



## **MEMORIA TRABAJO FIN DE MÁSTER**

# **USO DE HIPOCLORITO DE SODIO EN LA DESINFECCIÓN DE VEGETALES PARA IV Y V GAMA: VERIFICACIÓN DEL REGLAMENTO 773/2023**

***MÁSTER INTERUNIVERSITARIO DE NUTRICIÓN Y  
METABOLISMO***

*CURSO 2023-2024*

***QUICKCHEF S.L.***

**AUTORA: MIRIAM MONCHO PALMER**

**TUTORA ACADÉMICO: DRA. ALMUDENA GARCÍA RUIZ**

**TUTORA PROFESIONAL: CAROLINA URBANO SAVELLI GOMES**

# ÍNDICE

RESUMEN.....	4
1. INTRODUCCIÓN .....	5
1.1 Tendencias Alimentarias e Innovación tecnológica.....	5
1.2 Contaminación microbiana .....	5
1.3 Estrategias para prevenir el crecimiento microbiano.....	7
1.4 Directrices legislativas referentes a la seguridad alimentaria .....	8
1.5 Condiciones para tener una correcta eficacia del cloro.....	9
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	12
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
3.1 Verduras y hortalizas empleados.....	13
3.2 Producto desinfectante .....	13
3.3 Determinación de contenido de cloro a lo largo del proceso de desinfección ....	13
3.3.1 Concentración de cloro en el vaso higienizador .....	13
3.3.2 Concentración de cloro en agua de red .....	14
3.3.3 Concentración de cloro en agua de aclarado .....	14
3.4 Determinación de la temperatura y pH .....	14
3.5 Determinación de cloratos .....	14
3.6 Determinación de la carga microbiana en los vegetales estudiados .....	15
3.6.1 Medios de cultivo empleados .....	15
3.6.2 Contenido de enterobacterias totales, <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> .....	15
3.6.3 Contenido de coliformes totales .....	16
3.6.4 Contenido de <i>L. monocytogenes</i> .....	16
3.7 Análisis estadístico.....	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
4.1 Determinación de la temperatura, pH y contenido de cloro en agua durante las diferentes etapas de desinfección de vegetales .....	17
4.1.1 Etapa de desinfección en el vaso higienizador.....	17

4.1.2 Etapa de aclarado del agua .....	18
4.2 Determinación de cloratos .....	19
4.3 Evaluación del contenido microbiológico de los vegetales tras su proceso de desinfección con cloro .....	20
4.3.1 Comparación de la concentración de enterobacterias en muestras de vegetales desinfectadas con diferentes concentraciones de cloro .....	22
4.3.2 Comparación de muestras de cebolla con distintos pH controlado con ácido acético .....	23
5. CONCLUSIÓN .....	26
6. BIBLIOGRAFÍA .....	27

## RESUMEN

Debido a los diferentes cambios en nuestra sociedad actual, que han afectado a la seguridad alimentaria se han implementado nuevos parámetros para la desinfección de vegetales, con una concentración máxima de 80 ppm de hipoclorito de sodio, descrito en el *Reglamento 773/2023*. Este estudio quiere verificar que esta concentración límite, tiene un efecto antimicrobiano eficaz en productos de IV y V gama. Para ello, se analizaron a nivel microbiológico muestras de vegetales desinfectados con la nueva concentración de cloro para verificar el cumplimiento de los criterios establecidos por la legislación, además para tener un control sobre los parámetros que afectan a la eficacia del cloro se monitorearon a lo largo de todo el proceso de desinfección. Se compararon también, los resultados microbiológicos de las muestras desinfectadas con 80 ppm de cloro, con muestras desinfectadas con concentraciones superiores y con muestras controlando el pH del agua de desinfección. Los resultados microbiológicos de las muestras indican que los resultados en los vegetales desinfectados a 80 ppm han sido similares a concentraciones superiores, ya que no se han visto diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Todos, los parámetros de control durante la desinfección fueron correctos con excepción del pH, aun así, respecto a los análisis en muestras con distinto pH, no se observan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). El hipoclorito de sodio a 80 ppm ha sido eficaz en la reducción de carga microbiana inicial en las muestras de vegetales.

