disoluciones de 150 ppm de cloro libre (Wu *et al.*, 2000). Otro estudio indica reducciones de 2 logaritmos para alcachofas desinfectadas con cloro a 200 ppm y de 3 logaritmos para borraja (planta medicinal comestible) bajo las mismas condiciones (Sanz *et al.*, 2002).

Wasim-Sidiqui y Shafiur-Rahman (2015) mencionan varios estudios en los cuales se desinfecta con cloro a diferentes concentraciones. Así, indican que la carga microbiológica de mesófilos aerobios se redujo en 2,3 log UFC/g al utilizar cloro a 200 ppm, la aplicación de cloro a 50 ppm por 90 segundos en lechuga redujo la concentración de *E. coli* O157:H7 en 3,79 log y la población de *Shigella sonnei* inoculada en hojas enteras de perejil se redujo más de 7 log UFC/g al utilizar una desinfección de 5 minutos con 250 ppm de cloro.

2.2.5.3 Tiempo de exposición

Un período de exposición determinado es el que permite al cloro tener suficiente tiempo para actuar e inactivar a los microorganismos, sin que el cloro residual disminuya drásticamente por efecto de su combinación con materia orgánica e inorgánica. Por regla general, altas concentraciones de cloro disponible matan a los patógenos en tiempos cortos de exposición (<1 min.). En concentraciones más bajas, se necesita mayor tiempo de contacto para destruir a los patógenos (Barrantes, 2005; Ritenour *et al.*, 2007). Es por esto, que el tiempo de exposición que se elija está directamente relacionado con los demás parámetros que afectan la disponibilidad o actividad de cloro (cantidad de materia orgánica, temperatura del agua, concentración de cloro, entre otros). Según la Organización Mundial de la Salud, para vegetales mínimamente

procesados se recomiendan concentraciones de cloro entre 50 y 200 ppm con tiempos de exposición de 1 a 3 minutos (Erickson, 2010). También un estudio de FAO y OMS (2008) indicó que se usan tiempos de exposición de 1 a 20 minutos y concentraciones de 50 a 200 ppm.

En las condiciones normales de las plantas de proceso de alimentos, donde se busca la optimización de los procesos, no sería factible utilizar tiempos de desinfección prolongados. La desinfección debe ser una operación que pueda realizarse en la línea de procesamiento, con un tiempo suficiente para cumplir con su objetivo, pero sin afectar los tiempos de proceso o generar cuellos de botella y tiempos muertos. Debido a lo anterior, generalmente se usan tiempos de desinfección considerados cortos, como los mencionados anteriormente.

2.2.5.4 Cantidad de materia orgánica

La materia orgánica en el agua inactivará al ácido hipocloroso y rápidamente puede reducir la cantidad de cloro disponible. El cloro que se combina con la materia orgánica pierde su poder microbicida y, por lo tanto, su poder desinfectante (Ritenour *et al.*, 2007). En otras palabras, la materia orgánica interfiere con la acción desinfectante y forma una barrera protectora, de tal forma que los microorganismos son protegidos del efecto del cloro (Herruzo, 2000; Erickson, 2010).

La materia orgánica puede provenir de residuos adheridos al alimento como tierra, hojas, insectos, entre otros; así como de la presentación del vegetal (entero, pelado, troceado, rallado). En este caso, podría haber influencia del grado de procesamiento del vegetal en la cantidad de materia orgánica que posee a la hora de su desinfección.

El cloro reacciona con hojas, tierra o suciedad u otros tipos de materia orgánica en presencia de oxígeno. Es esencial cambiar el agua de desinfección frecuentemente para que este proceso sea efectivo. También, se puede lavar previamente productos muy sucios para disminuir la cantidad de materia orgánica presente en el agua con cloro a la hora de desinfectar (Suzlow, 2001).

Compuestos orgánicos como azúcares, fenoles, aminoácidos, ácidos carboxílicos y otros se encuentran en las células de las frutas y vegetales. Estos compuestos forman parte estructural de la célula y en ocasiones tienen funciones en la maduración del alimento. Algunos de estos compuestos como los fenoles o algunos ácidos, pueden aumentar su nivel en la fruta o el vegetal como respuesta a “estrés” o daño celular (Kato, *et al.*, 2000). Además, existen otros compuestos como peróxido de hidrógeno y malonaldehído, que generalmente se acumulan en respuesta a este tipo de daños (Hodges y Toivonen, 2008). Operaciones de pelado, troceado y rallado de los vegetales contribuyen con ese daño celular, lo que permite que aumenten y se acumulen compuestos orgánicos que están en menores cantidades en el vegetal intacto.

Toivonen y Lu (2013) demostraron que los ácidos carboxílicos, ácidos fenólicos y compuestos nitrogenados tienen capacidad de reducir el cloro libre disponible en las disoluciones desinfectantes. Por otro lado, indican que los carbohidratos no disminuyen el cloro libre tal y como lo hacen los demás compuestos mencionados.

Lo anterior indica que se esperaría que el cloro disminuya en vegetales con mayor daño celular, debido a la liberación de compuestos orgánicos como los mencionados anteriormente; mientras que en vegetales intactos o con menor subdivisión, el poder desinfectante del cloro debería ser mayor.

2.2.5.5 Temperatura

Generalmente, el cloro ha mostrado aumentar su actividad antimicrobiana con el aumento de la temperatura; sin embargo, a temperaturas mayores a 52° C la eficacia del cloro y su solubilidad decrecen (Eifert y Sanglay, 2002). Esto sucede porque a estas temperaturas aumenta la tasa de volatilización del cloro y se pierde en el ambiente como gas cloro (Suzlow, 2001).

La mayor solubilidad del cloro se da a temperaturas cercanas a 4° C; no obstante, en la industria de frutas y vegetales, generalmente se ajusta la temperatura de la disolución desinfectante a 10° C por encima de la temperatura del producto o alimento a desinfectar. Esto porque así se genera un efecto de presión positiva en el alimento y se evita la internalización de la disolución desinfectante, lo que podría afectar la calidad, inocuidad y vida útil del vegetal (Beier *et al.*, 2004). La Universidad de Minnesota y el Ministerio de Agricultura de Estados Unidos (2012) recomiendan este parámetro de 10 °C por encima de la temperatura del vegetal para el melón, por ejemplo.

Se ha demostrado que se requiere 2,5 veces más concentración de cloro y 9 veces más tiempo de contacto para obtener la misma tasa de muerte de microorganismos, al utilizar cloro a 3° C que a 20° C (Bloch, 2001). Klaiber y colaboradores (2005) encontraron una reducción de 1,7 log de bacterias mesófilas en zanahoria desinfectada con cloro (200 ppm a 4 °C) mientras que la reducción aumentó a 2,3 log cuando la temperatura de la disolución de cloro aumentó a 50 °C. Esto concuerda con el hecho de que, a mayores temperaturas, el cloro tiene mayor actividad bactericida. Como se mencionó anteriormente, no pueden utilizarse temperaturas demasiado altas porque el cloro se volatiliza.

Por último, la Universidad de Minnesota y el Ministerio de Agricultura de Estados Unidos (2012) recomiendan el uso de disoluciones desinfectantes en frutas y vegetales a temperaturas entre los 13 °C y lo 49 °C.

2.2.6 Métodos para medir cloro

Para aguas naturales y tratadas se han descrito múltiples metodologías para medir cloro libre, cloro total e incluso presencia de cloraminas. La Agencia de Protección del Ambiente de Estados Unidos (EPA) y la Asociación Americana de Salud Pública (APHA) recomiendan tres métodos colorimétricos para medir cloro total: titulación yodométrica, titulación yodométrica reversa y titulación DPD-FAS (Eifert y Sanglay, 2002). De acuerdo con análisis realizados al comparar los distintos métodos, se ha encontrado que los métodos yodométricos son adecuados para medir concentraciones de cloro total superiores a 1 mg/L y que los métodos amperométricos consiguen mayor sensibilidad. Todos los métodos yodométricos sufren interferencias, generalmente por la cantidad de yoduro de potasio y de iones hidrógeno añadidos. El método amperométrico no es tan sencillo como el colorimétrico y requiere de mayor entrenamiento del analista, así como de electrodos en excelente estado. Además, los contaminantes orgánicos pueden producir lecturas falsas en los métodos colorimétricos (Franson, 1992).

Para las muestras que tienen una cantidad significativa de materia orgánica se recomiendan los métodos amperométricos o los métodos colorimétricos en retroceso para impedir el contacto entre la concentración total del yodo liberado y la muestra. El color y turbidez de la muestra puede dar problemas de determinación de punto final en el método colorimétrico del almidón-yoduro. Además, un contenido inusualmente alto de materia orgánica puede producir inseguridad en el punto final (Franson, 1992; APHA, 2017).

Actualmente, existen también métodos semiautomatizados que han hecho que la medición de cloro en soluciones acuosas sea más rápida y que no requiera personal especializado. Algunos de los equipos que pueden usarse para este fin son los kits de medición de cloro de Hannah, Hidiritec, Hach, Lamotte, entre otros (Murray y Lantagne, 2014). Existe, además, un clorímetro con el nombre de Chlorosense que permite medir cloro libre y cloro total en muy poco tiempo (Palintest, 2009).

El clorímetro Chlorosense (de la marca Palintest) utiliza como fundamento de medición la técnica electroquímica conocida como cronoamperometría. La cronoamperometría se basa en la aplicación de un voltaje fijo a un electrodo en funcionamiento. La magnitud de la corriente es directamente proporcional a la concentración de cloro en la muestra y la respuesta del sensor recae en la conductividad de la fuente de agua o líquido en la muestra, la cual promueve el flujo eléctrico (Palintest, 2009).

Los sensores de este clorímetro tienen dos electrodos, uno para medir cloro libre y el otro para la medición de cloro total. El voltaje que se usa ha sido seleccionado para poder realizar la medición de cloro libre y cloro total simultáneamente. Una vez que el sensor se inserta en el equipo, el análisis es completamente automatizado. El equipo controla el sensor y captura las señales emitidas. Estas señales pasan a un procesador, el cual identifica cuáles pertenecen a

cloro libre y cuáles a cloro total y determina la concentración de los dos parámetros. Los resultados se generan en pantalla en unidades de mg/L (Palintest, 2009).

El Chlorosense no requiere calibración por parte del usuario. A cada lote de sensores se le asigna un dígito de calibración durante su producción. Este código se utiliza para construir una curva de calibración para cada lote de sensores. El equipo posee un chip, asignado a cada lote de sensores, que está programado con el código de calibración y lo introduce al equipo automáticamente (Palintest, 2009).

Las características relacionadas con las mediciones que realiza el Chlorosense se resumen en el Cuadro 1:

Cuadro 1. Características de medición del clorímetro Chlorosense

Característica	Cloro libre	Cloro total	Temperatura
Tiempo de análisis	< 1 minuto	< 1 minuto	< 1 minuto
Rango de medición	0,02 – 10,0 mg/L	0,05 – 100 mg/L	0 – 100 °C
Resolución	0,01 hasta 1,0 mg/L 0,1 desde 1,0 mg/L	0,02 hasta 1,0 mg/L 0,1 entre 1 a 20 mg/L 1 mg/L desde 20 mg/L	0,1 °C
Temperatura de la muestra	2 – 25 °C	2 – 25 °C	No aplica

Fuente: Palintest, 2009

2.3 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL PROCESO DE DESINFECCIÓN CON CLORO

Existen múltiples aspectos a considerar en cuanto a la evaluación del cloro como desinfectante. Ya se mencionó en capítulos anteriores el hecho de que el tipo de vegetal y su presentación podrían influir en la eficacia del proceso de desinfección. También se mencionaron algunos aspectos importantes en cuanto a los factores que pueden afectar la efectividad del cloro como desinfectante (materia orgánica, concentración, tiempo, temperatura, otros).

Es importante mantener ciertas condiciones mientras se realizan las inmersiones en cloro para evitar la contaminación cruzada o el aumento de la carga microbiológica en el producto por el uso de agua contaminada. Al respecto, Francis y colaboradores (1999) indican que en un estudio se analizó el agua clorada que se utilizaba para lavar ensalada de escarola en una planta de procesamiento y se encontró que el agua contenía 10^3 bacterias/mL lo que provocaba transferencia de microorganismos a los vegetales por la reutilización del agua clorada durante tiempo prolongado.

Hay tres aspectos importantes a considerar cuando se va a evaluar si un tratamiento de desinfección con cloro es efectivo: el análisis microbiológico, el análisis químico y el análisis sensorial. Estos tres aspectos son los que determinan el diseño o los parámetros de desinfección que se van a utilizar en cuanto a concentración de desinfectante, tiempo de contacto, proporción de alimento a desinfectar con respecto al volumen de desinfectante, entre otros detalles. El primer aspecto considera si la desinfección logra reducir la carga microbiológica en la forma deseada; esto se realiza por medio de los análisis microbiológicos. El segundo considera si la concentración de desinfectante utilizada está dentro de las regulaciones nacionales o internacionales y si el alimento podría representar un peligro químico al consumirse. El último aspecto por considerar, el análisis sensorial, se realiza porque los tratamientos de desinfección agresivos podrían afectar la calidad sensorial del alimento hasta el punto en que podría dejar de ser aceptable para el consumidor.

A continuación, se presenta una breve descripción de cada uno de estos aspectos.

2.3.1 Análisis microbiológicos

Una forma convencional y muy utilizada de evaluar si un tratamiento de desinfección con cloro u otro desinfectante fue eficaz en reducir una población microbiana, son los recuentos microbiológicos usando un microorganismo indicador. Los microorganismos indicadores se definen como bacterias que son utilizadas como una señal de calidad o higiene en agua, alimentos y en ambientes de procesamiento. Esta metodología provee información acerca de si el tratamiento logra la meta propuesta bajo las condiciones del experimento, aunque no permite conocer el por qué algunos tratamientos son más eficaces que otros (Seo y Frank, 1999; Tortorello, 2003; Erkmen y Bozoglu, 2016).

En este estudio se eligió a la bacteria *Escherichia coli* debido al desempeño que ha demostrado como indicador en otros estudios similares y a su uso como indicador de patógenos de origen entérico, los cuales han causado brotes por consumo de vegetales mínimamente procesados (Behrsing *et al.*, 2000; Tortorello, 2003; Erkmen y Bozoglu, 2016).

E. coli se encuentra distribuida ampliamente en el intestino de humanos y animales de sangre caliente. Es el bacilo anaerobio facultativo predominante en el intestino y es parte esencial de su microbiota que mantiene saludable la fisiología del huésped. Esta bacteria es miembro de la familia *Enterobacteriaceae* y aunque la mayoría de las cepas no son patógenas, existen cepas de este género que sí lo son, así como otras que son patógenos oportunistas (APHA, 1998; Salfinger y Tortorello, 2015; Erkmen y Bozoglu, 2016).

La enumeración de *E. coli* en los alimentos puede estar influenciada por factores tales como la contaminación del producto, la multiplicación del microorganismo, su muerte o

inactivación o su adherencia a las partículas del alimento (Sapers, *et al.*, 2005). Además, esta bacteria es recomendada por la FDA como microorganismo indicador en procesos de validación de desinfectantes, ya que es indicador de la posible presencia de patógenos entéricos y se comporta de forma similar a la mayoría de estos. Se asume que, si se logra eliminar o reducir eficientemente el microorganismo indicador, también se eliminarán los posibles patógenos presentes (Loftus, 2007).

Para la evaluación microbiológica de *E. coli* como indicador en un alimento que se va a desinfectar, se hace necesario inocular el alimento con cargas microbiológicas de esta bacteria suficientemente altas que permitan observar si hubo la reducción deseada después del tratamiento. Como se mencionó anteriormente, el Panel Auditor Científico de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) recomienda que un desinfectante reduzca como mínimo 2 log de la población de patógenos o microorganismos meta en frutas y hortalizas (Beuchat *et al.*, 2001), la FDA recomienda reducciones de 5 logaritmos en algunos procesos y para patógenos (Venkitarayanan *et al.*, 2002), mientras que otros autores consideran que reducciones de 3 logaritmos son efectivas (Chang, 2015). Además, la FDA permite utilizar el hipoclorito de sodio en concentraciones de hasta 200 ppm en vegetales (FDA, 2018). Todos estos datos permiten diseñar un estudio que demuestre por medio de análisis microbiológicos si un proceso de desinfección específico cumple con los objetivos planteados y podría escogerse el criterio más estricto de reducciones de 5 logaritmos como meta.

2.3.2 Análisis químicos

Los análisis químicos para evaluar concentraciones de cloro pueden tener dos objetivos. El primero, verificar la concentración de cloro en la disolución desinfectante y el segundo, conocer la concentración de cloro que permanece en el alimento después de su desinfección con cloro. Con respecto al primero, se verifican las concentraciones mínimas e ideales del desinfectante para su correcto funcionamiento y para así garantizar la desinfección del alimento. Por otro lado, exceso de desinfectante en contacto con los alimentos podría representar un peligro químico para el consumidor, por lo que nuevamente se hace necesario el análisis químico para prevenir este peligro (Universidad de Clemson, 2012; Lee y Huang, 2019).

La Universidad de Minnesota y el Ministerio de Agricultura de Estados Unidos (2012) recomiendan verificar la concentración de cloro en la disolución desinfectante, cuando se desinfectan frutas y vegetales, cada vez que se agrega cloro al agua o cada vez que se cambia de lote de alimento a desinfectar. También mencionan que el agua con desinfectante debe cambiarse frecuentemente y medirse la concentración de cloro nuevamente cuando se prepara esta disolución.

Generalmente, cuando la literatura se refiere a análisis químicos que tienen que ver con procesos de desinfección con cloro, se describen metodologías para verificar la concentración de cloro en la disolución desinfectante. Son pocos los estudios y las metodologías que describen cómo medir y analizar el nivel de cloro residual directamente en el alimento.

Las normas no especifican un nivel residual permitido de cloro en los alimentos. Probablemente, al enjuagar los vegetales con agua potable después de la desinfección con cloro, se elimine el cloro residual que haya quedado después de la desinfección. Sin embargo, no hay muchos estudios que evidencien la cantidad de cloro residual que permanece en los vegetales después del tratamiento de desinfección (McGlynn, 2007).

Un estudio donde sí se evaluó este parámetro utilizó el método espectrofotométrico de absorción atómica para evaluar cloro residual en pulpa de mango. Para esto, se realizó una desinfección por 45 y 90 minutos con concentraciones de hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio de 15, 25 y 50 ppm. El residuo de hipoclorito de sodio en la pulpa de mango fue 0,7 ppm mientras que el residuo de hipoclorito de calcio fue de 0,61 ppm. Esos residuales de hipoclorito, tanto de sodio como de calcio, fueron calculados tomando en cuenta el hipoclorito del mango desinfectado y el de mango control sin desinfectar, debido a que la pulpa de mango puede tener estos compuestos (Castro Del Campo y Chaidez Quiro, 2009).