**Palabras clave:** Hipoclorito sódico; desinfección; análisis microbiológico.

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1 Tendencias Alimentarias e Innovación tecnológica**

La sociedad occidental tiene estilos de vida cada vez más estresantes, que se reflejan también en cambios en sus conductas alimentarias. Dentro de estos cambios destaca el hecho de que se cocina menos, entre otros factores por falta de tiempo y se consumen más alimentos preparados, debido a su comodidad. También destacan otros cambios debido a que la sociedad tiene cada vez más preocupación por su alimentación, es por ello por lo que han surgido nuevas tendencias alimentarias como es el veganismo/vegetarianismo, un mayor reclamo de snacks saludables, productos ecológicos/orgánicos o “superfoods” con propiedades beneficiosas sobre la salud y el bienestar. En consecuencia, a todos estos cambios ha sido necesaria la innovación tecnológica y el desarrollo de criterios de seguridad alimentaria para garantizar la inocuidad de los productos procesados, preservando así la salud pública. En este sentido, hay una gran demanda de productos de IV gama, alimentos hortofrutícolas frescos y limpios, como por ejemplo las ensaladas empaquetadas, frutas y verduras cortadas y listas para el consumo. También los productos de V gama son demandados por la población ya que son alimentos a los que se les ha aplicado una manipulación, como puede ser añadir diversos ingredientes para elaborar platos precocinados envasados listos para calentar y consumir. Es importante destacar, que la base de estos alimentos son los vegetales, por lo que su seguridad ha sido una preocupación de gran relevancia. Ello se debe a que cualquier alimento vegetal mínimamente procesado es susceptible al crecimiento microbiano, debido a su alto contenido en humedad y nutrientes. Además, en su proceso de manipulación se incluyen etapas como cortar, pelar y triturar que generan daños en la superficie del alimento y que pueden llegar a ser foco de contaminación microbiana, y es por ello, que requieren de un alto control en cuanto a seguridad alimentaria (1–4).

## **1.2 Contaminación microbiana**

A lo largo de las diferentes etapas del procesado de vegetales el riesgo de contaminación microbiana es elevado. Entre estas etapas encontramos la

producción primaria, incluyendo la cosecha y la precosecha o las fases siguientes como el procesamiento destinado a la obtención de productos destinados a la restauración colectiva. Dentro de las categorías microbiológicas, se incluyen los patógenos. Entre estos podemos mencionar aquellos que son capaces de proliferar a temperaturas bajas, los que son susceptibles a entornos atmosféricos modificados y los de transmisión alimentaria, que son aquellos que se transfieren del suelo en el que crecen los vegetales (2).

La resistencia y proliferación de microorganismos en productos vegetales es debida a varios factores ( $T^a$ , humedad, etc.), ya que, dependiendo de la especie y cepa, presentaran diferentes condiciones de crecimiento. Se pueden clasificar estos factores en dos categorías, los factores intrínsecos, que son inherentes a la matriz alimentaria y los factores extrínsecos, que son condiciones ambientales controlables, relacionadas con el entorno ambiental durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos. Algunos ejemplos se presentan en la tabla 1(5,6).