En capítulos anteriores se describieron las metodologías recomendadas para medir cloro total y residual, tanto en el agua de desinfección como en el alimento, por lo que no se abordará este tema nuevamente en este capítulo.

2.3.3 Análisis sensoriales

Los productos utilizados en los procesos de desinfección de alimentos y en este caso, de vegetales mínimamente procesados, pueden afectar la calidad sensorial del alimento que se desea ofrecer al consumidor.

A veces, el cloro residual en los vegetales produce olores y sabores que no son aceptados por los consumidores. El cloro tiene un distintivo olor y sabor descrito como fuerte y penetrante. Es un desinfectante efectivo, pero puede dañar fácilmente la calidad de un alimento, al afectarlo sensorialmente. Aun en niveles bajos, puede producir sabores discordantes en alimentos procesados (McGlynn, 2007). Es por esto que, a la hora de seleccionar el tratamiento de desinfección que se va a utilizar, se debe considerar también el aspecto sensorial.

El análisis sensorial es una herramienta muy útil para entender, conocer y valorar las cualidades sensoriales de un producto que llevan a un consumidor a aceptar o rechazar los alimentos de acuerdo con las sensaciones, sabores y texturas percibidas. Existen gran cantidad

de técnicas para el análisis sensorial, cada una con condiciones y protocolos específicos para su aplicación. Estas técnicas se clasifican en pruebas de discriminación, pruebas descriptivas y pruebas de aceptación (Rousseau, 2004 y Espinosa, 2007). La Prueba Triangular de Diferencia descrita por Pedrero y Pangborn (1989), es una prueba de discriminación que permite determinar si existe diferencia sensorialmente perceptible entre dos muestras, comparando tres muestras a la vez, de las cuales dos son iguales entre sí y la otra es diferente (Espinosa, 2007).

En la Prueba Triangular de Diferencia se presentan tres muestras simultáneamente (como los vértices de un triángulo), dos de ellas son idénticas y una es de una formulación diferente. El panelista debe indicar cuál de las tres es la muestra distinta. Esta prueba permite al investigador conocer si existe diferencia perceptible entre dos productos sin tener que especificar la naturaleza de la posible diferencia (Espinosa, 2007; Olivas-Gastelum *et al.*, 2009).

Las muestras se presentan en un orden y se le solicita al panelista que siga ese orden para analizarlas. Al realizar esta prueba, deben considerarse dos variaciones posibles. Una se llama “elección forzada” y es la que obliga al panelista a designar una de las muestras como diferente, aunque no tenga seguridad ni convicción de que realmente es diferente. La otra, llamada “de libre elección” permite indicar que no hay diferencias perceptibles entre las muestras. En este último caso, también hay varias formas de analizar los resultados. Se puede “eliminar” o no tomar en cuenta los resultados de los panelistas que no encontraron diferencias o se puede registrar las respuestas de los panelistas que no percibieron diferencias como 1/3 (33%) correctas y 2/3 (66%) incorrectas. De esta forma se disminuye la probabilidad de encontrar un efecto significativo al utilizar las respuestas de los panelistas que no percibieron diferencias (Sancho, *et al.*, 1999; Espinosa, 2007).

La hipótesis nula en la Prueba Triangular de Diferencia es que la probabilidad de hacer una selección correcta cuando no hay diferencias perceptibles entre las muestras es de 1/3. La hipótesis alternativa indica que la probabilidad de que la población obtenga un resultado correcto cuando perciben una diferencia entre las muestras es mayor que 1/3. Esta prueba es de una cola. Además, el resultado indica únicamente si el efecto de encontrar diferencias perceptibles entre las muestras es significativo, pero no indica en qué atributo sensorial se percibe esta diferencia (Lawless y Heymann, 1999; Espinosa, 2007).

La Prueba Triangular de Diferencia es relativamente difícil ya que el panelista debe recordar las características sensoriales de los alimentos o muestras mientras los va evaluando. Es decir, cuando va a probar la tercera muestra, debe recordar las características de la primera y segunda muestra. La probabilidad de respuestas al azar en esta prueba es de $p=1/3$ y para analizar los resultados se suma el número de respuestas correctas y se busca en la tabla asociada al método (Ibañez y Barzina, 2001; Espinosa, 2007).

El análisis de resultados se realiza por medio de tablas asociadas con la prueba. La Prueba Triangular de Diferencia se relaciona estadísticamente con una distribución binomial, la

cual permite identificar si la diferencia percibida se debió al azar o a una diferencia significativa entre las muestras analizadas. En la tabla, se busca el número de panelistas que participaron de la prueba y esta indica cuántos panelistas debieron tener la respuesta correcta para que la diferencia sea perceptible como efecto significativo (Lawless y Heymann, 1999; Espinosa, 2007). Esta tabla puede observarse en la sección de anexos de este trabajo.

En cuanto a investigaciones previas, que hayan incluido el análisis sensorial dentro de sus objetivos y que incluyan desinfección de vegetales, se puede citar un estudio que demostró que zanahorias cortadas que fueron tratadas con 3% de suero de leche y cloro tuvieron una menor aceptación entre consumidores debido a que su superficie era de color más claro que las zanahorias sin desinfectar. Cabe mencionar que estas zanahorias tenían una carga microbiológica menor que las no desinfectadas (Erickson, 2010).

Otro aspecto importante por considerar, podría ser el tipo de desinfectante o su presentación. Un ejemplo de esto es la desinfección de repollo con dióxido de cloro. El dióxido de cloro en su presentación gaseosa causó el oscurecimiento del repollo, mientras que este mismo desinfectante en su presentación acuosa no generó diferencias de color en el alimento (Erickson, 2010).

Existen también casos donde el proceso de desinfección no afecta la calidad sensorial del alimento. Un ejemplo es la desinfección de zanahoria rallada que se realizó con hipoclorito de sodio a concentraciones de 100, 250 y 500 ppm y se evaluó si este proceso de desinfección tenía efecto sobre la calidad nutricional y el aspecto visual del producto. No se encontraron diferencias significativas entre las zanahorias desinfectadas y las no desinfectadas (Erickson, 2010). En otro estudio realizado por López y colaboradores en el año 2011, se utilizó como desinfectante un producto elaborado con extracto de semilla de toronja a 400 ppm y 10 minutos de acción, así como ácido peracético a 2000 ppm a 5 minutos de acción, para la desinfección de fresas. Posteriormente, se realizó un análisis sensorial de estas fresas por medio de la prueba triangular de diferencia y no se encontraron diferencias significativas (nivel de significancia de 5%) entre las fresas desinfectadas y las fresas sin desinfectar.

De acuerdo con lo anterior, es importante combinar los análisis microbiológicos y químicos que se realizan a los alimentos desinfectados, con análisis sensoriales, que permitan indicar si el proceso de desinfección afecta o no la calidad sensorial del alimento. En caso de que se vea afectada la calidad sensorial del producto, es importante replantear, hasta donde sea posible, el proceso de desinfección, para que el producto sea aceptado por los consumidores finales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización:

El proyecto se realizó en el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) y en la Escuela de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Costa Rica en la Sede Rodrigo Facio. Para la preparación de los vegetales se usaron las instalaciones y equipos de la Planta Piloto del CITA y para la evaluación química y microbiológica del estudio se usaron los Laboratorios de Microbiología del CITA, así como los Laboratorios de Química y de Microbiología de la Escuela de Tecnología de Alimentos. Para los análisis sensoriales se utilizó el Laboratorio de Análisis Sensorial del CITA.

3.2 Muestras

La elección de los vegetales utilizados en este estudio se hizo basado en los 5 vegetales de mayor consumo en Costa Rica en los últimos años, los cuales son tomate, papa, repollo, zanahoria y lechuga (PIMA, 2017). Se descartó el tomate por ser un vegetal que no se comercializa habitualmente en presentación de pelado o troceado y el repollo fue objeto de otro estudio paralelo a este. Es así como se eligieron la papa, la zanahoria y la lechuga.

Se utilizaron lechugas, zanahorias y papas enteras sin pelar compradas en un supermercado local. Todas las muestras se compraron en el mismo supermercado durante la duración del estudio. En cuanto a las variedades, los supermercados no distinguen entre variedades de zanahoria a granel por lo que se compró la que estaba disponible. Para el caso de la papa, se compró la papa amarilla (no roja) y en el caso particular de la lechuga, de la cual sí hay varios tipos en los supermercados, se utilizó la lechuga americana de cultivo tradicional (no orgánica, ni hidropónica).

Se eligieron papas, lechugas y zanahorias de tamaños y formas similares para que las superficies de cada vegetal a evaluar fueran parecidas entre sí. Además, las papas eran todas medianas con un peso individual que varió entre 90 y 140 gramos. Las zanahorias eran también medianas con un peso individual de 100 a 140 gramos cada una.

3.3 Preparación de los vegetales

Una vez comprados los vegetales se procedió a utilizarlos en diferentes presentaciones, las cuales se describen a continuación (estos no fueron lavados para evitar mayor variabilidad en los experimentos):

- Lechuga entera: se refiere a las hojas de lechuga, las cuales se separaron del tallo de forma manual.
- Lechuga troceada o en tiras: para la preparación de esta presentación se tomaron las lechugas y se cortaron de forma manual con un cuchillo. Los trozos eran de alrededor de 1 cm de ancho y del largo de la hoja que se utilizó. Se escogieron hojas de tamaño similar para controlar el largo de la tira de lechuga.
- Papa entera: se refiere a la papa entera, sin pelar y sin trocear, con su cáscara.
- Papa pelada: se peló la papa por medio de un pelador abrasivo Hobart (modelo 6115).
- Papa en trozos: se utilizó la papa pelada, la cual se troceó en una troceadora Hobart (modelo 4812), que permite cortarlas en forma de “papas a la francesa”; los trozos fueron de alrededor de 8 x 8 mm de ancho y de entre 7 y 10 cm de longitud, al usar el disco de 5/16”.
- Papa rallada: se utilizó la papa pelada para después rallarla en una troceadora Hobart (modelo 4812) con el disco #11 que permite generar rallado de 3 mm.
- Zanahoria entera: se refiere a la zanahoria sin pelar y sin cortar, con su cáscara.
- Zanahoria pelada: se utilizó un pelador abrasivo Hobart (modelo 6115).
- Zanahoria en trozos: se utilizó el pelado abrasivo y posteriormente se troceó en una troceadora Hobart (modelo 4812) para obtener trozos iguales a los que se describieron para la papa troceada. Estos trozos fueron de alrededor de 8 x 8 mm de ancho y de entre 7 y 10 cm de longitud, al usar el disco de 5/16”.
- Zanahoria rallada: se utilizó la zanahoria pelada y se ralló en una troceadora Hobart (modelo 4812) con el disco #11 que permite generar rallado de 3 mm.

Los vegetales se utilizaron de forma inmediata.

3.4 Preparación de las disoluciones de cloro

Se utilizó como disolución madre, cloro comercial con una concentración de 3,5% (35 000 ppm). Antes de usar esta disolución de cloro se verificó su concentración por medio de la medición de cloro total con el clorímetro, como se describe en la sección 3.10.1. Una vez obtenida la concentración exacta de la disolución madre, se realizaron los cálculos correspondientes para preparar cada disolución de trabajo a utilizar. Para esto, se utilizó la siguiente fórmula matemática:

$$\text{volumen disolución madre} \times \text{concentración disolución madre} = \text{volumen a preparar} \times \text{concentración deseada}$$

Por ejemplo: si la concentración de la disolución madre fue de 35 000 ppm, para preparar las disoluciones de cloro a 200 ppm se tomó una alícuota de la disolución madre de 2,9 mL y se

disolvió en 500 mL de agua. Se verificó la concentración obtenida por medio de la medición de cloro total con el clorímetro.

A las diferentes disoluciones de cloro que se utilizaron se les midió (además de la concentración) la temperatura y el pH. La temperatura no podía superar los 25 °C y el pH debía estar entre 6,5 y 7,5.

Las disoluciones de cloro preparadas se usaron de inmediato para que el cloro no se degradara ni volatilizara.

3.5 Inoculación de los vegetales

3.5.1 Preparación del inóculo

Para el estudio se utilizó la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739, la cual se encontraba almacenada en congelación a -70° C en Caldo Infusión Cerebro Corazón con glicerol. Esta cepa se cultivó en agar tripticasa soya (ATS – Oxoid) 18 horas antes de la inoculación de los vegetales y se incubó a 35° C.

Después de las 18 horas de incubación de la bacteria en ATS, se preparó un inóculo de la siguiente forma (FDA, 2001²):

- Se tomó un tubo de ensayo con 9 mL de solución salina 0,85% estéril
- Se tomó una asada pequeña de las colonias aisladas de *E. coli* que estaban en el agar ATS y se disolvieron en el tubo con solución salina 0,85% estéril
- Se comparó visualmente la turbidez del tubo del inóculo con un estándar de McFarland de 1,0
- Se agregó asadas del microorganismo hasta obtener la turbidez del estándar de McFarland 1,0

Este tubo posee una concentración de *E. coli* de alrededor de $3,0 \times 10^8$ UFC/mL. Cada vez que se quería inocular vegetales con *E. coli* se preparó un nuevo inóculo; es decir, las soluciones de inóculo preparadas no se almacenaron (FDA, 2001²).

Para determinar la carga inicial real del inóculo preparado se usó el procedimiento descrito en la sección 3.10.2.

3.5.2 Procedimiento de inoculación

Todas las presentaciones de los vegetales se inocularon con la suspensión de alrededor de 10^8 UFC/mL por medio de microgoteo, de la siguiente forma:

- Vegetales enteros, pelados y troceados: se tomó cada unidad de estudio (lechuga en hojas, papa entera, papa pelada, papa troceada, zanahoria entera, zanahoria pelada y zanahoria troceada) y se inocularon con un volumen conocido de la disolución de *E. coli* entre 0,1 y 1 mL dependiendo de la presentación del vegetal. Esta operación se realizó al colocar la suspensión en una micropipeta e ir colocando gotas de esta suspensión en toda la superficie del vegetal. Durante todo momento se emplearon guantes estériles nuevos o utensilios estériles para manipular el vegetal de forma aséptica.
- Vegetales rallados: se pesaron 25 gramos de la lechuga troceada y de la papa y zanahoria ralladas; estos 25 gramos se colocaron en una bolsa de stomacher y se inocularon por goteo con micropipeta con un volumen conocido del inóculo bacteriano tal y como se describió para los vegetales enteros y pelados. Se revolvió bien el vegetal con el inóculo por medio de utensilios estériles. Una vez pasado el tiempo de secado, se transfirió los vegetales a una nueva bolsa de stomacher con tenedor estéril, con el objetivo de analizar solamente el vegetal inoculado, y no inóculo que pudiera haberse transferido a la bolsa. Nuevamente se usó técnica aséptica para no contaminar los vegetales.

Para todas las presentaciones de vegetales, se esperó alrededor de 20 minutos para que el inóculo se secara e interactuara con el tejido vegetal, antes de continuar con las siguientes etapas de análisis.

3.6 Estudio del efecto del pelado y el troceado del vegetal sobre la concentración de cloro en el tiempo, en la disolución desinfectante

3.6.1 Diseño experimental

Se usó un diseño irrestricto al azar con arreglo factorial donde el factor tiempo se analizó como variable continua a siete niveles (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos) y el factor presentación del vegetal con los niveles descritos a continuación según cada caso (Cuadro 2):

Cuadro 2. Arreglo factorial utilizado en el estudio del efecto del pelado y el troceado del vegetal sobre la concentración de cloro en la disolución desinfectante

Vegetal	Presentación	Diseño factorial
Lechuga	Entera	3 X 7
	Troceada	
	Control (sin lechuga)	
Papa	Entera	5 X 7
	Pelada	
	Troceada	
	Rallada	
	Control (sin papa)	
Zanahoria	Entera	5 X 7
	Pelada	
	Troceada	
	Rallada	
	Control (sin zanahoria)	

En este experimento se colocó cada presentación del vegetal descrito en el apartado 3.3 en recipientes por separado con disoluciones de cloro a 200 ppm durante 30 minutos. Se colocó el vegetal en proporción 1:15 (masa:volumen) con respecto a la disolución de cloro; es decir, que por cada gramo de vegetal a desinfectar se usaron 15 mL de una disolución de cloro. Por ejemplo: para desinfectar 100 gramos de lechuga troceada se usó un total de 1500 mL de disolución de cloro. Esto permitió que, en todos los casos, los vegetales quedaran totalmente sumergidos o inmersos en la disolución. La literatura no muestra consenso en cuanto a la proporción a utilizar, por lo que, se eligió la anterior por medio de pruebas preliminares para garantizar que todas las presentaciones de los vegetales se encontraran sumergidas totalmente en la disolución.

Cada 5 minutos, se agitaron los vegetales en la disolución desinfectante por medio de una cuchara y se tomaron alícuotas de 10 mL de la disolución de cloro en la que estos se encontraban. Se les midió la concentración de cloro residual y cloro total como se describe en 3.10.1.

Se realizaron 3 repeticiones independientes de cada experimento (3 repeticiones para cada presentación de vegetal). Además, se realizó un control el cual consiste en tener el mismo recipiente con cloro a 200 ppm, pero sin ningún vegetal en su interior. A este control, también se le midió la concentración de cloro total y residual cada 5 minutos durante un período total de 30 minutos.

3.6.2 Análisis de resultados

A los datos obtenidos de la desinfección de cada vegetal, se les aplicó un análisis de varianza para medidas repetidas por medio del programa JMP 5.0.1.2 para evaluar la significancia de los factores tiempo (continuo) y presentación del vegetal (nominal) sobre la concentración de cloro. Se evaluaron las interacciones entre los factores.

En todos los casos se reportó la concentración de cloro total con el correspondiente intervalo de confianza del 95%.

Debido a que la interacción entre el factor tiempo y el factor vegetal resultó significativa en algunos casos, se usaron análisis estadísticos posteriores para determinar las diferencias entre los tratamientos. Para esto, se realizó un análisis de varianza y la prueba de Tukey con los valores para el tiempo final del análisis (30 minutos). Se eligió el tiempo final del análisis, de 30 minutos, con el fin de entender la interacción del resultado anterior. Se puede observar en los gráficos que el ajuste no pareciera ser lineal por lo que no se analizaron las curvas de comportamiento ni sus respectivas ecuaciones. Además, no era objetivo de este estudio calcular las ecuaciones relacionadas con este comportamiento.

Además, para complementar el análisis de resultados, se realizó un análisis de varianza y una prueba de Tukey a los datos de desinfección de los vegetales más subdivididos (lechuga troceada, papa rallada y zanahoria rallada) a los 30 minutos de desinfección, que permitiera compararlos entre sí y con el control.

En estas y las pruebas subsiguientes se analizaron los datos con un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0,05$) y para efectos no significativos se reportó la potencia de la prueba ($1 - \beta$).

3.7 Estudio del efecto del pelado y el troceado del vegetal sobre la reducción de *E. coli* durante su desinfección con cloro

3.7.1 Diseño experimental

Se usó un diseño irrestricto al azar para cada uno de los vegetales, el cual se describe en el Cuadro 3:

Cuadro 3. Tratamientos utilizados en el estudio del efecto del pelado y el troceado del vegetal sobre la reducción de *E. coli* durante su desinfección con cloro

Vegetal	Tratamientos	
	Disolución con cloro a 200 ppm	Control (agua destilada)
Lechuga	Entera	Entera
	Troceada	Troceada
Papa	Entera	Entera
	Pelada	Pelada
	Troceada	Troceada
	Rallada	Rallada
Zanahoria	Entera	Entera
	Pelada	Pelada
	Troceada	Troceada
	Rallada	Rallada

Se realizaron 3 repeticiones independientes de cada experimento. Además, para cada uno de los tratamientos se realizó un control que consistió en sumergir el vegetal a analizar en agua sin cloro adicionado.

En este experimento se inocularon todas las presentaciones de vegetales como se describió en la sección 3.5. Posteriormente se procedió a la desinfección de cada presentación de vegetal por separado, por inmersión en una disolución de cloro a 200 ppm. Se analizaron dos tiempos de desinfección, uno bajo de 5 minutos y uno alto de 30 minutos para cada presentación de vegetal. Se mantuvo la proporción masa de vegetal con respecto a volumen de disolución de cloro en 1:15.

Una vez concluido cada tiempo de desinfección, se procedió a realizar el cálculo de la reducción de *E. coli* tal y como se describe en el apartado 3.10.2.

3.7.2 Análisis de resultados

En este caso se utilizó un análisis de varianza (ANDEVA) por medio del programa JMP 5.0.1.2 para comparar los promedios de la reducción de cada vegetal por separado y determinar si había diferencias significativas en la reducción de *E. coli* entre los tratamientos aplicados a cada vegetal. En todos los casos se reportó la reducción de *E. coli* con el correspondiente intervalo de confianza del 95%. Cuando la interacción resultó significativa, se procedió a analizar

los resultados por medio de una Prueba de Tukey. Se analizaron los datos con un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0,05$) y para efectos no significativos se reportó la potencia de la prueba ($1 - \beta$).

3.8 Estudio del efecto del pelado y el troceado del vegetal sobre el residual de cloro en el producto después de su desinfección

3.8.1 Diseño experimental

Se usó un diseño irrestricto al azar para cada uno de los vegetales, similar al descrito en el Cuadro 3. Se realizaron 3 repeticiones independientes de cada experimento en un ensayo independiente al descrito en el apartado 3.6.

En este análisis se colocaron todas las presentaciones de los vegetales en recipientes por separado con disoluciones de cloro a 200 ppm. Se mantuvo la proporción 1:15 de masa del vegetal con respecto al volumen de disolución de cloro a utilizar. Estos vegetales permanecieron sumergidos durante 30 minutos. Se realizó una agitación cada 5 minutos.

Concluidos los 30 minutos, se retiraron las diferentes presentaciones de los vegetales de las disoluciones de cloro con un colador para escurrir el agua. Se escurrieron por alrededor de 1 minuto. Se colocaron los vegetales en una licuadora casera, de frasco de vidrio y se licuó el vegetal durante 30 segundos hasta obtener un puré (al menos 75 mL).

Posteriormente, se procedió a la medición del cloro total remanente en el vegetal tal y como se describe en la sección 3.10.1.

3.8.2 Análisis de resultados

Se usó un análisis de varianza (ANDEVA) por medio del programa JMP 5.0.1.2 para comparar los promedios del resultado de cloro total remanente en cada vegetal por separado y determinar si había diferencias significativas entre los tratamientos aplicados a cada vegetal en el remanente de cloro de cada uno. En todos los casos se reportó la concentración de cloro con el correspondiente intervalo de confianza del 95%. Cuando la interacción resultó significativa, se procedió a analizar los resultados por medio de una Prueba de Tukey. Se analizaron los datos con un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0,05$) y para efectos no significativos se reportó la potencia de la prueba ($1 - \beta$).

3.9 Estudio del efecto del pelado y el troceado del vegetal sobre sus características sensoriales después de la desinfección con cloro

3.9.1 Diseño experimental

Se usó la Prueba Triangular de Diferencia descrita en 3.10.3 (Pedrero y Pangborn, 1989 y Espinosa, 2007) para determinar si panelistas entrenados del CITA encontraban diferencias entre los vegetales desinfectados y sin desinfectar para las diferentes presentaciones.

Se usaron las diferentes presentaciones de los vegetales como se describe en el Cuadro 3. Se usaron disoluciones de cloro a 200 ppm para la desinfección de los vegetales durante 30 minutos. Se mantuvo la proporción 1:15 de masa del vegetal con respecto al volumen de la disolución de cloro para la desinfección.

Posteriormente se dieron a degustar los vegetales a los participantes del panel en las siguientes presentaciones:

- Lechuga troceada (la lechuga entera se troceó posterior a la desinfección y la lechuga troceada se sirvió de la misma forma en que se desinfectó, ya que es difícil para un panelista manipular una hoja de lechuga entera).
- Papa troceada (la papa entera y la papa pelada se trocearon después de su desinfección; la papa troceada se usó tal y como se desinfectó). Las papas se cocinaron al vapor por 20 minutos y se le agregó 0,5 gramos de sal. Posteriormente se hizo puré de papa con el aplastador de papas.
- Papa rallada (se desinfectó rallada), la cual se cocinó al vapor por 20 minutos y se le agregó 0,5 gramos de sal.
- Zanahoria troceada (desinfectada en su forma de trozos).
- Zanahoria rallada (la zanahoria entera y la zanahoria pelada se rallaron posterior a la desinfección, mientras que la zanahoria rallada se dio a los panelistas en la misma presentación en la que se desinfectó).

3.9.2 Análisis de resultados

Se usaron las tablas estadísticas asociadas con la prueba (Meilgaard *et al.*, 1991) y el nivel de significancia de 5% para determinar si hubo diferencia significativa entre los tratamientos (ver Anexo 1). En todas las pruebas participaron 19 o 20 panelistas.

Posteriormente, para comparar los resultados entre los diferentes vegetales, se usó la prueba de Chi Cuadrado (X^2) con la hipótesis de que no hay diferencia sensorial entre los vegetales desinfectados y los no desinfectados. Si el valor calculado de X^2 excedía el tabulado,

se concluyó que la hipótesis no era válida pues se detectaron diferencias (con un nivel de significancia del 5%). Si, por el contrario, el X^2 calculado era inferior al tabulado, se concluyó que no había evidencias que detecten diferencias entre los vegetales desinfectados y los no desinfectados (López *et al.*, 2001 y Espinosa, 2007).

3.10 Métodos de análisis

3.10.1 Medición de cloro total y residual

Estas mediciones se realizaron por medio de un clorímetro de la marca Chlorosense®, por lo que se siguieron las instrucciones descritas en el Manual del Equipo (Palintest, 2009).

3.10.2 Reducción de *E. coli*

La metodología de la prueba de reducción de *E. coli*, se basó en la enumeración o conteo de *E. coli* por medio del plateo en agar MacConkey y la comparación de los recuentos en los vegetales desinfectados y sin desinfectar. Para esto, se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Reducción de } E. coli (\log) = \log \text{ estándar de MacFarland} - \log \text{ vegetal desinfectado}$$

Donde la concentración del estándar de MacFarland (EMF) inoculado se calcula de la siguiente manera:

$$\log \text{ EMF} = \log [(UFC/mL \text{ recuento estándar de MacFarland} \times mL \text{ de inóculo})/g \text{ de muestra inoculado}]$$

Se utilizó el procedimiento para el recuento total de microorganismos aerobios descrito en FDA (2001²) y por Salfinger y Tortorello (2015) (APHA), con la adaptación de contar *E. coli* en el medio de cultivo MacConkey.

El procedimiento anterior se repitió para cada tratamiento de vegetal y para cada repetición del experimento realizada.

Para conocer el recuento inicial con el que se inoculó cada vegetal, se realizó un recuento de *E. coli* al estándar de MacFarland preparado (FDA 2001² y Salfinger y Tortorello, 2015), con la adaptación de contar *E. coli* en el medio de cultivo MacConkey.

Para determinar la reducción de *E. coli* se calcularon todos los resultados en log UFC/g o log UFC/mL según era el caso y se utilizaron las ecuaciones mencionadas anteriormente.

3.10.3 Prueba Triangular de Diferencia

Se usó la Prueba Triangular de Diferencia (Pedrero y Pangborn, 1989; Espinosa, 2007). En esta prueba se presentaron tres muestras simultáneamente, dos de ellas eran idénticas y una era de una formulación diferente. En este caso, la diferencia o similitud consistió en la desinfección o no desinfección del vegetal. El panelista debió indicar cuál de las tres era la muestra diferente. En este caso, se usaron las combinaciones de los alimentos descritos en el apartado 3.9.1 con vegetales desinfectados y sin desinfectar y los participantes fueron los panelistas entrenados del CITA. En todos los paneles participaron 19 o 20 panelistas.

Los panelistas recibieron tres muestras codificadas en las siguientes seis combinaciones: AAB, ABA, ABB, BBA, BAB, BAA. La misma letra indica muestras iguales y la letra diferente indica la posición de la muestra desigual. Se usó luz especial (roja) para que las personas no se guiaran por posibles cambios de color o apariencia sino únicamente por diferencias percibidas al degustar la muestra, atribuibles principalmente a sabor, olor y/o aroma, sin poder descartar que también influyan otros aspectos como textura, por ejemplo.

En la hoja de instrucciones se solicitó probar las muestras de izquierda a derecha y encerrar en un círculo el número de muestra diferente de las otras dos, además de enjuagarse la boca entre una muestra y otra, así como antes de continuar con el siguiente grupo.

Los resultados se analizaron valorando la posibilidad de acertar por azar, la cual es $1/3$ o 33,3%. Este comportamiento se ubica en la región de significancia de una sola cola en la distribución binomial. Se compararon los juicios totales realizados por cada panelista con los juicios acertados de cada uno y se calculó si había diferencias significativas entre los estándares (vegetales sin desinfectar) y las muestras utilizadas (vegetales desinfectados). Para esto, la prueba posee tablas estadísticas asociadas que se han estructurado para facilitar la determinación del número de respuestas correctas necesarias para establecer diferencia significativa. Estas tablas indican, a partir del número total de jueces, el número de juicios correctos mínimo para indicar diferencia significativa entre los dos alimentos. Se usó un nivel de significancia de 5%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los desinfectantes derivados del cloro, en especial el hipoclorito de sodio, son los desinfectantes mayormente utilizados para la desinfección de vegetales. El cloro se utiliza en la industria a concentraciones de 50 a 200 ppm por diferentes tiempos de contacto. La efectividad de la desinfección depende del desinfectante utilizado y su concentración, el tiempo de contacto, el pH de la disolución, la carga microbiológica presente, entre otros (Francis y O'Beirne, 2002; Garmendia y Vero, 2006 y FAO y OMS, 2008). Estos tratamientos de desinfección con cloro han sido sumamente criticados y generan controversia debido a que, según se ha reportado en la literatura, no siempre son efectivos para reducir la carga microbiológica o los patógenos de los vegetales (Garmendia y Vero, 2006; Rico *et al.*, 2007 y García-Robles *et al.*, 2017).

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en este estudio que permiten evaluar y relacionar el efecto del pelado, troceado y rallado de la lechuga, papa y zanahoria sobre su desinfección con cloro. Estos resultados pueden servir de guía a la industria alimentaria para sus operaciones de desinfección.

4.1. Determinación del efecto del pelado y el troceado del vegetal sobre la concentración de cloro, en el tiempo, en la disolución desinfectante

Primeramente, se evaluó el efecto del pelado y el troceado del vegetal sobre la concentración de cloro total en el tiempo, en la disolución desinfectante. Para esto, se colocaron las diferentes presentaciones de lechuga, papa y zanahoria en una disolución desinfectante a 200 ppm y se evaluó la concentración de cloro en la disolución cada 5 minutos en un período de 30 minutos.

Los resultados de concentración de cloro obtenidos para las presentaciones de lechuga y para cada tiempo de desinfección evaluado se presentan en la Figura 1.

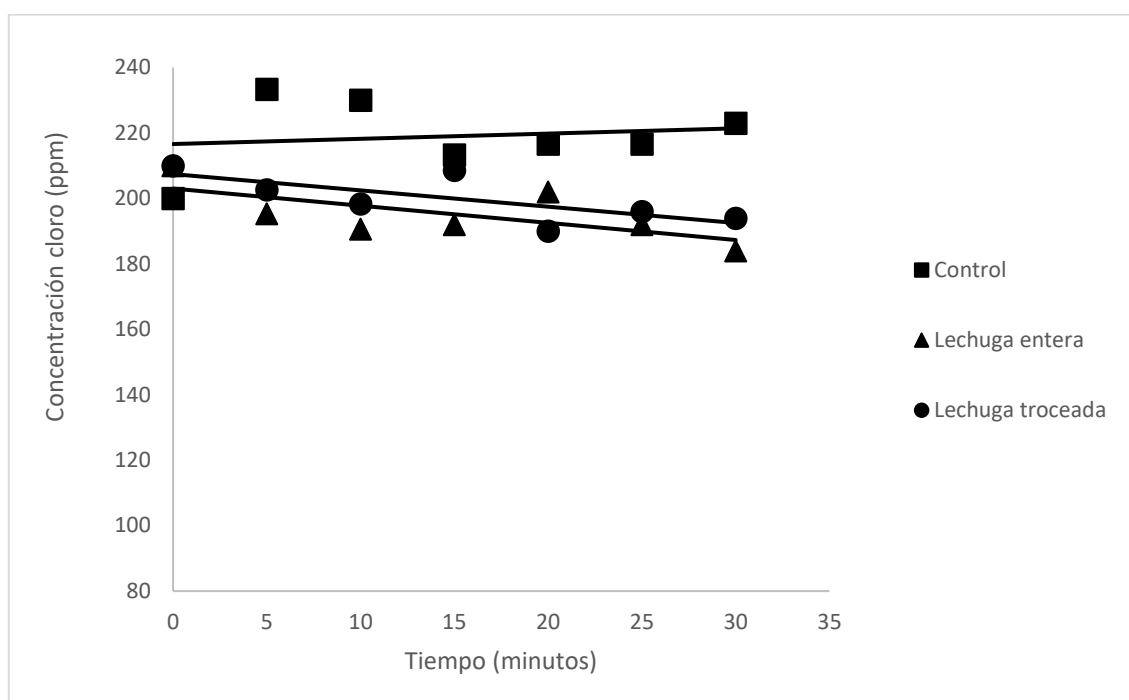


Figura 1. Concentración de cloro en la disolución desinfectante de diferentes presentaciones de lechuga evaluada cada 5 minutos, durante 30 minutos.

En el caso de la lechuga, donde se comparó hoja entera y troceada, el análisis estadístico indica que se encontró significancia únicamente para el factor presentación ($p < 0,05$). No se encontró significancia entre presentaciones en el tiempo ni en la interacción entre factores. La Figura 1 muestra cómo los valores de cloro para el control y las diferentes presentaciones de lechuga, en el tiempo, oscilan entre concentraciones de 184 ± 10 ppm y 233 ± 24 ppm, encontrándose que estas no son significativamente diferentes entre sí. Esto indica que no se encontraron diferencias en la concentración de cloro en el tiempo al desinfectar lechuga entera y lechuga troceada y que la concentración de cloro en el tiempo se mantiene, de la misma forma que se mantiene en el tratamiento control ($1 - \beta = 1,000$).

Entonces, de acuerdo con los resultados anteriores, la industria podría desinfectar hojas de lechuga o lechuga troceada, por un tiempo que va desde 5 hasta 30 minutos y el poder desinfectante de la disolución de cloro permanece en el tiempo y ejerce su función.

Para el caso de la papa y la zanahoria, el análisis de varianza indicó que la interacción entre el factor tiempo y el factor vegetal es significativa ($p < 0,0001$ en ambos casos) lo que indica que el comportamiento de la concentración de cloro en el tiempo en uno o más de los tratamientos es distinto y que hay que hacer análisis posteriores para saber cuál o cuáles tratamientos muestran dicha diferencia. Los resultados descritos para la papa se resumen en la Figura 2:

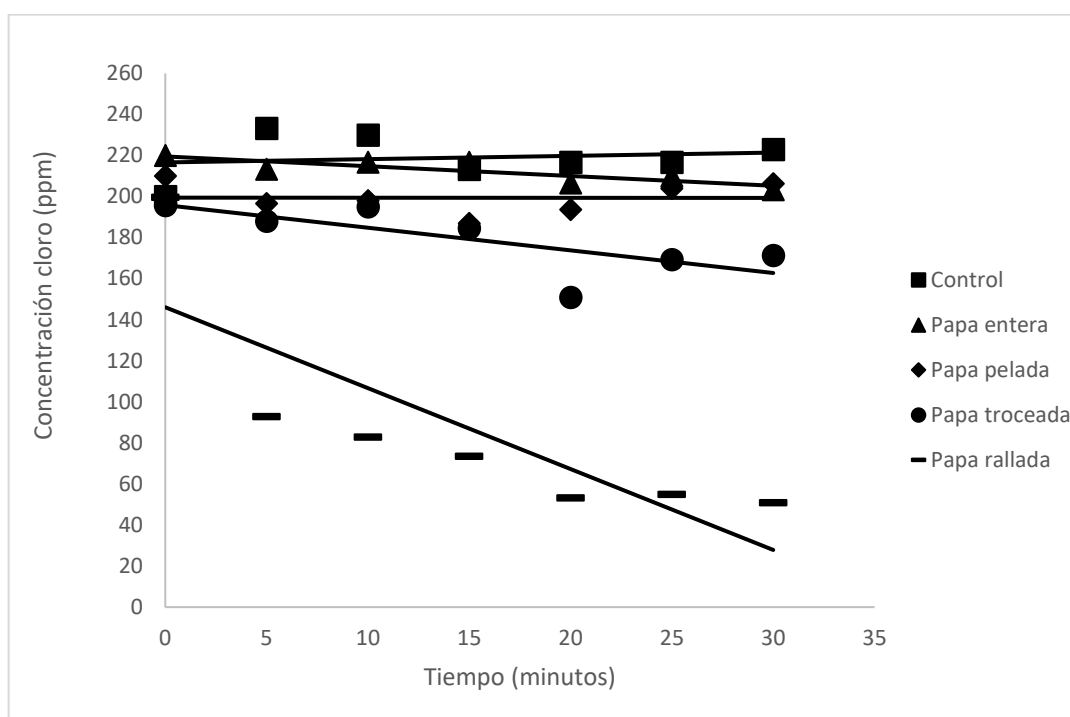


Figura 2. Concentración de cloro en la disolución desinfectante de diferentes presentaciones de papa evaluada cada 5 minutos, durante 30 minutos.