**Tabla 1.** Factores intrínsecos y extrínsecos de los alimentos

Factores intrínsecos	Factores extrínsecos
Composición Alimento	Temperatura
Actividad del agua	Humedad del medio
pH	Atmósfera gaseosa ambiental
Potencial redox	

Entre los microorganismos patógenos que pueden contaminar los alimentos vegetales y provocar un riesgo sobre la salud de las personas podemos destacar las enterobacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella spp*, que están presentes en aguas contaminadas con material fecal. *E. coli* puede provocar cuadros de gastroenteritis, colitis hemorrágica y, en casos graves, síndrome hemolítico urémico que puede tener consecuencias mortales. Por su parte,

*Salmonella spp.* Puede provocar fiebre tifoidea, dolor abdominal y problemas dérmicos. En cuanto a los coliformes totales, que se utilizan como indicadores de calidad sanitaria del agua, son importantes en cuanto a patógenos de vegetales, ya que su presencia se relaciona con enfermedades gastrointestinales graves. A su vez, es importante detectar la presencia de *Listeria monocytogenes*, ya que es habitual encontrar este patógeno en alimentos de origen vegetal y porque además, tienen un alto riesgo de producir cuadros gastrointestinales, meningitis, abortos o incluso la muerte (7–9).

### 1.3 Estrategias para prevenir el crecimiento microbiano

Como se ha citado previamente, uno de los factores que producen un mayor deterioro de los alimentos, especialmente en vegetales, es la contaminación microbiana. En este sentido y con el objetivo de prolongar la vida útil de los alimentos, así como garantizar su seguridad alimentaria se han implementado varias estrategias destinadas a reducir al mínimo el riesgo de crecimiento microbiano. En cuanto a la refrigeración, es una de las estrategias más utilizadas ya que permite ralentizar la actividad microbiana gracias a la baja temperatura y mantener una mayor calidad y seguridad en el alimento. Por otra parte, sobre todo en la industria alimentaria, se usa la desinfección con químicos, que ayudan a reducir la carga microbiana en los alimentos debido a que tienen poder oxidativo que destruye las estructuras microbianas. Existen otro tipo de técnicas como son la modificación de pH, el uso de atmósferas modificadas o procesos de deshidratación. Todas estas estrategias destacan por ser eficaces por prolongar la vida útil de los alimentos al inhibir las condiciones favorables para el desarrollo de los microorganismos patógenos. Muchas de estas técnicas pueden utilizarse de forma conjunta, para tener una mayor seguridad, siendo la secuencia más empleada habitualmente la que se describe en la figura 1 (1,10,11).



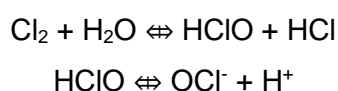
**Fig 1.** Barreras de protección frente microorganismos

#### 1.4 Directrices legislativas referentes a la seguridad alimentaria

A nivel legislativo se han creado diversas directrices de seguridad alimentaria relacionadas con pautas de higiene para los productos alimenticios, tales como el *Real Decreto 852/2004*. En este decreto se describe la implementación de buenas prácticas higiénicas y controles para mantener la inocuidad de los alimentos. Por otro lado, el *Reglamento 2073/2005* relativo a los criterios microbiológicos de los alimentos, en concreto, se indica que para el análisis microbiológico de alimentos de IV y V gama se deben utilizar 5 muestras de 5 gramos, y en ninguna de ellas debe detectarse la presencia de *L. monocytogenes*. A su vez, también se indica que al final de la vida útil del producto, la concentración de esta bacteria debe ser inferior a 100 unidades formadoras de colonias (UFC) en las 5 muestras analizadas (9,12).

El *Reglamento 2073/2005* también menciona los niveles permitidos de *Salmonella* y *E.coli* en productos de IV gama, en cambio en los productos de V gama no se hace mención. Al igual que para *L. monocytogenes*, se establece que la presencia de *Salmonella* debe ser nula por cada 25 gramos/producto, o lo que es lo mismo, no puede detectarse su presencia en las 5 muestras de 5 gramos que conforman el análisis microbiológico. En cuanto a *E.coli*, únicamente en 2 de las 5 muestras podría detectarse un recuento entre 100-1000 UFC/g, mientras que en las otras 3, el recuento debería ser <100 UFC/g (9).

Con base a lo expuesto previamente ya que se conoce que los vegetales tienen una alta carga microbiana, en las empresas se suelen desarrollar protocolos de desinfección con el fin de cumplir con los requisitos microbiológicos establecidos en el *Reglamento 2073/2005*. En concreto, se pueden utilizar coadyuvantes tecnológicos, como es el hipoclorito sódico. Este compuesto se utiliza en una solución acuosa, que permite alcanzar un equilibrio de cloro ( $\text{Cl}_2$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ) e iones hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ) (Figura 2) (9).



**Fig 2:** Composición del hipoclorito en una solución acuosa

El hipoclorito sódico es un producto utilizado como desinfectante, por ser económico y por reducir de forma eficaz la carga microbiana del agua y de los alimentos. La concentración permitida de hipoclorito sódico en los procesos de desinfección se establece en el *Reglamento 773/2023*, donde se establece un límite máximo de 80 partes por millón (ppm) de cloro en el agua de lavado, además de acompañarse posteriormente por un aclarado con agua para consumo humano. Esta agua utilizada para el aclarado debe de cumplir con los requisitos del *Real Decreto 03/2023*, relativo a la calidad y control del agua potable, como por ejemplo que el agua tenga una turbidez menor a 0,8 unidades nefelométricas de turbidez (UNF). Al utilizar este tipo de productos químicos para la desinfección, pueden aparecer subproductos como los cloratos, debido a la degradación del cloro, por lo que los niveles máximos de residuos de este tipo de contaminantes están establecidos en el *Reglamento 749/2020*. En el caso del pimiento este límite sería de 0,3 mg/kg mientras que para la cebolla sería de 0,5 mg/kg (13,14).

### **1.5 Condiciones para tener una correcta eficacia del cloro**

En vegetales, y con el objetivo de mantener la calidad microbiana del agua, así como controlar la contaminación cruzada es necesario utilizar un vaso higienizador, una “lavadora” de hortalizas y el uso de desinfectantes como se mencionó anteriormente. Lavar las frutas y verduras en agua limpia solo permite reducir una parte muy pequeña de microorganismos, por lo que es necesario el uso de desinfectantes en esta limpieza. En este sentido, con el uso de desinfectantes se alcanza una reducción de 1-2 logs de microorganismos en la superficie del producto. En cuanto a la eficacia de desinfección de estos agentes antimicrobianos también hay que considerar otros parámetros como la concentración utilizada, temperatura, pH del agua y el tiempo de exposición al producto. Estos parámetros también deben ser considerados para evitar al máximo algún tipo de intoxicación (15).

A modo de ejemplo en la tabla 2, se exponen diferentes parámetros sobre la eficiencia antimicrobiana del cloro. Como se puede observar en la bibliografía no existe una unanimidad sobre los criterios a emplear. Sin embargo, en líneas generales, estudios hacen referencia a la importancia de tener un control de

pH, ya que determina la clase de microorganismos que crecen o se inhiben en el alimento, así como la eficacia de acción del agente desinfectante. En relación con el hipoclorito sódico, el valor de pH de la solución acuosa podría variar la concentración de sus componentes (cloro, ácido hipocloroso e ion hipoclorito) y con ello su eficacia antimicrobiana. Por ejemplo, a un pH más básico, la solución podría ser más estable debido a que predomina el ion hipoclorito, pero este, tiene un poder oxidante menor en comparación con el ácido hipocloroso, por lo que la capacidad de desinfección se podría ver mermada. Es por ello, que cuanto más básica sea el agua de desinfección, más cantidad de cloro deberá añadirse, por lo que el rango óptimo se encuentra de 6,5 – 7,5 (16–18).