La Figura 3 muestra los resultados del análisis de concentración de cloro en la disolución desinfectante en el tiempo para el caso de la zanahoria en sus diferentes presentaciones.

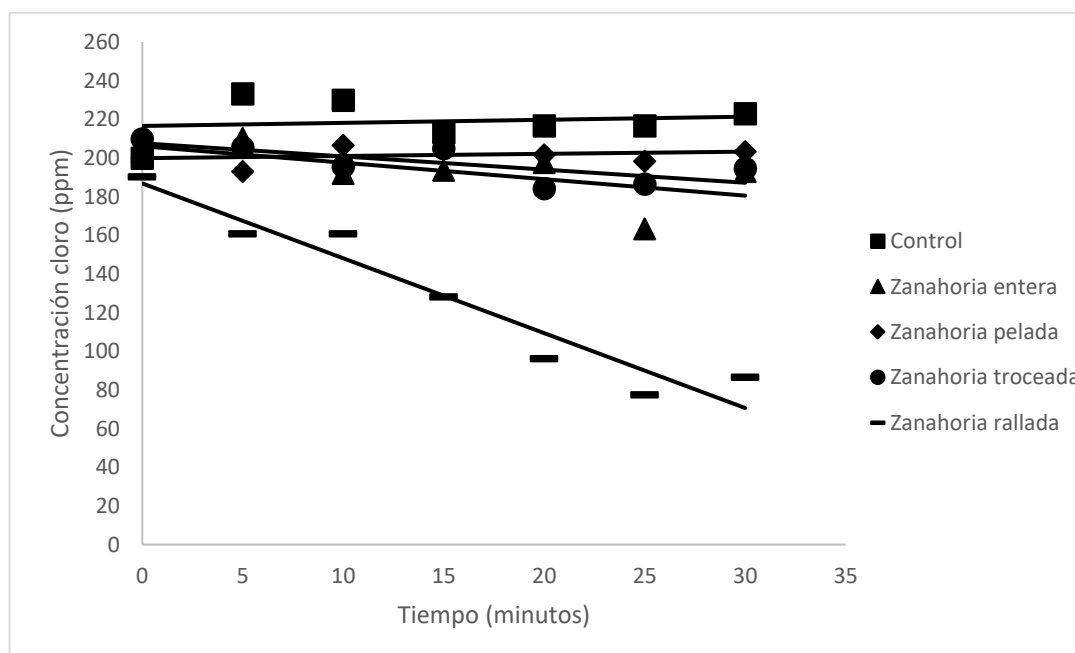


Figura 3. Concentración de cloro en la disolución desinfectante de diferentes presentaciones de zanahoria evaluada cada 5 minutos, durante 30 minutos.

En las Figuras 2 y 3, se observa que la concentración de cloro en la disolución desinfectante del control se mantiene constante en el tiempo, mientras que, al agregar los vegetales, los valores de esta concentración disminuyen conforme avanza el tiempo. Se realizó una prueba de Tukey a los 30 minutos de desinfección (tanto para las distintas presentaciones de papa como para las de zanahoria por separado) y esta concluyó que la disminución de la concentración de cloro se vuelve significativa ($p < 0,05$) para la papa rallada y la zanahoria rallada a los 30 minutos de desinfección. La concentración de cloro a los 30 minutos para papa rallada es de 51 ± 10 ppm y para zanahoria rallada, de 87 ± 13 ppm, mientras que el control se mantiene en una concentración de alrededor de 200 ppm. Entonces, en el caso de la papa y de la zanahoria, el hecho de usar el tratamiento de rallado hace que la concentración de cloro a los 30 minutos sea significativamente menor que la del control y que la de las demás presentaciones estudiadas.

Con base en los resultados anteriores, se decidió realizar una prueba estadística para comparar la concentración de cloro en el tiempo final (30 minutos) de las presentaciones más subdivididas y el control; es decir se procedió a comparar el control, la lechuga troceada, la zanahoria rallada y la papa rallada. Los resultados de esta prueba se observan en el Cuadro 4:

Cuadro 4. Resultado de la prueba de Tukey para la evaluación del efecto del pelado y el troceado de la lechuga, papa y zanahoria sobre la concentración de cloro, en la disolución desinfectante, a 30 minutos de la desinfección.

Presentación	Concentración de cloro a los 30 minutos de desinfección (ppm $\pm$ IC)*
Control	223 ± 24^a
Lechuga troceada	194 ± 8^a
Zanahoria rallada	87 ± 13^b
Papa rallada	51 ± 10^c

IC: intervalo de confianza al 95%

*Tratamientos con letras distintas significan que hay diferencia significativa ($p < 0,05$).

El análisis de varianza detectó significancia en la interacción concentración de cloro y la presentación del vegetal ($p < 0,05$), por lo que se procedió a realizar la prueba de Tukey.

De acuerdo con lo anterior, las concentraciones de cloro en la disolución desinfectante a los 30 minutos, donde se desinfectó la papa rallada y la zanahoria rallada, son diferentes significativamente a la concentración de cloro del control en este mismo tiempo ($p < 0,05$ en ambos casos). No se encontraron diferencias entre el comportamiento de la lechuga troceada y el control en el tiempo analizado, lo cual corresponde a una tendencia constante, indicando que durante 30 minutos el cloro mantiene su concentración inicial. Esto implica que no se detectaron

diferencias en la concentración de cloro al inicio de la desinfección y a los 30 minutos de esta, al desinfectar la lechuga troceada, mientras que, en el caso de la zanahoria rallada y la papa rallada, esta concentración disminuye considerablemente en el tiempo.

Los resultados anteriormente descritos podrían relacionarse con la composición de los vegetales analizados. La papa contiene alrededor de 17% de carbohidratos, de los cuales un 15% corresponde al almidón; así también su contenido de agua ronda el 75%, el cual es menor que el de la lechuga y la zanahoria. Así, la lechuga tiene un 95% de agua y tan solo un 2% de carbohidratos. Con respecto a la zanahoria, posee 88% de agua y 10% de carbohidratos en su composición (Butnariu y Butu, 2014). Entonces, el caso de la papa rallada parece indicar que el vegetal con mayor contenido de almidón puede oxidar el cloro más rápido que uno con mayor contenido de agua, dado que la lechuga troceada no se comportó así. Por otro lado, para el caso de la zanahoria, podría ser que su mayor contenido de carbohidratos explique la diferencia encontrada entre este tratamiento y la lechuga. De forma general se propone que hay una interacción entre el cloro y el almidón de la papa, así como con los carbohidratos de la zanahoria, la cual desfavorece que se mantenga la concentración de cloro en la disolución desinfectante en el tiempo. Esto no sucede en el caso de la lechuga cuyo componente principal es el agua.

No se encontraron estudios que soporten el planteamiento anteriormente mencionado y que hayan sido realizados con desinfecciones utilizando disoluciones de hipoclorito de sodio como tal; sin embargo, hay un estudio con dióxido de cloro donde realizaron pruebas de desinfección agregando diferentes componentes a las disoluciones desinfectantes, que funcionaran como modelos de adición de proteínas, lípidos, almidones y NaCl. En este caso, los autores encontraron que, para dióxido de cloro, no se encontró diferencia significativa en la desinfección al agregar almidón soluble o NaCl, mientras que sí hay diferencia al agregar lípidos o proteínas. En este caso, la reducción de microorganismos disminuye en presencia de lípidos o proteínas (Vandenkinderen *et al.*, 2009). En el artículo científico citado no se obtuvieron, para el almidón (como un ejemplo de carbohidrato), los mismos resultados mostrados en el presente estudio al relacionar lechuga, papa y zanahoria. Por otra parte, tampoco se evaluó el efecto de distintos tipos de carbohidratos, por lo que sería necesario realizar estudios posteriores para poder comprobar las hipótesis en cuanto a la disminución de la concentración de cloro y de la capacidad desinfectante de este, en presencia de matrices con diferentes composiciones químicas como las estudiadas.

Las diferencias en la concentración de cloro en el tiempo en el presente estudio podrían deberse también a que la lechuga es un vegetal de hoja, mientras que la zanahoria y la papa no lo son. Este punto será abordado más adelante en esta discusión de resultados.

Por otro lado, cuando se aumenta el área de troceado del producto, rallando el vegetal, y exponiendo así mayor cantidad de tejido vegetal (materia orgánica), la velocidad de disminución de la concentración de cloro en la disolución aumenta. Esto tiene su fundamento en que este tipo

de operaciones permiten la salida de fluidos y nutrientes del vegetal, al romper su tejido, y aumentan la cantidad de materia orgánica presente, lo que inactiva de forma más rápida al hipoclorito de sodio (Wu *et al.*, 2000; Herruzo, 2000; Erickson, 2010; Eifert y Sanglay, 2002 y Wassim- Siddiqui y Shafiur-Rahman, 2015). En el caso de la zanahoria rallada, se parte de una disolución con una concentración de 200 ppm, que en 30 min se reduce hasta alcanzar valores cercanos a 87 ± 13 ppm, diferenciándose significativamente ($p < 0.05$) de lo que sucede con la zanahoria troceada, para la cual no se encontró diferencia con el control en cuanto al comportamiento de la concentración de cloro en el tiempo. Finalmente, para la papa rallada, la disminución de la concentración de cloro en el tiempo fue aún más acelerada ($p < 0.05$) que en la zanahoria rallada, partiendo de 200 ppm y terminando en valores cercanos a 51 ± 10 ppm después de 30 min. En el caso de la lechuga, al haberse subdividido por medio del troceado y no del rallado, no se da el fenómeno que se describe anteriormente de aumento de área tan pronunciado como sí sucede en el rallado de la papa y la zanahoria.

Las diferencias anteriormente citadas podrían nuevamente atribuirse a variaciones en la composición química de los vegetales, partiendo del hecho que la papa es la que tiene mayor contenido de carbohidratos en su composición total y es en la que la disminución de concentración de cloro en el tiempo fue mayor. Así, la zanahoria es el vegetal analizado cuyo contenido de carbohidratos es intermedio (menor que en la papa y mayor que en la lechuga) por lo que la concentración de cloro en el tiempo desciende, pero en menor medida que en el análisis de papa.

Aunque en este caso no se detectó diferencia significativa entre la disminución de cloro en la disolución desinfectante al agregar lechuga entera o lechuga troceada, hay un estudio de Luo y colaboradores (2012) que indica que, al agregar lechuga rallada a una disolución desinfectante de 20 mg/L, la concentración de cloro disminuía hasta niveles no detectables de cloro. En este caso se agregaron 540 kg de lechuga rallada en 3200 litros de agua con cloro, lo que representa una relación de masa del vegetal con respecto al volumen de la disolución de cloro de 1:6, a diferencia de la relación de 1:15 utilizada en el presente estudio. Las diferencias encontradas en los resultados de ambos estudios de lechuga podrían deberse entonces a esa relación entre la masa del vegetal desinfectado y el volumen de la disolución desinfectante, lo que indica que este parámetro es muy importante para garantizar la efectividad de la desinfección.

Cabe mencionar la importancia de estos resultados, ya que la mayoría de los modelos y estudios realizados para estudiar desinfección con cloro utilizan lechuga y zanahoria por ser de los vegetales listos para comer de mayor consumo y por sus diferencias, uno es de hoja y el otro de raíz y poroso (Rico, *et al.*, 2007). Los estudios en papa son muy escasos y estos resultados pueden aportar datos de importancia.

Como conclusión práctica y transferible a la industria de vegetales, se puede establecer que el mantenimiento del poder desinfectante del cloro en disolución, en el tiempo, depende del estado de subdivisión del vegetal y de su composición química. La concentración de cloro en el tiempo se mantiene y parece ser adecuada para desinfectar vegetales de hoja como la lechuga, enteros o troceados y también vegetales como la papa y la zanahoria, enteros sin pelar, pelados y con troceados “gruesos”. En el caso de los vegetales rallados, pareciera que el cloro debe utilizarse con reservas y que la operación de desinfección debería realizarse antes del rallado del vegetal. Además, la industria debería tomar en cuenta la composición química del vegetal en el diseño de los tratamientos de desinfección, ya que vegetales con mayor contenido de carbohidratos podrían requerir desinfecciones distintas que los vegetales cuya composición mayoritaria es el agua.

El estudio de la concentración de cloro en el tiempo durante la desinfección de los vegetales, en las diferentes presentaciones estudiadas, es importante ya que de estos parámetros va a depender la eficacia de la desinfección, es decir, la cantidad de microorganismos que logren reducirse en los vegetales al sumergirlos en la disolución de cloro por un tiempo definido.

4.2 Determinación del efecto del pelado y el troceado sobre la reducción de *E. coli* durante la desinfección con cloro en los vegetales

Para las mismas presentaciones de los tres vegetales estudiados en el objetivo anterior, se determinó la reducción de *E. coli* después de 5 y 30 minutos de contacto con la disolución desinfectante de cloro con una concentración inicial de 200 ppm. Como se observó que el cloro mantiene su poder en algunos casos y en otros casos a los 30 minutos ha disminuido de 200 ppm a 50 ppm, se consideró necesario realizar la valoración para los dos tiempos de desinfección. A nivel industrial un tiempo de desinfección de 5 minutos es considerado corto y es generalmente utilizado; sin embargo, un tiempo de desinfección de 30 minutos se considera largo (FAO y OMS, 2008).

En el Cuadro 5 se muestran las reducciones promedio de *E. coli* encontradas para las presentaciones de lechuga.

Cuadro 5. Reducciones logarítmicas promedio ($\log_{10}$ UFC/g) de *E. coli* según presentación de la lechuga, presencia de cloro en la disolución (inicial 200 ppm) y tiempo de contacto con la disolución desinfectante.

Presentación	Con cloro en la disolución	Tiempo (min)	Reducciones logarítmicas promedio ($\log_{10}$ UFC/g $\pm$ IC) de <i>E. coli</i>
Lechuga entera	Si	5	2,8 $\pm$ 0,8
	No	5	2 $\pm$ 1
	Si	30	3 $\pm$ 1
	No	30	1,9 $\pm$ 0,9
Lechuga troceada	Si	5	2,0 $\pm$ 0,7
	No	5	1,5 $\pm$ 0,5
	Si	30	2,7 $\pm$ 0,4
	No	30	2 $\pm$ 0

IC: intervalo de confianza al 95%

De acuerdo con el análisis de resultados, no se encontraron interacciones significativas para el caso de la lechuga. Esto indica que las reducciones observadas de *E. coli* en los dos niveles de tiempo analizados, no dependen de la adición de cloro en la desinfección. Además, no se encontró diferencia significativa en la reducción de *E. coli* cuando la lechuga se desinfecta entera o cuando se desinfecta troceada ($1 - \beta = 1,000$). Sin embargo, se observó que la presencia de cloro, como efecto simple, si tiene un efecto significativo ($p=0,0116$) sobre la desinfección de lechuga, esto indica que hay mayores reducciones cuando se utiliza cloro en la disolución desinfectante que cuando se utiliza únicamente una inmersión en agua. Esto concuerda con los resultados descritos en el apartado 4.1, donde se describió que la concentración de cloro en el tiempo se mantenía constante y sin diferencias con el control para el caso de la lechuga entera y la lechuga troceada ($1 - \beta = 1,000$).

Lo anterior indica que el aumento de superficie al cortar la lechuga no es suficiente para que el tratamiento de desinfección sea inefectivo. Beuchat y Bracket (1990) evaluaron el crecimiento de *Listeria* sp. en hojas de lechuga y lechuga rallada bajo diferentes condiciones y encontraron que no había diferencia significativa en el crecimiento del microorganismo cuando la lechuga estaba en esas dos presentaciones, lo cual sugiere que podría suceder algo similar al evaluar otros microorganismos como *E. coli* en estas presentaciones de lechuga.

Así también, los resultados anteriores concuerdan con los de Brahsin y colaboradores (2000) quienes desinfectaron hojas de lechuga en disoluciones de cloro a concentraciones de 50 y 100 ppm por tiempos de 30 segundos, 2 y 5 minutos, obteniendo reducciones de *E. coli* de 1,7 a 2,8 log UFC/g, similares a las obtenidas en este estudio. Estos mismos autores encontraron diferencias significativas en los resultados de reducción del microorganismo en las hojas de

lechuga al usar disoluciones de cloro, en contraste con las hojas de lechuga inmersas en agua desionizada. Esto concuerda con lo descrito en este estudio, donde se observan mayores reducciones al utilizar cloro.

Otros estudios de desinfección con cloro a 100 ppm en lechuga demostraron reducciones de 3,5 logaritmos en lechuga cortada (5 X 5 cm). En este caso, el tiempo de contacto del vegetal con el desinfectante fue de 15 minutos (Bermudez-Aguirre y Barboza-Canovas, 2013). A diferencia de la literatura citada, en el presente estudio la reducción de la lechuga troceada se encuentra alrededor de los 2 logaritmos, tanto para los 5 como para los 30 minutos.

A continuación, en el Cuadro 6, se presentan los resultados para el caso de la papa:

Cuadro 6. Reducciones logarítmicas promedio ($\log_{10}$ UFC/g) de *E. coli* según presentación de la papa, presencia de cloro en la disolución (inicial 200 ppm) y tiempo de contacto con la disolución desinfectante.

Presentación	Con cloro en la disolución	Tiempo (min)	Reducciones logarítmicas promedio ($\log_{10}$ UFC/g $\pm$ IC) de <i>E. coli</i>
Papa entera	Si	5	3 ± 2
	No	5	2 ± 2
	Si	30	3 ± 2
	No	30	3 ± 1
Papa pelada	Si	5	$4,1 \pm 0,2$
	No	5	$3,0 \pm 0,1$
	Si	30	$4,8 \pm 0,9$
	No	30	$2,8 \pm 0,4$
Papa troceada	Si	5	2 ± 1
	No	5	1 ± 1
	Si	30	3 ± 1
	No	30	1 ± 1
Papa rallada	Si	5	$5,3 \pm 0,4$
	No	5	1 ± 1
	Si	30	$5,6 \pm 0,4$
	No	30	2 ± 1

IC: intervalo de confianza al 95%

Al realizar el análisis de resultados correspondiente a la papa, se encontró que la interacción entre el factor cloro y el factor presentación era significativa ($p=0,0018$); por lo tanto, el efecto de utilizar o no cloro en la disolución desinfectante depende del grado de subdivisión o presentación del vegetal. No se observaron diferencias significativas en los efectos simples ni en

las demás interacciones, para una potencia de prueba de 1,000. Lo anterior indica que la presentación o el procesamiento del vegetal y el tiempo de desinfección no influyen en la reducción de *E. coli* al desinfectar con cloro a 200 ppm, pero que, en alguno de los tratamientos analizados, se detectaron diferencias entre desinfectar con cloro a la concentración mencionada o utilizar únicamente agua. Para esto, se realizó un nuevo análisis de datos, sin considerar el tiempo de desinfección (por no tener efecto significativo) y los resultados se muestran en el Cuadro 7:

Cuadro 7. Reducciones logarítmicas promedio ($\log_{10}$ UFC/g) de *E. coli* según presentación de la papa y presencia de cloro en la disolución (inicial 200 ppm).

Presentación	Con cloro en la disolución	Reducciones logarítmicas promedio ($\log_{10}$ UFC/g $\pm$ IC) de <i>E. coli</i> *
Papa entera	Si	3 ± 1^{bc}
	No	$2,4 \pm 0,9^c$
Papa pelada	Si	$4,5 \pm 0,5^{ab}$
	No	$2,9 \pm 0,2^{bc}$
Papa troceada	Si	$2,5 \pm 0,8^c$
	No	$1,2 \pm 0,8^c$
Papa rallada	Si	$5,5 \pm 0,3^a$
	No	$1,6 \pm 0,9^c$

IC: intervalo de confianza al 95%

*Tratamientos con letras distintas indican diferencia significativa ($p < 0,05$)

De acuerdo con el análisis anterior, no se encontró diferencia significativa entre la desinfección con cloro y la inmersión en agua de la papa entera; es decir, la reducción de *E. coli* tiene valores similares al usar cloro o agua. Con respecto a este resultado, se considera que este efecto posiblemente se deba al arrastre del microorganismo a la disolución de agua o a la disolución de cloro y no al poder desinfectante de este. Lo mismo sucedió en el caso de la papa pelada y la papa troceada. A diferencia de lo anterior, desinfectar papa rallada con cloro ejerció reducciones de *E. coli* de $5,5 \pm 0,3 \log$ UFC/g, mientras que la inmersión en agua redujo únicamente $1,6 \pm 0,9 \log$ UFC/g, ambos valores son significativamente diferentes. Esto quiere decir que hay un beneficio al desinfectar papa rallada con cloro, al compararlo con el uso de agua. Si comparamos este resultado con los descritos en el apartado 4.1 (el cloro se reduce significativamente en el tiempo para la presentación de papa rallada) y con el efecto de la desinfección con cloro en la reducción del microorganismo (el factor tiempo resultó no significativo), se puede sugerir que el efecto de reducción de *E. coli* en papa rallada se da en los primeros 5 minutos de desinfección y no aumenta con el tiempo. Nuevamente, este es un dato

importante para la aplicación práctica industrial ya que es más eficiente realizar desinfecciones de 5 minutos que utilizar tiempos mayores.

Cabe mencionar que no se encontraron diferencias en la reducción de *E. coli* en papa rallada desinfectada con cloro en contraste con la desinfección de papa pelada, la cual fue de $4,5 \pm 0,5$ log UFC/g. Sin embargo, al aplicar cloro o únicamente agua, la papa pelada mostró los mismos resultados de reducción del microorganismo, por lo que no se puede atribuir la reducción descrita al cloro en la concentración estudiada.

Por último, se observa en el Cuadro 7, que la inmersión en agua en todas las presentaciones de papa ejerce la misma reducción de *E. coli*. Esto quiere decir que el efecto del arrastre por el agua es similar en las diferentes presentaciones de papa estudiadas y que no depende del tipo de procesamiento que se le aplique a la papa.

Los resultados de desinfección de zanahoria se muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Reducciones logarítmicas promedio ($\log_{10}$ UFC/g) de *E. coli* según presentación de la zanahoria, presencia de cloro en la disolución (inicial 200 ppm) y tiempo de contacto con la disolución desinfectante.

Presentación	Con cloro en la disolución	Tiempo (min)	Reducciones logarítmicas promedio ($\log_{10}$ UFC/g $\pm$ IC) de <i>E. coli</i>
Zanahoria entera	Si	5	$3,3 \pm 0,3$
	No	5	$2,6 \pm 0,4$
	Si	30	5 ± 2
	No	30	2 ± 1
Zanahoria pelada	Si	5	4 ± 1
	No	5	$2,6 \pm 0,9$
	Si	30	4 ± 2
	No	30	$2,6 \pm 0,9$
Zanahoria troceada	Si	5	3 ± 2
	No	5	2 ± 2
	Si	30	4 ± 1
	No	30	2 ± 1
Zanahoria rallada	Si	5	5 ± 3
	No	5	1 ± 1
	Si	30	$5,9 \pm 0,7$
	No	30	1 ± 1

IC: intervalo de confianza al 95%

Al igual que en el caso de la lechuga, para la zanahoria no hay interacciones significativas ($1 - \beta = 1,000$). El efecto de la presentación (entero, pelado, troceado o rallado) o del tiempo no está influyendo en la reducción de *E. coli* cuando la zanahoria se desinfecta. Sin embargo, nuevamente el cloro sí tiene un efecto significativo ($p < 0,0001$) sobre la desinfección de zanahoria, lo que indica que hay mayores reducciones cuando se utiliza cloro en la disolución desinfectante que cuando se utiliza únicamente agua.

La dificultad de desinfectar vegetales como la zanahoria radica en que se ha demostrado que, al ser un vegetal poroso, los microorganismos logran penetrar el tejido vegetal y protegerse del desinfectante (Bermudez-Aguirre y Barboza-Canovas, 2013). Los resultados en este estudio son variados y esta variabilidad podría deberse a que algunas células de los microorganismos se hayan protegido del desinfectante en el tejido vegetal, mientras que otras hayan permanecido en la superficie.

El hecho de no observarse un efecto significativo del tiempo en la desinfección de lechuga, papa y zanahoria es de suma importancia para la industria. En otras palabras, no hay beneficio de aumentar el tiempo de desinfección 25 minutos para eliminar la contaminación bacteriana que pueda tener el vegetal. Esto tiene una aplicación práctica muy importante, pues representa un beneficio en ahorro de tiempo de proceso. Además, en el primer objetivo de este estudio se observó cómo conforme avanza el tiempo de desinfección, la concentración de cloro disminuye y en ocasiones alcanza concentraciones bajas, comparadas con la disolución de cloro colocada inicialmente. Esto sugiere que el efecto de la desinfección con cloro, y como consecuencia la reducción de *E. coli*, sucede en los primeros minutos de la desinfección, cuando todavía hay suficiente cloro disponible para ejercer esta disminución de la bacteria en el vegetal.

En todos los casos, hay diferencias que pueden atribuirse al tiempo que hay entre la aplicación del inóculo y la desinfección. Este tiempo influye en la capacidad de los microorganismos para adherirse a las superficies de los vegetales, además de que diferentes microorganismos van a colonizar de forma diferente el tejido vegetal en el tiempo (Delaquis, *et al.*, 2004).

Estudios indican que los microorganismos tienen la capacidad de penetrar en los tejidos vegetales bajo las condiciones adecuadas. Bermudez-Aguirre y Barboza-Canovas (2013) indican que, en vegetales de hoja como la lechuga, los microorganismos tienen la capacidad de migrar a zonas de la hoja donde se protegen del desinfectante. En otro estudio realizado en lechuga, con desinfección con cloro a 200 ppm, encontraron que las células de *E. coli* sobrevivían mejor en las estructuras internas del tejido vegetal o en tejido dañado, que en la superficie de la hoja. Estos autores evaluaron la viabilidad de las células de *E. coli* y los resultados demostraron que había 46 – 51% de células viables cuando la penetración bacteriana era de 0 a 10 μm y la viabilidad celular aumentaba a 68% cuando las células se internalizaban 30 a 40 μm en el tejido celular (Takeuchi y Frank, 2001). Para que ocurra esta interacción entre los microorganismos y

el tejido celular, debe haber un tiempo desde la colocación del inóculo hasta que se realice la desinfección. Como se mencionó en la metodología, en el caso de la lechuga entera y troceada, se esperó al menos 20 minutos y se corroboró visualmente que el inóculo colocado estuviera seco para proceder con la desinfección. Esto puede favorecer el contacto microorganismo – vegetal, tanto en la presentación en hoja como en la presentación troceada, e impedir observar diferencias entre ambas presentaciones de la lechuga.

Otro aspecto importante por considerar es el posible efecto de arrastre que existe al sumergir los vegetales en cualquier disolución desinfectante. El agua presente en la disolución desinfectante y el agua del control permiten arrastrar parte de los microorganismos inoculados en el vegetal. Esto sucede en cualquier estudio donde se utilicen desinfectantes en disolución acuosa. Para el caso de todas las presentaciones de lechuga, las presentaciones de zanahoria y la papa rallada, la desinfección con cloro fue estadísticamente diferente a la inmersión en agua y sin desinfectante. Esto indica que la reducción del microorganismo, para estas presentaciones, se debió principalmente al efecto desinfectante y no al efecto de arrastre que ejerció la disolución acuosa. Aspectos que podrían influir en que el cloro haya ejercido su poder desinfectante en este caso de forma significativa, pueden ser la interacción del desinfectante con poca materia orgánica presente y que el microorganismo no haya logrado su internalización en el tejido celular. Hay una diferencia importante con respecto a esto según el vegetal y su presentación. En el caso de la lechuga y la zanahoria, se observó la diferencia entre desinfección con cloro e inmersión en agua para todas las presentaciones, mientras que, en el caso de la papa, se observó únicamente para papa rallada. Estas diferencias podrían atribuirse al hecho de que la lechuga y la zanahoria contienen mayor cantidad de agua que la papa en su composición vegetal, mientras que la papa contiene mayor cantidad de almidón. Al rallar la papa, se rompe el tejido vegetal y hay salida de agua, lo que puede haber contribuido a que la papa rallada se comporte similar a vegetales con mayor contenido de agua como la lechuga y la zanahoria, mientras que la papa entera, la papa pelada y la papa troceada, compuestas mayormente por almidón, interactuaron de forma distinta con la disolución desinfectante.

Los resultados de desinfección van a variar para cada presentación del vegetal utilizado y para el microorganismo meta que se quiera reducir. Por ejemplo, hay un estudio de Wu y colaboradores (2000) que indica que la desinfección con cloro a 150 ppm del perejil entero (sin trocear) logra reducir *Shigella sonnei* en 6 logaritmos. Estos resultados son optimistas debido a que este microorganismo es lábil fuera de su hábitat normal. Francis y O'Beirne (1997) reportan reducciones de 0,5 a 1 log en la población microbiana de lechugas ralladas desinfectadas con cloro a 100 ppm por 5 minutos. Otros autores estudiaron el lavado y desinfección de apio y repollo, concluyendo que se logra reducir 2 log de la carga microbiológica estudiada (López et al., 2003).

En general, es importante mencionar que si se establece una meta de 5 logaritmos de reducción para el proceso de desinfección, como lo propone la FDA (Venkitanarayanan *et al.*, 2002), y por ser el criterio más estricto, los únicos tratamientos estudiados que lo garantizan son los aplicados a la papa y la zanahoria ralladas. Se recomienda continuar investigando para entender en qué condiciones de proceso se puede validar la operación para dicha meta en las demás presentaciones de vegetales. Esto concuerda con la mayoría de los estudios que indican que las desinfecciones con cloro logran inactivaciones o remociones parciales de los microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae*, como *E. coli* (Seo y Frank, 1999) y que en general, es difícil que la desinfección de vegetales con cloro alcance la meta de 5 log (FAO y OMS, 2008). Otra alternativa, sería revisar la meta en función de las cargas normales de contaminación fecal que poseen estos productos. Además, algunos autores recomiendan evaluar la posibilidad de encontrar patógenos en ciertos vegetales y tomar esto en cuenta para diseñar los procesos de desinfección. El hecho de incluir en baldes de inmersión cantidades de vegetales y que algunos de estos tengan presentes patógenos, sumado al hecho de que las reducciones microbianas en estas inmersiones no son altas, podría generar contaminación cruzada de diferentes unidades del vegetal en cuestión, por medio de la disolución desinfectante (Francis *et al.*, 1999). Por otro lado, si se comparan los resultados obtenidos con la meta de reducción de 3 logaritmos propuesta por otros autores (Chang, 2015) se puede observar que las desinfecciones de papa pelada y rallada, así como zanahoria en todas sus presentaciones, cumplen con este objetivo. Sin embargo, también puede observarse variabilidad asociada con el intervalo de confianza en los resultados y en algunos casos, esta reducción solamente se cumple en el tiempo de desinfección de 30 minutos (zanahoria troceada y rallada). Esto refuerza la idea de que cada planta de proceso debe validar sus procesos de desinfección, de acuerdo con las condiciones establecidas en el sitio.

Beuchat y colaboradores (1998) indican que la dificultad para desinfectar algunas hortalizas como la lechuga radica en que estas hortalizas poseen microambientes en sus tejidos, donde los microorganismos logran alojarse y que el cloro no logra llegar hasta estos microambientes. Adams y colaboradores (1989) mencionan que existe una protección de los microorganismos ante estos procedimientos de desinfección por medio de “sobres” o “microbolsas” hidrofóbicas en el tejido vegetal. Estas estructuras confieren protección a los diferentes microorganismos ante el cloro y otros desinfectantes y es por esto que no se logran metas como la de los 5 logaritmos. Se conoce, por ejemplo, que hay áreas de los vegetales como los estomas o laceraciones en la cutícula que funcionan como sitio de adhesión para los microorganismos. El papel de factores como las interacciones hidrofóbicas, la carga microbiológica superficial, la presencia de fimbrias y polisacáridos extracelulares de las bacterias, así como el tiempo de interacción entre el inóculo y el vegetal son aspectos importantes en estos estudios; sin embargo, han arrojado resultados contradictorios en las diferentes investigaciones (Velásquez *et al.*, 2009). Además, la literatura indica que es más efectivo desinfectar vegetales

de superficie o “cáscara” lisa, como los tomates que otros más porosos como las zanahorias (Bermudez-Aguirre y Barboza-Canovas, 2013).

Debido a lo anterior, hay estudios que evalúan cómo mejorar la desinfección de vegetales, como la lechuga, por medio de la adición de surfactantes a las soluciones desinfectantes (Takeuchi y Frank, 2001).

Los resultados obtenidos concuerdan con datos de la literatura que señalan que la eliminación de microorganismos presentes en frutas y vegetales por lavado con agentes antimicrobianos es un problema complejo. Por ejemplo, se cita que el uso de cloro para estos efectos logra reducir la contaminación en 1 a 2 ciclos logarítmicos (FAO y OMS, 2008; Velásquez *et al.*, 2009; Bermudez-Aguirre y Barboza-Canovas, 2013). Esto puede ser atribuido en parte a la topografía de la superficie del vegetal o posiblemente a la capacidad que poseen ciertos microorganismos de formar biofilms en la superficie, los cuales resisten en cierto grado la remoción incluso por tratamientos con cepillos usando soluciones desinfectantes (López *et al.*, 2003). El hecho de que algunos microorganismos puedan formar biofilms, permite que otros microorganismos se vean beneficiados protegiéndose de los desinfectantes por medio de estas biopelículas (Velásquez *et al.*, 2009).

En conclusión, se puede decir que, para el caso específico de estos vegetales, se obtuvo la misma reducción de *E. coli* en lechuga entera, lechuga troceada, zanahoria entera, zanahoria pelada, zanahoria troceada y zanahoria rallada, mientras que, para papa, hay diferencias en el grado de reducción de *E. coli* para las diferentes presentaciones de este vegetal. Es significativamente diferente desinfectar papa rallada con cloro o sumergirla en agua, mientras que este efecto no se observa en las demás presentaciones de papa. Como aplicaciones prácticas de importancia se destaca el hecho de desinfectar estos vegetales durante 5 minutos ya que las reducciones del microorganismo ocurren en ese tiempo y no es necesario desinfectar durante mayores tiempos, pues el resultado es el mismo. Por último, se demuestra que, aunque hay un efecto de arrastre del agua durante la inmersión, en el caso de la lechuga, la zanahoria y la papa rallada, las reducciones del microorganismo meta son mayores al utilizar la desinfección con cloro que la inmersión en agua, lo que demuestra la importancia de seguir desinfectando los vegetales y validar los procesos respectivos para que este proceso alcance los resultados de reducción de microorganismos deseada.

4.3 Determinación del efecto del pelado y el troceado sobre el remanente de cloro en el vegetal desinfectado

Se evaluó el efecto del pelado y el troceado del vegetal sobre su remanente de cloro después de la desinfección. Para esto, nuevamente se aplicaron los diferentes tratamientos de desinfección de vegetales en soluciones de cloro a 200 ppm y durante 30 minutos. Después de

eso se midió el cloro remanente en cada una de las presentaciones de los vegetales. Se escogió un tiempo de 30 minutos como el tiempo máximo que podría utilizarse para la operación considerando los requerimientos de validación antes mencionados. El análisis estadístico se realizó para cada vegetal por separado como se describió en la metodología.

El Cuadro 9 resume los resultados de la evaluación de cloro remanente en los vegetales analizados.

Cuadro 9. Resultados de la evaluación de la concentración de cloro residual en el vegetal después de la desinfección con cloro a 200 ppm durante 30 minutos.