**Tabla 2.** Parámetros de control para la desinfección de vegetales de distintas referencias bibliográficas

Referencias	Parámetros de control				
	pH	Cloro (ppm)	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)	
				Producto	Agua
CFIA. (2009). Canadá	6-7	100-150	< 5	< 4	-
FAO. (2011). Bangkok	4,5-5,5	50-100	-	-	5
Gil, M. I., Selma, M. V., López-Gálvez, F., & Allende, A. (2009). España.	-	200	1-2	-	-
FSAI. (2001). Irlanda	6.6	50-100	1-3	-	8-12
Decreto 131/2006. (2006). España (Aragón)	-	70	5	-	-
FAO. (2003). Argentina	6,7-7,5	100-200	3-5	-	-
Sanz, S. et al (2002). España.	-	50-100	< 5	-	-

En relación con la concentración de cloro en agua, en el pasado, se solía emplear concentraciones elevadas de cloro libre, típicamente entre 100 y 200 ppm. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, según la implementación del *Real Decreto 773/2023*, se ha establecido un límite máximo

de 80 ppm para el uso de hipoclorito sódico en la desinfección de frutas y hortalizas listas para el consumo (14,19).

También, anteriormente se exponía a los vegetales a largos tiempos dentro de la solución con cloro, pero se ha puesto en evidencia que no hay una relación directa entre el tiempo de exposición y una mayor reducción microbiana. Se ha visto que con un tiempo de exposición entre 3 y 5 minutos son suficientes para la reducción de 1-2 log la carga microbiana (15,19,20).

Finalmente, se tiene que controlar la temperatura tanto la del producto como la del agua de desinfección, recomendándose que el producto tenga una temperatura superior a la del agua. Esto se debe a que los vegetales pueden sufrir infiltración del agua en el caso de que esta sea más fría. Esto se debe a que al generarse esta diferencia de temperatura entre el producto y el agua se crea una presión que permite que entre el agua. Esto es relevante ya que si hubiera patógenos en esta agua también podrían infiltrarse en el alimento. En general, el producto suele estar a una temperatura de  $\leq 4^{\circ}\text{C}$ , por lo que el agua debería estar a unos  $8-12^{\circ}\text{C}$  (7,21).

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Con base a todo ello, con respecto a la hipótesis de este trabajo es que se puede lograr un efecto antimicrobiano óptimo utilizando una concentración de cloro menor a la empleada anteriormente, siempre y cuando se mantengan en un punto óptimo las variables que afectan a la eficacia del cloro, como son la temperatura, el tiempo de exposición y pH.

Con el fin de corroborar dicha hipótesis, se propone el siguiente objetivo:

- Verificar que a la concentración límite de 80 ppm, establecida por el *Reglamento 773/2023*, el hipoclorito sódico tiene un efecto antimicrobiano eficaz frente a la carga microbiana de productos de IV y V gama y asegurar el cumplimiento de los estándares de seguridad alimentaria de dichos productos.

Para la consecución de dicho objetivo principal, se exponen los siguientes objetivos específicos:

- Monitorear los parámetros relacionados con el cloro y su efectividad durante el proceso de desinfección de vegetales.
- Evaluar la eficacia antimicrobiana del hipoclorito sódico en productos de IV gama a una concentración límite de 80 ppm.
- Comparar la eficacia antimicrobiana del hipoclorito sódico a 80 ppm vs concentraciones superiores.
- Estudiar el efecto que el pH tiene sobre la capacidad antimicrobiana del hipoclorito sódico.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 Verduras y hortalizas empleados**

En el presente estudio se evaluaron cebolla, puerro, col, pimiento y zanahoria, procedentes del mercado central y de huerto de la zona de Tarragona. Se utilizaron estos vegetales ya que forman parte de la producción de productos de IV y V gama.

#### **3.2 Producto desinfectante**

Se ha utilizado para la desinfección de vegetales hipoclorito sódico “Asepclor” de la marca Proquimia (Barcelona, España) en una concentración de 80 ppm según indica el *Reglamento 773/2023*. El cloro es dispensado al vaso higienizador mediante una bomba de la misma marca. También se utilizó ácido acético proveniente del vinagre blanco comercial para controlar pH del agua del vaso higienizador, en una concentración de 0,3 mL por litro de agua.

#### **3.3 Determinación de contenido de cloro a lo largo del proceso de desinfección**

En el presente estudio, la concentración de cloro en agua se determinó en tres puntos; i) en el vaso higienizador, ii) en el agua de red y iii) en el agua de aclarado de vegetales con el fin de verificar la concentración de cloro residual a lo largo de todo el proceso de desinfección.

##### **3.3.1 Concentración de cloro en el vaso higienizador**

Para esta determinación se midieron tanto el cloro total como el libre en dos etapas de desinfección; inicial (minuto cero antes de añadir el vegetal en la solución desinfectante) y final (minuto cinco, después de la estada del vegetal en la solución desinfectante). De esta manera, se pueden registrar los niveles de cloro y observar la pérdida de cloro tras la desinfección de los vegetales.

##### Determinación del contenido de cloro total

Para la medición de cloro total se utilizó el kit de determinación de cloro 10-200 ppm de la marca Diversey (Barcelona, España). Este kit colorimétrico permite mediante tiras reactivas determinar el contenido de cloro de una muestra. En

primer lugar, se sumergió la tira reactiva dentro del agua y tras una espera de 15 segundos se comparó el cloro obtenido con la tabla de colores del producto.

#### Determinación del contenido de cloro libre

Para la determinación del contenido de cloro libre se utilizó un kit de tiras reactivas de la marca Metria (Barcelona, España) que nos permite medir la concentración de cloro libre de 0-300 mg/L de una solución. El protocolo de este kit es similar al expuesto en el anterior apartado con la marca Diversey.

#### **3.3.2 Concentración de cloro en agua de red**

Para esta determinación se utilizó el medidor digital Checker HANNA (Gipuzkoa, España) que es un colorímetro digital, que permite ver la concentración de cloro libre en una muestra de agua. Se siguió el protocolo descrito en las fichas técnicas del producto, se tomó una muestra de 10 mL de agua y se realizó una primera lectura, a continuación, se añadió dos reactivos (hidróxido de sodio y ácido sulfúrico) y se volvió a hacer otra lectura dando el resultado final, comparando el color inicial vs final.

#### **3.3.3 Concentración de cloro en agua de aclarado**

Respecto al agua de aclarado de vegetales previamente desinfectado, se midió únicamente el cloro total con Checker HANNA siguiendo con el protocolo descrito en la sección 3.3.2.

#### **3.4 Determinación de la temperatura y pH**

Indicar que se utilizó un pHmetro de la marca Testo (Barcelona, España) que nos permitió determinar la temperatura y pH del agua del vaso higienizador y la temperatura del producto. Estos dos parámetros afectan a la eficacia del cloro total y libre del agua de forma significativa. Ambos, se midieron antes de verificar la concentración de cloro inicial en el vaso.

#### **3.5 Determinación de cloratos**

Se evaluó la concentración de cloratos en la muestra de pimiento con el fin de verificar que estaba dentro de los parámetros legislados. Se seleccionó este vegetal porque se le aplicó una doble desinfección. Para determinar la

concentración de cloratos se utilizó el sistema UPLC-MS/MS, que combina la cromatografía iónica con la espectrometría de masas. El procedimiento comenzó con la preparación de diluciones, en las que se homogenizaron 50 mg de muestras de pimiento en 1,5 mL de metanol/agua (1:1), posteriormente los homogenizados se transfirieron a tubos eppendorf y se centrifugaron. Los sobrenadantes se decantaron y finalmente, los extractos se almacenaron a -40°C. La cromatografía se llevó a cabo en una columna Waters Acquity UPLC HSS T3 a 40°C. Siguiendo el protocolo descrito por American Chemical Society (22).