Presentación	Concentración de cloro (ppm $\pm$ IC)*
Lechuga entera	0,4 $\pm$ 0,3 ^b
Lechuga troceada	2,5 $\pm$ 0,7 ^a
Papa entera	0,0 $\pm$ 0,2 ^a
Papa pelada	0,0 $\pm$ 0,0 ^a
Papa troceada	0,0 $\pm$ 0,0 ^a
Papa rallada	0,2 $\pm$ 0,2 ^a
Zanahoria entera	0,1 $\pm$ 0,1 ^b
Zanahoria pelada	0,0 $\pm$ 0,0 ^b
Zanahoria troceada	0,0 $\pm$ 0,0 ^b
Zanahoria rallada	3 $\pm$ 2 ^a

IC: intervalo de confianza al 95%

*Tratamientos con letras distintas indican diferencia significativa ($p \leq 0,05$) para cada vegetal por separado

En el caso de la lechuga, se aprecia que se encontró diferencia significativa entre la concentración de cloro en la lechuga entera y en la lechuga troceada después de la desinfección ($p = 0,0206$). Para el caso de la papa, no se detectó diferencia significativa en la concentración de cloro en las diferentes presentaciones de papa ($p = 0,1641$ y $1 - \beta = 1,0$) y para el caso de la zanahoria, se encontró diferencia significativa en la concentración de la zanahoria rallada con respecto a las demás presentaciones de zanahoria desinfectada ($p = 0,0006$). En los casos en los que se encontraron diferencias, esto significa que una presentación del vegetal posee mayor

o menor contenido de cloro remanente en sus tejidos, en comparación con las otras presentaciones del vegetal analizado.

Después de una amplia revisión de literatura y consulta con expertos, no fue posible encontrar niveles de tolerancia permitidos por la legislación y agencias reguladores para cloro residual en vegetales frescos para consumo humano. En el caso de la lechuga, la operación de troceado implica un mayor residual de cloro en el vegetal. En el caso de zanahoria rallada también. Sin embargo, pareciera que pelar y trocear “grueso” la papa y la zanahoria no favorece que el cloro se adhiera al tejido, como es el caso de la zanahoria rallada. Por otra parte, si se considera que el cloro residual admisible en agua es de alrededor de 5 ppm (WHO, 2003), no pareciera que el residual máximo promedio encontrado en estos productos represente un problema para la salud del consumidor. La presentación que se acerca más a este valor sería la zanahoria rallada, cuyo valor residual de cloro es de 3 ± 2 ppm, por lo que su límite superior llega a 5 ppm, aunque no lo sobrepasa. En ese sentido, el peligro químico queda en un segundo plano con respecto al microbiológico, en donde la validación es necesaria. Sin embargo, cabe resaltar que en este estudio se midió únicamente el cloro remanente en el vegetal y no los productos que se forman a partir del cloro. Como se mencionó en el apartado 2.2.2 el cloro puede presentar reacciones químicas que generen productos peligrosos como las cloraminas, los trihalometanos, los ácidos haloacéticos y otros, al combinarse con otros compuestos presentes en el agua, los vegetales o la materia orgánica. El alcance de este estudio no permitió medir estos productos peligrosos en los vegetales, se midió únicamente el cloro remanente, por lo que no podría descartarse que estos productos estuvieran presentes en los vegetales y que eventualmente causen daño en el consumidor. Sin embargo, existen otros autores que sí lo han demostrado. Lee y Huang (2019) demostraron que al desinfectar lechuga con hipoclorito de sodio al 5% de cloro libre durante 15 minutos, se forman trihalometanos, ácidos haloacéticos y aldehídos que pueden ser detectados tanto en la lechuga como en el agua de lavado. Coroneo y colaboradores (2017) evaluaron la concentración de trihalometanos en vegetales listos para comer como zanahorias, lechuga, apio, ensaladas, entre otros y encontraron concentraciones de alrededor de 80 ng/g de estos compuestos en las muestras. Tanto Estados Unidos como La Unión Europea han establecido límites para los compuestos derivados del cloro en agua de consumo; sin embargo, no se han establecido estos límites para los alimentos (EPA, 2010 y Comisión Europea, 2018). Lo anterior demuestra la importancia de medir los compuestos derivados del cloro que puedan encontrarse en los vegetales y verificar si los niveles se consideran aptos para el consumo humano.

El tiempo que transcurre desde la desinfección con cloro hasta que se mide el cloro remanente en el vegetal es de suma importancia. En este caso las mediciones se realizaron de forma inmediata. Hay un estudio que demuestra que, al analizar cloro remanente en lechuga que fue desinfectada en hojas (entera) con 200 ppm de cloro, el cloro en el vegetal va disminuyendo significativamente conforme pasa el tiempo. Así, hubo un nivel de cloro remanente de 13,7 ppm

al inicio, 8,3 ppm después de 3 minutos de almacenamiento, 5,7 ppm después de 10 minutos y 0,4 ppm después de 3 horas (Cho *et al.*, 2010). La diferencia entre los niveles de cloro en la lechuga encontrados en el estudio de Cho y colaboradores y los niveles encontrados en el presente estudio pueden deberse a diferencias en la metodología de maceración de la lechuga y de medición del cloro residual utilizados en ambos casos. En el estudio mencionado, utilizaron un macerador manual para triturar la lechuga con agua destilada y midieron el cloro por un método colorimétrico, mientras que en el presente estudio se usó la licuadora para la maceración y el clorímetro para la medición del cloro. En términos de aplicación práctica es importante considerar que en los procesos industriales transcurren tiempos más prolongados entre la desinfección y el consumo del vegetal.

La OMS, en su estudio sobre el cloro en el agua de bebida (WHO, 2003), indica que algunas personas pueden percibir el cloro o sus subproductos como las cloraminas, cuando estos se encuentran en el agua o el alimento en concentraciones tan bajas como 0,3 ppm. Este dato es importante para la industria alimentaria ya que, aunque se podrían permitir valores de cloro remanente en el alimento de hasta 5 ppm, algunas personas podrían detectar el sabor a cloro en el alimento y dejar de comprarlo o consumirlo en esa presentación en específico. Este podría ser el caso, por ejemplo, de la lechuga troceada o la zanahoria rallada, que en este estudio presentaron valores de cloro remanente significativamente más altos que los demás vegetales con los que se compararon, además de presentar valores superiores a 0,3 ppm.

De acuerdo con los resultados obtenidos, es importante seguir estudiando niveles de cloro remanente en diferentes presentaciones de vegetales, debido a que, de acuerdo con su presentación y composición, estos podrían contener niveles de cloro remanente detectables por el consumidor. Otro aspecto importante a considerar es que se observa en los resultados obtenidos en la muestra estudiada, que conforme el vegetal se subdivide (se corta en trozos o se ralla, por ejemplo), este tiende a contener mayor cloro remanente (ver Cuadro 9). Estos son datos que sugieren que, en vegetales troceados o rallados, se debe considerar el cloro como peligro químico, ya que, dependiendo de factores como tipo de vegetal, grado de subdivisión, concentración de cloro en la disolución desinfectante y tiempo de contacto, el cloro remanente podría estar presente en concentraciones mayores y representar un peligro para el consumidor final. Además, se debe considerar que el cloro puede haberse unido a otros compuestos y formar productos peligrosos derivados del cloro, los cuales no se midieron en este estudio.

4.4 Determinación del efecto del pelado y el troceado sobre las características sensoriales del vegetal desinfectado con cloro

Por último, se realizó un análisis sensorial (Prueba Triangular de Diferencia), con panelistas entrenados, donde se evaluó si había diferencia significativa en las características

sensoriales del vegetal en sus diferentes presentaciones al desinfectarlo durante 30 minutos en una disolución de cloro a 200 ppm, en comparación con esta misma presentación del vegetal inmerso en agua potable durante el mismo tiempo. Los resultados se muestran en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Resultados de la prueba triangular de diferencia para las presentaciones del vegetal desinfectados durante 30 minutos en una disolución de cloro a 200 ppm o lavados en agua potable durante el mismo tiempo.

Presentación	Jueces que detectaron diferencia	Jueces participantes en la prueba	¿Diferencia significativa en las muestras?
Lechuga entera	12	20	Sí
Lechuga troceada	8	20	No
Papa entera	7	20	No
Papa pelada	15	20	Sí
Papa troceada	7	20	No
Papa rallada	14	19	Sí
Zanahoria entera	5	20	No
Zanahoria pelada	4	20	No
Zanahoria troceada	6	20	No
Zanahoria rallada	6	20	No

Los resultados obtenidos indican que los jueces entrenados encontraron diferencias sensoriales en la lechuga entera desinfectada al compararla con la lechuga entera inmersa en agua. También encontraron diferencias en la papa pelada y en la papa rallada que fueron desinfectadas, al compararlas con estas mismas presentaciones de papa inmersa en agua potable. Esto permite sugerir que el tratamiento de desinfección con cloro puede afectar las características sensoriales del producto al prepararlo como habitualmente se hace para su consumo. Aunque no se puede afirmar con certeza, dado que la prueba triangular de diferencia evalúa diferencias sensoriales globales en un alimento, se puede presumir que las diferencias detectadas se relacionan en mayor medida con sabor, olor y/o aroma del producto. Como se indicó en la metodología, la prueba se realizó bajo luz roja para minimizar la percepción de diferencias visuales, de manera que el panelista se concentrara en su percepción al degustar.

Los resultados descritos para lechuga concuerdan con un estudio que indica que el realizar una desinfección de lechuga troceada con cloro a 100 ppm durante 1 minuto afecta el aroma del vegetal. Los panelistas indicaron que esta lechuga no tenía suficiente aroma (típico a lechuga) y que olía más a “limpio” o a “fresco” que la lechuga lavada con agua potable (Delaquis *et al.*, 2004).

En otro estudio evaluaron dos desinfectantes, el extracto de semilla de toronja (400 ppm por 10 minutos) y el ácido peracético (2000 ppm por 1 minuto) para la desinfección de lechuga y de fresas. Los autores no encontraron diferencias a nivel sensorial mediante la Prueba Triangular de Diferencia en el caso de las fresas (no evaluaron la lechuga) lo que indica que se obtienen resultados distintos para diferentes desinfectantes, tiempos de aplicación y tipo de fruta o vegetal utilizado (López *et al.*, 2001).

Cabe destacar que en este estudio los análisis sensoriales se realizaron con un panel entrenado de jueces y no con consumidores. La literatura indica que el 30% de los consumidores falla en la detección de un atributo sensorial, mientras que un panel de jueces entrenados se espera que sea más sensible y detecte diferencias menores que los consumidores (Stone y Sidel, 2004). Debido a esto, se decidió hacer uso del panel de jueces y no de consumidores habituales de vegetales. Sin embargo, sería importante realizar este mismo estudio con consumidores para determinar si detectan diferencias en las características sensoriales atribuibles a los diferentes tratamientos analizados y qué relación asignan a estas diferencias con la aceptación del producto.

Aparentemente, no existe una relación de estos resultados con los observados en cuanto al cloro residual (Cuadro 9), por lo que no parece haber asociación entre la cantidad de cloro que queda impregnado en el tejido después de la desinfección y el sabor del vegetal desinfectado. Esto podría comprobarse posteriormente con experimentos adicionales donde se asocie una variable con la otra. Así, aunque la lechuga troceada y la zanahoria rallada presentaron valores de cloro remanente significativamente mayores a las demás presentaciones de lechuga o zanahoria, a nivel sensorial no se detectaron diferencias en estas muestras.

En los resultados anteriores pueden influir varios aspectos. Uno de los aspectos a considerar es el tiempo que transcurre desde la desinfección del vegetal hasta que el panelista lo consume. Cuando se realizaron los análisis de cloro remanente en el vegetal, la medición se realizó posterior a la desinfección, con pocos minutos de diferencia entre la finalización de la desinfección y el análisis químico de cloro remanente en el vegetal. Por el contrario, para el análisis sensorial, aunque se desinfectaron todas las presentaciones de vegetales ese mismo día, el análisis sensorial no se realizó de forma inmediata pues depende de la disponibilidad de los panelistas. Entonces, entre la desinfección del vegetal y el análisis sensorial transcurrieron entre 1 y 5 horas de tiempo. Este período podría influir en la interacción que hay entre el cloro remanente y el tejido vegetal, permitiendo que la percepción de sabor a cloro sea mayor en

algunos casos (cuando interactúa con el tejido vegetal o se forman otros compuestos derivados del cloro) o que esta percepción sea menor en otras ocasiones. Ya se ha mencionado anteriormente que el cloro interactúa con el tejido vegetal, con la materia orgánica y también, que puede volatilizarse bajo ciertas condiciones (Suzlow, 2001; Ritenour *et al.*, 2007 y Toivonen y Lu, 2013). Todos estos factores podrían influir en las diferencias encontradas en el análisis sensorial del vegetal y los resultados de cloro remanente. Ten y colaboradores (2018) indican que es poco lo que se conoce acerca de los tipos, la abundancia y la reactividad de los compuestos orgánicos que reaccionan con el cloro. Estos compuestos se combinan con el cloro de la disolución desinfectante y generan una demanda de oxígeno del cloro, que es la que impide que el cloro se encuentre en la forma en la que ejerce su poder desinfectante. Estudios previos han evaluado la cinética del cloro relacionada con compuestos orgánicos en la disolución desinfectante a diferentes valores de pH; sin embargo, hasta el momento no se han encontrado estudios que expliquen las interacciones del cloro y sus derivados con los tejidos vegetales.

Otro factor que podría influir o explicar los resultados obtenidos en el análisis sensorial de los vegetales es que se eligieron varias presentaciones para presentarle el vegetal al panelista o juez entrenado, que fueran lo más parecidas entre sí para que la diferencia sensorial no se asociara con la presentación del vegetal. Así, la lechuga se desinfectó entera o troceada, pero se presentó al panelista de forma troceada (en el caso de la que se desinfecta entera se trocea posterior a la desinfección). La papa se desinfectó como se describió en el apartado 3.9 y se dio a los panelistas como puré de papa o papa rallada y en ambos casos, cocida, ya que no se acostumbra a consumir la papa cruda. Por último, la zanahoria se presentó a los panelistas de forma troceada o rallada después de haber sido desinfectada como se describió en el apartado 3.9. Todos estos tratamientos posteriores a la desinfección y el tiempo que transcurre para que estas operaciones puedan llevarse a cabo podrían contribuir con la diferencia detectada entre el análisis de cloro remanente en el vegetal y el análisis sensorial. Además, estas operaciones posteriores a la desinfección podrían permitir que el sabor u olor a cloro percibido por los panelistas en los diferentes vegetales fuera mayor o menor. Los resultados obtenidos no son concluyentes en cuanto a si el troceado o la disminución de tamaño de partícula de estos vegetales generan diferencias en las características sensoriales de estos.

Otro aspecto importante de este estudio es que los panelistas detectaron diferencia entre la papa pelada y la papa rallada desinfectadas, en contraste con este tipo de papa inmersa en agua potable. Como se indicó en la metodología, la papa se cocinó para poder ser degustada por los panelistas, ya que no es un alimento que se come crudo. La teoría indica que la cocción de la papa podría eliminar el cloro remanente en este alimento, ya que se sabe que el cloro actúa con diferentes compuestos, como la materia orgánica, y que depende del pH y la temperatura para permanecer como cloro total y como cloro residual; así también está comprobado que este compuesto es volátil (Suzlow, 2001; Ritenour *et al.*, 2007 y Toivonen y Lu, 2013). No se encontraron estudios que relacionen la cocción de los alimentos con la concentración de cloro

que puedan tener estos; sin embargo, Zhang (2013) realizó un estudio de medición de cloro en agua hirviendo, donde comprueba que tanto el cloro total como el cloro residual van disminuyendo en el tiempo conforme se aumenta la temperatura del agua y que, al llegar a 100 °C, el cloro total no es detectable en el agua y el cloro residual disminuye a valores no detectables en un tiempo de alrededor de 40 minutos. Los tiempos en los que se utilizó calor en el agua en el estudio descrito sobrepasan los tiempos en los que se cocinó la papa en el presente estudio, porque el objetivo de Zhang incluía que el agua llegara a ebullición. Entonces, se podría sugerir que hay alguna interacción del cloro en la disolución desinfectante (utilizada con la papa pelada y la papa rallada) con el tejido del vegetal, que permitió que los panelistas detectaran diferencias al degustar este alimento ya cocido. Por el contrario, se sugiere también que el cloro no se volatilizó completamente con el proceso de cocción utilizado y es probable que se haya transformado en otros compuestos, que puedan dar sabores diferentes en estos tipos de papa y que hayan sido detectados por los panelistas. Se desconoce la razón por la cual la papa troceada no presentó este mismo comportamiento y, en el caso de la papa entera, se podría pensar en un efecto de barrera de la cáscara, que impidiera que se diera la interacción cloro-vegetal sugerida anteriormente.

Es importante recalcar también, que la prueba realizada, permite detectar diferencias entre los alimentos que se degustan o, por el contrario, indicar que los panelistas no percibieron diferencia entre los vegetales desinfectados o solamente inmersos en agua potable. No se realizaron pruebas de agrado durante este estudio, por lo que no se puede afirmar si hay agrado o más bien rechazo, de la persona que consume el alimento evaluado.

El resultado global de este análisis sensorial, indica que no se observa una tendencia en cuanto a la presentación en la que se desinfectó el vegetal analizado y las diferencias sensoriales encontradas por los panelistas. Hacen falta otros estudios que puedan determinar cómo la desinfección con cloro influye sobre las características sensoriales de estos y otros vegetales. Lo que sí es de suma importancia es que la industria de vegetales debe preocuparse por analizar sus productos sensorialmente, como parte del proceso de validación de una desinfección, sobre todo por lo que se mencionó anteriormente, donde niveles bajos de cloro pueden ser detectados ya sea por paneles de jueces entrenados o, en algunos casos, por el consumidor final.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Al estudiar el efecto del pelado, el troceado y el rallado del vegetal sobre la concentración de cloro en el tiempo, en la disolución desinfectante, se concluyó que el mantenimiento del poder desinfectante del cloro en disolución, en el tiempo, depende del estado de subdivisión del vegetal y de su composición. Así, no se encontró diferencia significativa en la concentración de cloro en el tiempo, al desinfectar con cloro a 200 ppm durante 30 minutos la lechuga entera y troceada, así como la papa y la zanahoria, ambas enteras, peladas o troceadas. Por otro lado, se detectaron diferencias al desinfectar papa y zanahoria ralladas, ya que la concentración de cloro disminuye significativamente en el tiempo al compararse con papa y zanahoria entera, pelada y troceada.

Con respecto a la determinación del efecto del pelado, el troceado y el rallado del vegetal sobre la reducción de *E. coli* durante su desinfección con cloro, se concluyó que, en general, los tratamientos de desinfección estudiados no reducen la concentración de *E. coli* en 5 logaritmos. Además, se obtiene la misma reducción de *E. coli* al desinfectar en una disolución de cloro a 200 ppm durante 30 minutos, lechuga entera y lechuga troceada, zanahoria entera, zanahoria pelada, zanahoria troceada y zanahoria rallada. Por otro lado, se demostró que, para las presentaciones de lechuga entera y troceada, así como de zanahoria entera, pelada, troceada y rallada, y también para la papa rallada, las reducciones de *E. coli* son significativamente mayores al utilizar la desinfección con cloro a 200 ppm por 30 minutos que la inmersión en agua durante el mismo tiempo. Por último, se concluyó que no hay diferencia en la reducción de *E. coli* al desinfectar los vegetales estudiados durante 5 minutos o durante 30 minutos, por lo que puede usarse la desinfección de 5 minutos que es más práctica para la industria de alimentos.