### **3.6 Determinación de la carga microbiana en los vegetales estudiados**

En este análisis se determinó la presencia de enterobacterias totales, coliformes totales, *L. monocytogenes*, *Salmonella* y *E. coli* tanto antes como después del proceso de desinfección. Siguiendo la normativa del *Reglamento 2073/2005* el contenido de *L. monocytogenes* y *Salmonella* se determinó en 25 g de muestras de vegetales expuestas en la sección 3.1 (9).

Los vegetales utilizados para las muestras de análisis fueron pimiento, puerro y cebolla. De cada vegetal se tomaron 5 muestras antes y después de la desinfección, de aproximadamente 70 g cada una.

#### **3.6.1 Medios de cultivo empleados**

Para determinar la presencia de *E. coli* se emplearon placas de Petri con medio de cultivo MacConckey (Quimvita, Madrid, España). En el caso de *Salmonella*, se utilizó el medio de cultivo de agar desoxicolato de citrato (Condalab, Madrid, España). Para coliformes totales, se empleó un medio de cultivo violet red bile lactose (VRBL) (Labox, Barcelona, España). Por último, para el cultivo de *L. monocytogenes* se utilizó el medio de cultivo agar Oxford modificado (MOX) (Quimvita, Madrid, España).

#### **3.6.2 Contenido de enterobacterias totales, *E. coli* y *Salmonella***

Para la determinación de posible presencia de estas bacterias se aplicó el método analítico de cultivo en placa, donde se cuentan el número de colonias que se desarrollan en un medio de cultivo sólido tras sembrar una cantidad

definida de agua. Para *E. coli* las placas Petri, se incubaron durante toda la noche en una estufa a 37°C. Mientras que, para *Salmonella*, se incubaron durante 18 horas a una temperatura de 37°C (23,24).

### **3.6.3 Contenido de coliformes totales**

Su contenido se evaluó utilizando el protocolo de número más probable (NMP), que permite una determinación cuantitativa de las bacterias. Este método consiste en realizar una serie de diluciones de la muestra en un medio adecuado para el crecimiento bacteriano. Luego las diluciones se inoculan a una temperatura de 35-37°C durante un período de 24-48 horas y finalmente se observa la turbidez de las muestras para evaluar la presencia bacteriana (8).

### **3.6.4 Contenido de *L. monocytogenes***

Se determinó la ausencia mediante el protocolo ELFA, un análisis enzimático ligado a fluorescencia. En este método, se inocula en la placa Petri con el medio MOX y se enriquece con caldo Fraser completo y se incuba a 35°C durante 48 horas. A continuación, se inmovilizó el antígeno en una tira reactiva, a la que se añadió la muestra, permitiendo que el antígeno se uniera a los componentes de esta. Luego, se lavó la tira para eliminar material no unido. Posteriormente, se añadió un conjugado enzimático, que se unió al antígeno, produciendo fluorescencia, indicando presencia/ausencia del antígeno (25).

## **3.7 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prims 8 (Dotmatrix, San Diego, California) y las diferencias entre medias se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ . Se realizó este análisis T-student, para ver si hay diferencias en la reducción de la carga microbiana de los vegetales tras desinfectarlos con 80 ppm o 200 ppm de cloro. Además, también se analizó la diferencia entre dos muestras de cebolla desinfectadas con agua con distinto pH.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El aumento de consumo de alimentos procesados y la creciente preocupación del consumidor por la relación alimentación-salud, ha conllevado a que se establezcan o revisen reglamentos que regularicen la cadena de elaboración de este tipo de alimentos. Entre estos reglamentos, podemos destacar el *Reglamento 773/2023*, recientemente emitido, en el cual se establece una concentración máxima de hipoclorito de sodio (80 ppm), con el fin de que el proceso de desinfección de vegetales sea más seguro, minimizando tanto los riesgos de inocuidad como los de toxicidad.