En cuanto a la determinación del efecto del pelado, el troceado y el rallado sobre su residual de cloro, después de la desinfección, se concluyó que el residual de cloro varía de acuerdo con el tipo y la presentación del vegetal analizado. Así, al realizar desinfecciones con cloro a 200 ppm durante 30 minutos se encontró que, para la lechuga, hay diferencia significativa entre la concentración de cloro remanente en la lechuga entera y la lechuga troceada después de la desinfección con cloro, ya que la concentración de cloro remanente es mayor en la lechuga troceada. Algo similar sucede con la zanahoria, donde hay diferencia significativa en la concentración remanente de cloro en la zanahoria rallada, al compararla con la zanahoria entera, pelada y troceada. La concentración remanente de cloro es mayor en la zanahoria rallada. En contraste, no hay diferencia significativa en la concentración de cloro remanente en papa entera, papa pelada, papa troceada y papa rallada al realizar la desinfección descrita anteriormente.

Por último, al estudiar el efecto del pelado, el troceado y el rallado del vegetal sobre sus características sensoriales después de su desinfección con cloro, se concluyó que los resultados varían de acuerdo con el tipo de vegetal analizado y su presentación. Se encontró que hay diferencias significativas de sabor en la lechuga entera desinfectada con cloro a 200 ppm durante 30 minutos al compararla con la lechuga entera lavada con agua potable. También se encontraron diferencias en la papa pelada y en la papa rallada que fueron desinfectadas con cloro a 200 ppm durante 30 minutos, al compararlas con esta misma presentación de papa inmersa en agua potable; sin embargo, no se encontraron este tipo de diferencias en los resultados de lechuga troceada, zanahoria entera, pelada, troceada o rallada, así como de papa entera y papa troceada.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda validar desinfecciones de lechuga entera y troceada, papa y zanahoria entera, pelada, troceada y rallada para obtener los resultados de reducción de microorganismos deseados, usando tiempo de desinfección de 5 minutos ya que tiempos mayores no fueron diferentes significativamente en cuanto a concentración de cloro en el tiempo o reducciones de *E. coli*.

El tratamiento de desinfección con cloro puede afectar la calidad sensorial del producto al prepararlo como habitualmente se hace para su consumo, por lo que la industria de vegetales debe preocuparse por analizar sus productos sensorialmente, como parte del proceso de validación de una desinfección.

Se recomienda estudiar la concentración de productos peligrosos que se forman a partir del cloro residual al desinfectar los vegetales, para definir si la desinfección podría representar un peligro químico para el consumidor.

Todos los procesos de desinfecciones de vegetales deben ir acompañados de programas de Buenas Prácticas Agrícolas y Buenas Prácticas de Manufactura, para garantizar los resultados deseados.

6. REFERENCIAS

- Adams, M. R., Hartley, A. D. y Cox, L. J. 1989. **Factors affecting the Efficacy of Washing Procedures used in the Production of Prepared Salads.** Food Microbiology. 6: 69 – 77.
- Adingba, A., Ma, H., Ayim, I., Harrington, J., Hong, C. y Zhou, C. 2018. **Reduction of *Listeria innocua* in fresh-cut Chinese cabbage by a combined washing treatment of sweeping frequency ultrasound and sodium hypochlorite.** Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 101: 410-418. Internet: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.048>
- Aguilera, J. M. 2005. **Why food microstructure?** Journal of Food Engineering. 67 (1-2): 3 – 11.
- Allende, A., Tomás Barberan, F. A. y Gil, M. I. 2006. **Minimal processing for healthy traditional foods.** Trends in Food Science and Technology. 17 (9): 513 – 519.
- APHA, 1998. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** 20 Edición. American Public Health Association, Estados Unidos.
- APHA, 2017. **4500 Cl-Chlorine (residual).** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Internet: <https://www.standardmethods.org/doi/abs/10.2105/SMWW.2882.078>
- Artés, F., P. Gomez, E. Aguayo, V. Escalona, y F. Artes-Hernandez. 2009. **Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities.** Postharvest Biology Technology. 51: 287– 296. Internet: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.10.003>
- Aviles, J. y Piedra, Ricardo. 2017. **Manual del cultivo de papa en Costa Rica.** Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria. Costa Rica. Internet: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10931.pdf>
- Barrantes, M. 2005. **Diagnóstico y Mejora de la Calidad Microbiológica de un Picadillo de Zanahoria, Vainica y Maíz Dulce.** Proyecto de Graduación, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- Barquero, M. 2014. **Familias consumen más frutas y hortalizas.** Periódico La Nación, Internet: http://www.nacion.com/economia/consumidor/Familias-consumen-frutashortalizas_0_1410458966.html
- Behrsing, J., Winkler, S., Franz, P. y Premier, R. 2000. **Efficacy of chlorine for inactivation of *Escherichia coli* on vegetables.** Postharvest Biology and Technology. 19 (2): 187 – 192. Internet: [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00092-2](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00092-2)
- Beier, R., Pilai, S., Phillips, T. y Ziprin, R. 2004. **Preharvest and Postharvest food Safety.** IFT Press y Blackwell Publishing. Estados Unidos, pág 47.

- Belitz, H.D., Grosch, W. y Schieberle, P. 2012. **Química de los Alimentos**. 4 edición. Editorial Acribia. España.
- Beuchat, L.R. y Bracket, R. E. 1990. **Survival and Growth of *Listeria monocytogenes* on Lettuce as Influenced by Shredding, Chlorine Treatment, Modified Atmosphere Packaging and Temperature**. Journal of Food Science. 55(3): 755 – 758.
- Beuchat, L.R., Nail, B. V., Adler, B. B. y Clavero, M. R. S. 1998. **Efficacy of Spray Application of Chlorinated Water in Killing Pathogenic Bacteria on Raw Apples, Tomatoes and Lettuce**. Journal of Food Protection. 61: 1305 – 1311.
- Beuchat, L.R., Harris, L.J., Ward, T.E. y Kajs, T.M. 2001. **Development of a Proposed Standard Method for Assessing the Efficacy of Fresh Produce Sanitizers**. Journal of Food Protection. 64:1103 – 1109.
- Bermudez-Aguirre, D. y Barbosa-Canovas, G. 2013. **Disinfection of Selected Vegetables under Nonthermal Treatments: Chlorine, Acid Citric, Ultraviolet light and Ozone**. Food Control. 29: 82 – 90.
- Bloch, S. 2001. **Disinfection, Sterilization and Preservation**. Quinta edición. Editorial Lippincott, Williams y Wilkins. Philadelphia, pág 141.
- Bolaños, A. 1998. **Manual técnico de la producción de zanahoria en Costa Rica**. Editorial UNED. Costa Rica. Internet: <http://www.infoagro.go.cr/Inforegiones/RegionCentralOriental/Documents/Manual%20tecnico%20EL%20CULTIVO%20DE%20ZANAHORIA%20en%20Costa%20Rica.pdf>
- Brenes, A., Rivera, C. y Vasquez, V. 2002. **Principales enfermedades y plagas de la papa en Costa Rica**. EUNED, Costa Rica.
- Butnariu, M. y Butu, A. 2014. **Chemical Composition of Vegetables and their Products**. Handbook of Food Chemistry. Springer. Internet: https://www.researchgate.net/publication/302493121_Chemical_Composition_of_Vegetables_and_Their_Products#pfc
- CACIA, 2015. **Desabastecimiento de papa de uso industrial**. Internet: http://www.centralamericadata.com/es/article/home/Costa_Rica_Falta_papa_para_uso_industrial?_oms=1506602
- Cano, M.P., Ancos, B y Sanchez-Moreno, C. 2010. **Altas Presiones, una Nueva Alternativa para la Mejora de la Calidad y Seguridad en Vegetales Frescos Cortados**. Mundo Alimentario, Internet: http://www.alimentariaonline.com/media/MA038_ALTA.pdf
- Cantwell, M. y Suslow, T. 1999. **Fresh Cut Fruits and Vegetables: Aspects of Physiology, Preparation and Handling that Affect Quality**. Fresh-Cut Workshop. UC Davis, Estados Unidos.

- Castro Del Campo, N. y Chaidez Quiro, C. 2009. **Effect of Water Quality and Temperature on Decontamination of Mango**. Water Conditioning and Purification 51 (9): 34 - 37 Internet: http://www.wcponline.com/pdf/0909CastrodelCampo_etal.pdf
- CDC, 2010. **Chlorine Residual Testing Fact Sheet**. Centro de Control de Enfermedades, Estados Unidos. Internet: www.cdc.gov/safewater/publications_pages/chlorineresidual.pdf
- CDC, 2020. **List of Selected Multistate Foodborne Outbreak Investigations**. Internet: <https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/outbreaks-list.html>
- Cerdas, M.M. y Montero, M.E. 2004. **Guías Técnicas del Manejo Poscosecha de Apio y Lechuga para el Mercado Fresco**. Editorial MAG, Costa Rica.
- Chang, J. 2015. **Food Safety Research for Fresh Produce**. Purdue University. Internet: https://docs.lib.purdue.edu/open_access_theses/1098/
- Cho, S. D., Chang, M. S., Lee, Y. S., Ha, J. H., Kim, G. H., Bae, D. H. Kim, Y. S., Chung, M. S., Kim, Y. M., Lee, D. H., Park, S. H. y Ha, S. D. 2010. **Changes in the Residual Chlorine Content of Fresh-cut Lettuce during Storage**. Journal of Korean Society Applied Biology and Chemistry. 53 (3): 337 – 341.
- Chung, C., Huang, T., Yu, C., Shen, F.Y. y Chen, H. 2011. **Bactericidal Effects of Fresh-Cut Vegetables and Fruits after Subsequent Washing with Chlorine Dioxide**. International Conference on Food Engineering and Biotechnology. 9: 107 – 112.
- CNP, 2010. Análisis de Mercado de la papa. Servicio de Información e Inteligencia de Mercados. Boletín 1. Internet: <https://www.cnp.go.cr/index.php?idS=1&idM=2>
- CNP, 2015. **Análisis de Mercado de la papa**. Servicio de Información e Inteligencia de Mercados. Boletín 2. Internet: http://www.infoagro.go.cr/Documents/NOTICIAS/A_papa_02_23-09-2015.pdf
- Comisión Europea, 2018. **Directive of the European parliament and of the council on the quality of water intended for human consumption**. Internet: https://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/pdf/revised_drinking_water_directive.pdf
- Coroneo, V., Carraro, V., Marras, B., Marrucci, A., Succa, S., Meloni, B., Pinna, A., Angioni, A., Sanna A. y Schintu, M. 2017. **Presence of Trihalomethanes in ready-to-eat vegetables disinfected with chlorine**. Food Additives & Contaminants: Part A, 34:12, 2111-2117.
- Cosby, K., Amado, J., Kirkpatrick, C., Peña, T. y Silvers, W. M. 2016. **Relationship between Fruit and Vegetable Consumption and Type II Diabetes Risk Factors in Undergraduate Students**. International Journal of Exercise Science, 8 (4).

- Coto, W. I. 2017. **Historia de un alimento bendito. Producción y Consumo de Papa en Costa Rica (1943 – 2015)**. Historia Ambiental Latinoamericana y Caribeña. 7 (2): 10 – 31.
- Delaquis, P., Fukumoto, L., Toivonen, P. y Cliff, M. 2004. **Implications of Wash Water Chlorination and Temperature for the Microbiological and Sensory Properties of Fresh-cut Iceberg Lettuce** Postharvest Biology and Technology. 31: 81 – 91.
- Dewey-Mattia, D., Manikonda, K., Hall, A. J., Wise, M. E., y Crowe, S. J. 2018. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks - United States, 2009-2015**. Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries, 67(10): 1–11.
- do Prado, S., Rocha, T. M., Gonçalves, C. M., Pamplona, J., Mendonça, R., Cardoso, U. B. y Ferreira, R. 2020. **Efecto de la desinfección sobre la col mínimamente processada (*Brassica oleracea* L.)**. Research, Society and Development, 9(6). Internet: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i6.3467>
- Doyle, M y Buchanan, R. 2013. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 4 edición. ASM Press, Estados Unidos.
- Edgar, R. y Aidoo, K. 2001. **Microflora of Blanched Minimally Processed Fresh Vegetables as Components of Commercial Chilled Ready-To-Use Meals**. International Journal of Food Science and Technology, 36(1): 107-110.
- Eifert, J. & Sanglay, G. 2002. **Chemistry of Chlorine Sanitizers in Food Processing**. Dairy, Food and Environmental Sanitation, 22 (7): 534-538.
- El País, 2019. **Población costarricense eleva consumo de frutas y vegetales**. Internet: <https://www.elpais.cr/2019/09/04/poblacion-costarricense-eleva-consumo-de-frutas-y-vegetales/>
- Erickson, M. 2010. **Microbial Risks Associated with Cabbage, Carrots, Celery, Onions, and Deli Salads Made with These Produce Items**. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9: 602 – 619.
- Erkmen, O. y Bozoglu, T. F. 2016. **Food Microbiology: Principles into Practice**. 1 edición. John Wiley and Sons. Inglaterra.
- EPA, 2010. **National Primary Drinking Water Regulations**. Internet: <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>
- Espinosa Mangufás, J. 2007. **Evaluación Sensorial de los Alimentos**. 1 edición. Editorial Universitaria. Cuba.
- Eurostat. 2019. **Fruit and vegetables consumption statistics**. Internet: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Fruit_and_vegetable_consumption_statistics#General_overview

- FAO, 1995. **Fruit and Vegetable Processing**. FAO Agricultural Services Bulletin No 119. Roma.
Internet: <http://www.fao.org/docrep/v5030E/V5030E00.htm#Contents>
- FAO y OMS, 2008. **Benefits and Risks of the Use of Chlorine-containing Disinfectants in Food Production and Food Processing**. Internet: <http://www.fao.org/3/i1357e/i1357e00.htm>
- FDA. 2001. **Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce**. Departamento de Agricultura de Estados Unidos. Internet: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm090977.htm>
- FDA, 2001 (2). **Bacteriological Analytical Manual (BAM)**. Departamento de Agricultura de Estados Unidos. Internet: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>
- FDA. 2007. **How the FDA Works to Keep Produce Safe**. Internet: http://www.fda.gov/fdac/features/2007/207_foodsafety.html (10 March 2009)
- FDA. 2008. **Guía para Reducir al Mínimo el Riesgo Microbiano en Frutas y Vegetales Frescos**. Internet: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-guide-minimize-microbial-food-safety-hazards-fresh-cut-fruits-and-vegetables>
- FDA. 2018. **Code of Federal Regulations Title 21**. Internet: https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=3ee286332416f26a91d9e6d786a604ab&mc=true&tpl=/ecfrbrowse/Title21/21tab_02.tpl
- Francis, G. y O'Beirne, D. 1997. **Effects of Gas Atmosphere, Antimicrobial Dip and Temperature on the Fate of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* on Minimally Processed Lettuce**. International Journal of Food Science and Technology. 32 (2): 141-151.
- Francis, G., Thomas, C. y O'Beirne, D. 1999. **The Microbiological Safety of Minimally Processed Vegetables**. International Journal of Food Science and Technology, 34: 1-22.
- Francis, G. y O'Beirne, D. 2002. **Effects of Vegetable Type and Antimicrobial Dipping on Survival and Growth of *Listeria innocua* and *E. coli***. International Journal of Food Science and Technology, 37 (6): 711 – 718.
- Franson, M.A. 1992. **Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales**. Editorial Díaz De Santos, España.
- Garande, V. K., y Patil, R. S. 2014. **Technology of minimally processed fruits & vegetables**. Agrotechnology, 2 (4): 90. Internet: <https://www.longdom.org/proceedings/technology-of-minimally-processed-fruits--vegetables-15190.html>
- García-Barquero, M. 2015. **Análisis del Comportamiento de Mercado en las Ferias del Agricultor de la Gran Área Metropolitana**. Tecnología en Marcha. Volumen 29: 83-95

- García-Robles, J. M., Medina-Rodríguez, L. J., Mercado-Ruíz, J. N. y Báez-Sañudo, R. 2017. **Evaluación de desinfectantes para el control de microorganismos en frutas y verduras.** Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 18 (1): 9 - 22. Internet: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81351597002>
- Garg, N. Churey, J. y Splittstoesser, D. 1990. **Effect of Processing Conditions on the Microflora of Fresh Cut Vegetables.** Journal of Food Protection. 53: 701 – 703.
- Georgetown University, 2010. **Produce-Related Foodborne-Illness Outbreaks.** Produce Safety Project. Internet: http://www.producesafetyproject.org/fact_sheets?id=0005
- Gómez-López, V. M., Devlieghere, F., Ragaert, P., Chen, L., Ryckeboer, J. y Debevere, J. 2008. **Reduction of Microbial load and Sensory Evaluation of Minimally Processed Vegetables treated with Chlorine Dioxide and Electrolysed Water.** Italian Journal of Food Science. 20 (3): 321 – 331.
- Gorny, J.R. 1998. **Fresh Cut Products: Mantaining Quality and Safety.** Fresh Cut Workshop, UC Davis, Estados Unidos, sección 5b.
- Gorny, J. R. 2001. **Food Safety Guidelines for the Fresh Cut Produce Industry.** 4 edición. International Fresh Cut Produce Association, USA.
- He, F. J., Nowson, C. A. y MacGregor, G. A. 2006. Fruit and vegetable consumption and stroke: meta-analysis of cohort studies. The Lancet. 367 (9507): 320 – 326.
- Hernández, J. 1993. **Olericultura.** 1 edición. Editorial UNED, Costa Rica, pp 219 – 222.
- Herruzo, 2000. **Desinfectantes Españoles para el Siglo XXI.** Anales de la Real Academia de Medicina. 117(4):791 – 806.
- Henao, S. 2003. **Actividad Bactericida del Ácido Hipocloroso.** Revista Facultad de Medicina Universidad de Colombia, 51(3): 136 - 142.
- Hodges, D.M., y Toivonen, P.M.A., 2008. **Quality of fresh-cut fruits and vegetables as affected by exposure to abiotic stress** Postharvest Biology and Technology 48: 155–162. Internet: <http://ucanr.edu/datastoreFiles/608-365.pdf>
- Holliday, S.L., Scouten, A.J. y Beuchat, L.R. 2001. **Efficacy of chemical treatments in eliminating Salmonella and Escherichia coli O157:H7 on scarified and polished alfalfa seeds.** Journal of Food Protection. 64(10): 1489 – 1495.
- Ibañez, F. y Barcina, Y. 2001. **Análisis Sensorial de Alimentos – Métodos y Aplicaciones.** Editorial Springer. Barcelona, pág 118.
- IFT. 2003. **Effect of Preservation Technologies on Microbial Inactivation in Foods.** Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Capítulo V. Vol: II.

- Jahns-James, I. y Roemmick, N. 2016. **Study design for a randomized controlled trial to increase the relative reinforcing value of vegetable consumption using incentive sensitization among obese and overweight people.** Contemporary Clinical Trials, 50: 186 -192.
- Kato, M., Hayakawa, Y., Hyodo, H., Ikoma, Y., Yano, M., 2000. **Wound-induced ethylene synthesis and expression and formation of 1-aminocyclopropane-l-carboxylate (ACC) synthase, ACC oxidase, phenylalanine ammonia-lyase, and peroxidase in wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*.** Plant Cell Physiology, 41: 440–447. Internet: <http://pcp.oxfordjournals.org/content/41/4/440.full.pdf>
- Katsuyama, A.M. 1993. **Principles of Food Processing Sanitation.** 2 edición. The Food Processors Institute. Estados Unidos.
- Keskinen, L. A., Bassam, A. B. y Annous, A. 2009. **Efficacy of chlorine, acidic electrolyzed water and aqueous chlorine dioxide solutions to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 from lettuce leaves.** International Journal of Food Microbiology. 132: 134–140.
- Klaiber, R. G., Baur, S., Wolf, G., Hammes, W. P. y Carle, R. 2005. **Quality of minimally processed carrots as affected by warm water washing and chlorination.** Innovative Food Science and Emerging Technologies, 6: 351 - 362.
- Kushi, L. H., Lenart, E. B. y Willet, W. C. 1995. **Health implications of Mediterranean diets in light of contemporary knowledge. Plant food and dairy products.** American Journal of Clinical Nutrition, 61 (supplement): 1407s-1415s. Internet: <http://ajcn.nutrition.org/content/61/6/1407S.full.pdf>
- Lawless, H. y Heymann, H. 1999. **Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices.** Kluwer Academic / Plenum Publishers. Estados Unidos, páginas 121, 122, 129 y 130.
- Lee, W. N. y Huang, C. H. 2019. **Formation of disinfection byproducts in wash water and lettuce by washing with sodium hypochlorite and peracetic acid sanitizers.** Food Chemistry. 1: 1 – 7.
- Lepley, S. 2019. **9 mind-blowing facts about the US farming industry.** Markets Insider. Internet: <https://markets.businessinsider.com/news/stocks/farming-industry-facts-us-2019-5-1028242678#read-more-10>
- Li, Y., Bracket, R., Chen, J. y Beuchat, L. 2001. **Survival and Growth of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated onto Cut Lettuce Before or After Heating in Chlorinated Water, Followed by Storage at 5° C or 15° C.** Journal of Food Protection, 64 (3): 305 – 309.
- Lin, B. H. y Mentzer-Morrison, R. 2002. **Higher Fruit Consumption Linked With Lower Body Mass Index.** Food Review, 25 (3).

- Liu, X., Yan, Y., Li, F. y Zhang, D. 2016. **Fruit and vegetable consumption and the risk of depression: A meta-analysis.** Nutrition, 32 (3): 296 - 302.
- Loftus, T. 2007. **Coliform and *E. coli* Testing.** Massachusetts Water Pollution Control Association. Internet: <http://www.mwpc.org/lab/coliform/htm>.
- López, L., Romero, J. y Ureta, F. 2001. **Tratamientos de Desinfección de Lechugas (*Lactuca sativa*) y Frutillas (*Fragaria chiloensis*).** Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 51(4): 376 - 381.
- López, A. 2003. **Manual Para la Preparación y Venta de Frutas y Hortalizas: Del campo al mercado. Capítulo 4. Aspectos higiénicos y sanitarios.** Boletín de servicios agrícolas de la FAO. INTERNET: <http://www.fao.org/3/Y4893S/y4893s07.htm>
- López, L., Romero, J. y Duarte, F. 2003. **Calidad Microbiológica y Desinfección en Vegetales Pretrozados expendidos en Chile.** Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 53(4): 383 – 388.
- Luo, Y., Nou, X., Millner, P., Zhou, B., Shen, C., Yang, Y., Wu, Y., Wang, Q., Feng, H. y Shelton, D. 2012. **A Pilot Plant Scale Evaluation of a New Process Aid for Enhancing Chlorine Efficacy Against Pathogen Survival and Cross-contamination during Produce Wash.** International Journal of Food Microbiology. 158: 133 – 139.
- Marín, F. & Barrantes, M. 1998. **Empleo de Cloro como Tratamiento Poscosecha de Productos Frescos.** Boletín Poscosecha Centro de Investigaciones Agronómicas, 2: 7-10.
- McGlynn, W. 2007. **Guidelines for the Use of Chlorine Bleach as a Sanitizer in Food Processing Operations.** Internet: https://shareok.org/bitstream/handle/11244/50164/oksd_fapc_116_2013-12.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Meilgaard, M., Civille, G.V. y Carr, B.T. 1991. **Sensory Evaluation Techniques.** 2 Edición, CRC Press, Inc. Estados Unidos, p. 338.
- Menéndez, T. y Hernández, M. 2003. **La situación actual y perspectiva de la papa como alimento.** Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria. La Habana. Internet: <http://www.redepapa.org/tania.pdf>.
- Miller, V., Mente, A., Dehghan, M., Rangarajan, S., Zhang, X., Swaminathan, S., Gilles, D., Gupta, R., Mohan, M., Lear, S., IBangdiwala, S., Schutte, A. E., Wentzel-Viljoen, E., Avezum, A., Altuntas, y., Yusoff, K., Ismail, S. N., Peer, N. y Mapanga, R. 2016. **Fruit, vegetable, and legume intake, and cardiovascular disease and deaths in 18 countries (PURE): a prospective cohort study.** Lancet. 390 (10107): 2037 - 2049.
- Montero, M., Rojas M.A., Soliva R. y Martín O. 2009. **Tendencias en el Procesado Mínimo de Frutas y Hortalizas Frescas.** Revista Horticultura Internacional, Extra Postcosecha No. 69. España. Internet: http://www.horticom.com/revistasonline/extras/extra09/48_51.pdf

- Moreno, B. 2011. **Higiene e Inspección de Carnes**. Editorial Díaz de Santos. España. Pág 552.
- Murray, A. y Lantagne, D. 2014. **Accuracy, Precision, Usability and Cost of Free Chlorine Residual Testing Methods**. *Journal of Water and Health*. 13 (1): 79 – 90.
- Neo, S. Y., Lim, P. Y., Phua, L. K., Khoo, G. H., Kim, S. J., Lee, S. C. y Yuk, H. G. 2013. **Efficacy of chlorine and peroxyacetic acid on reduction of natural microflora, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. on mung bean sprouts**. *Food Microbiology*, 36: 475-480.
- Novak, J. S., Sapers, G. M. y Juneja, V. K. 2003. **Microbial Safety of Minimally Processed Foods**. 1 edición. CRC Press, Estados Unidos.
- Olivas-Gastelum, R., Nevárez-Moorillon, G. V. y Gastelum-Franco, M. G. 2009. **Las pruebas de diferencia en el análisis sensorial de los alimentos**. *Tecnociencia*. Vol. 3 (1). Internet: <http://tecnociencia.uach.mx/numeros/v3n1/data/AnalisisSensorialdeAlimentos.pdf>
- Olmez, H. y Kretschmar, U. 2009. **Potential Alternative Disinfection Methods for Organic Fresh Cut Industry Minimizing Water Consumption and Environmental Impact**. *Food Science and Technology*. 42 (3): 686 – 693.
- OMS, 2009. **Medición del Cloro Residual en el Agua**. Guías técnicas sobre saneamiento, agua y salud – Guía #11. Internet: <http://www.crid.or.cr/digitalizacion/pdf/spa/doc18189/doc18189-contenido.pdf>
- ONS (Oficina Nacional de Semillas). 2015. **Certificación de semilla de papa**. Internet: http://ofinase.go.cr/index.php?option=com_content&view=article&id=89&Itemid=129
- Palintest. 2009. **Manual de Usuario del clorímetro Chlorosense**. Internet: <https://www.palintest.com/products/chlorosense/>
- Patnaik, P. 2004. **Dean's Analytical Chemistry Handbook**. 2 edición. Editorial MacGraw Hill, Estados Unidos.
- Pedrero, D. y Pangborn R.M. 1989. **Evaluación Sensorial de los Alimentos: Métodos Analíticos**. 1 edición. Editorial Alhambra, México.
- Pensack- Rinehart, H. y Bunning, M. 2019. **Carrots**. Food Source Information. Colorado Integrated Food Safety Center for Excellence. Internet: www.fsi.colostate.edu/carrot/
- PIMA, 2001. **Comercialización Hortifrutícola en CENADA, Manual de Consultas**. Editorial PIMA – CENADA, Costa Rica.
- PIMA. 2017. **Tendencias del Consumo de Frutas, Hortalizas, Pescado y Mariscos en las Familias de Costa Rica**. Costa Rica. Internet: <http://www.pima.go.cr/wp-content/uploads/2017/07 /Analisis-Consumo.pdf>

- Posada-Izquierdo, G., Pérez-Rodríguez, F., López-Gálvez, F. y Allende, A. 2013. **Modelling growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-cut lettuce submitted to commercial process conditions: chlorine washing and modified atmosphere packaging.** Food Microbiology, 33: 131-138.
- Richardson, S.D., Thruston Jr. A.D., Caughran, T.V., Collette, T.W., Patterson, K.S., y Lykins Jr. B.W. 1998. **Chemical By-Products of Chlorine and Alternative Disinfectants.** Food Technology, 52(4): 58-61.
- Richmond-Zumbado, F. y Méndez-Soto, C. 2010. **Rendimiento en 12 híbridos comerciales de zanahoria (*Daucus carota* L.) en el campo y en la planta de empaque.** Agronomía Mesoamericana. 21:(1).
- Richmond, F., Méndez, C. y Umaña, G. 2011. **Cambio en las características de calidad de 12 híbridos comerciales de zanahoria durante el almacenamiento.** Agronomía Costarricense 35 (1): 163 – 174.
- Rico, D., Martín-Diana, A. B., Barat, J. M. y Barry-Ryan, C. 2007. **Extending and Measuring the Quality of Fresh-cut Fruit and Vegetables: A Review** Trends in Food Science and Technology. 18: 373 – 386.
- Ritenour, M., Sargent, S., Bartz, J. y Lon Kan, E. 2007. **Uso del Cloro en las Líneas de Empacado de Productos Cosechados Frescos.** Estados Unidos. Internet: <http://edis.ifas.ufl.edu/hs336>
- Rossi, R. 2019. **The EU fruit and vegetable sector: Main features, challenges and prospects.** European Parliament European Parliamentary Research Service. Internet: [http://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/BRIE/2019/635563/EPRS_BRI\(2019\)635563_EN.pdf](http://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/BRIE/2019/635563/EPRS_BRI(2019)635563_EN.pdf)
- Rousseau, B. 2004. **Sensory Evaluation Techniques.** En: Nollet, L. 2004. Handbook of Food Analysis. 2 edición, Editorial Marcelle Decker Inc., Estados Unidos.
- Salfinger, Y. y Tortorello M.L. 2015. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** 5 edición. APHA Press. Estados Unidos.
- Sancho, J., Bota, E. y Castro, J. 1999. **Introducción al Análisis Sensorial de los Alimentos.** Edicions Universitat de Barcelona. Barcelona, pág 142.
- Sanz, S., Giménez, M., Olarte, C., Lomas, C. y Portu J. 2002. **Effectiveness of Chlorine Washing Disinfection and Effects on the Appearance of Artichoke and Borage.** Journal of Applied Microbiology. 93: 986 – 993.
- Sapers, G., Gorny, J. y Youssef, A. 2005. **Microbiology of Fruits and Vegetables.** Editorial Taylor y Francis, Nueva York.

- Saravacos, G. y Kostaropoulos, A. 2002. **Handbook of Food Processing Equipment**. Editorial Pluwer Academic / Plenum Publishers, Nueva York, páginas 133 – 144.
- Saravacos, G. y Maroulis, Z. 2011. **Food Process Engineering Operations**. Editorial Taylor y Francis, Florida, páginas 166 – 170.
- Seo, K.H. y Frank, J.F. 1999. **Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to Lettuce Leaf Surface and Bacterial Viability in Response to Chlorine Treatment as Demonstrated by Using Confocal Scanning Laser Microscopy**. Journal of Food Protection, 62(1): 1 – 9.
- Siti Mazlina, M.K., Nur Aliaa, A. R., Nor Hidayati, H., Intan Shaidatul Shima, M. S. y Wan Zuha, W. H. 2010. **Design and Development of an Apparatus for Grating and Peeling Fruits and Vegetables**. American Journal of Food Technology, 5: 385-393.
- Stone, H. y Sidel, J. 2004. **Sensory Evaluation Practices**. Tercera edición. Elsevier Academic Press. Estados Unidos, pág 15.
- Suzlow, T. 2001. **Postharvest chlorination**. Department of Vegetable Crops. Publication 8003. University of California-Davis. Internet: <http://anrcatalog.ucdavis.edu/pdf/8003.pdf>
- Takeuchi, K. y Frank, J. 2001. **Direct Microscopic Observation of Lettuce Leaf Decontamination with a Prototype Fruit and Vegetable Washing Solution and 1% NaCl-NaHCO₃**. Journal of Food Protection, 64(8): 1235-1239.
- Tarigo, A., Repetto, C. y Acosta, D. 2004. **Evaluación agronómica de biofertilizantes en la producción de lechuga (*Lactuca sativa*) a campo**. Tesis presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de La República, Facultad de Agronomía. Montevideo, Uruguay. Internet: <http://biblioteca.fagro.edu.uy/iah/textostesis/2004/3171tar1.pdf>
- Ten, Z., Van Haute, S., Zhou, B., Hapeman, C. J., Millner, P. D., Wang, Q y Luo, Y. 2018. **Impacts and interactions of organic compounds with chlorine sanitizer in recirculated and reused produce processing water**. PLoS ONE. 13(12): 1 – 15.
- Toivonen, P. y Lu, C. 2013. **Differential quenching of free chlorine by organic compounds potentially exuded from injured plant tissues**. Postharvest Biology and Technology 86: 192–194. INTERNET: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521413002020>
- Tortorello, M. 2003. **Indicator Organisms for Safety and Quality Uses and Methods for Detection: Minireview**. Journal AOAC International. 86: 1208 – 1217.
- Universidad de Clemson. 2012. **Describe how to test the strength of a chemical sanitizer**. Internet: <http://www.foodsafety.gov/educators/competencies/foodservice/cleaning/cas3.html>

- Universidad de Minnesota y Ministerio de Agricultura de Estados Unidos. 2012. **Wash Water Sanitizers – Small Farm Food Safety Series.** Internet: <http://safety.cfans.umn.edu/files/2012/08/Wash-Water-Sanitizers-Feb2.pdf>
- Vandenkinderen, I., Devlieghere, F., Van Camp, J., Kerkaert, B., Cucu, T., Ragaert, P., De Bruyne, J. y De Meulenaer, B. 2009. **Effects of Food Composition on the Inactivation of Foodborne Microorganisms by Chlorine Dioxide.** International Journal of Food Microbiology. 131: 138 – 144.
- Vega, T., Méndez, C y Rodríguez, W. 2012. **Análisis del crecimiento de cinco híbridos de zanahoria (*Daucus carota* L.) mediante la metodología del análisis funcional.** Agronomía Costarricense. 36 (2): 29 - 46.
- Velásquez, L., Barbini, N., Escudero, M. E. y Lucero, C. 2009. **Evaluation of chlorine, benzalkonium chloride and lactic acid as sanitizers for reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* on fresh vegetables.** Food Control. 20: 262 – 268.
- Venkitanarayanan, K. S., Lin, C. M., Bailey, H., y Doyle, M. P. 2002. **Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, Salmonella Enteritidis, and *Listeria monocytogenes* on apples, oranges and tomatoes by lactic acid with hydrogen peroxide.** Journal of Food Protection, 65: 100 – 105.
- Wassim-Siddiqui, M. y Shafiur-Rahman, M. 2015. **Minimally Processed Foods.** 1 edición. Springer, Estados Unidos.
- Waters, B. W. y Hung, Y. C. 2014. **The Effect of pH and Chloride Concentration on the Stability and Antimicrobial Activity of Chlorine-Based Sanitizers.** Journal of Food Science. 79 (4): 622 – 627.
- WHO (World Health Organization). 2003. **Chlorine in Drinking Water.** Suiza. Internet: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chlorine.pdf
- Wu, F. M., Doyle, M. P., Beuchat, L. R., Wells, J. G., Mintz, E. D. y Swaminathan, B. 2000. **Fate of *Shigella sonnei* on Parsley and Methods of Disinfection.** Journal of Food Protection, 63(5): 568-572.
- Wu, Y., Zhang, D., Jiang. X. y Jiang, W. 2015. **Fruit and vegetable consumption and risk of type 2 diabetes mellitus: A dose-response meta-analysis of prospective cohort studies.** Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 25 (2): 140 – 147.
- Zhan, J., Liu, Y. J., Cai, L. B., Xu, F. R., Xie, T. y He, Q. Q. 2017. **Fruit and vegetable consumption and risk of cardiovascular disease: A meta-analysis of prospective cohort studies.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57 (8):1650 – 1663.
- Zhang, S. y Farber, J.M. 1996. **The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh cut vegetables.** Food Microbiology, 13: 311-321.

- Zhang, C. 2007. **Fundamentals of Environmental Sampling and Analysis**. Editorial Wiley Interscience, Estados Unidos.
- Zhang, L. A. 2013. **Removal of Chlorine Residual in Tap Water by Boiling or Adding Ascorbic Acid**. International Journal of Engineering Research and Applications, 13 (5): 1647-1651. Internet: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.1076.638&rep=rep1&type=pdf>
- Zhuang, R. Y., Beuchat, L. R. y Angulo, F. J. 1995. **Fate of *Salmonella montevideo* on and in raw tomatoes as affected by temperatura and treatment with chlorine**. Applied Environmental Microbiology, 61: 2127-2131.