### **4.1 Determinación de la temperatura, pH y contenido de cloro en agua durante las diferentes etapas de desinfección de vegetales**

#### **4.1.1 Etapa de desinfección en el vaso higienizador**

##### 4.1.1.1 Temperatura, pH y tiempo del agua del vaso higienizador

Como se ha mencionado en la introducción, para una correcta eficacia de desinfección del cloro, el agua debe tener una temperatura superior a la del producto a desinfectar, debe estar a un pH de 6,5 – 7,5, y el tiempo de exposición del producto a este compuesto no debe ser excesivo (<10 min). Es por ello, que en primer lugar se procedió a evaluar la temperatura del producto y del agua del vaso higienizador, así como el pH del agua del vaso higienizador y el tiempo de exposición del producto al cloro.

En relación con la temperatura, primero, se procedió a registrar la temperatura del producto. Como se observa en la tabla 3, esta temperatura osciló entre los 7,94°C del puerro y los 8,15°C del pimiento. Esta temperatura era ligeramente superior a la recomendada según la CFIA (Canadian Food Inspection Agency) de Canadá, para la conservación de este tipo de alimentos ( $\leq 4^{\circ}\text{C}$ ) (21). A continuación, se determinó la temperatura del agua del vaso, cuyo rango osciló entre los 15,81°C del puerro y los 16,17°C del pimiento. En cuanto al pH, los valores en el agua del vaso higienizador oscilaron entre 7,6 -7,64 (Tabla 3). Este valor excede ligeramente al rango aceptable de pH (6,5 – 7,5), pero sin tener un impacto significativo.

Finalmente, el tiempo de exposición del vegetal en el agua desinfectante fue de 5,51 minutos. Según la media de tiempo de exposición de las referencias de la tabla 2 que expresan parámetros óptimos para eficacia del cloro, indican que el rango favorable es de 3 -5 minutos de exposición, por lo que, podemos ver que el tiempo de exposición estaría cerca de este rango aceptable (18–20).

#### 4.1.1.2 Determinación del contenido de cloro

En cuanto al contenido de cloro total, su valor medio al inicio de la desinfección fue de 98,44 ppm, mientras que al final del proceso de desinfección fue de 83,96 ppm (Tabla 3). A pesar de que la legislación no hace referencia a este parámetro podemos decir que está cerca de los valores permitidos de cloro libre (80 ppm).

Respecto a la concentración de cloro libre, al inicio de la desinfección su valor medio fue de 74,70 ppm, mientras que al final fue de 62,59 ppm (Tabla 3). Estos valores se encuentran dentro de los valores establecidos de la legislación en el *Reglamento 773/2023*, donde se indica la concentración de cloro libre no puede ser superior a 80 ppm.

**Tabla 3.** Parámetros relativos a la eficacia del cloro en el vaso higienizador

Vegetal	Parámetros						
	Temperatura producto	Temperatura	pH	Cloro total inicial	Cloro total final	Cloro libre inicial	Cloro inicial final
Pimiento	8,15 ±2,65	16,17 ±1,96	7'60 ±0,56	98,22 ±48,99	81,65 ±44,66	71'48 ±29,00	58,05 ±30,95
Puerro	7,94 ±2,58	15,90 ±2,65	7'63 ±0,57	93,87 ±41,72	78,66 ±36,77	73'46 ±28,72	61,49 ±31,91
Col	7,98 ± 2,58	15,94 ±38,52	7,62 ±0,57	91,31 ±38,52	76,68 ±33,57	73,03 ±28,75	61,27 ±31,96
Zanahoria	7,96 ±2,58	15,91 ±2,33	7,62 ±0,57	93,12 ±40,44	78,04 ±35,91	73,68 ±28,70	61,40 ±31,91
Cebolla	8,02 ±2,60	15,81 ±2,29	7,64 ±0,56	98,38 ±46,66	82,57 ±41,64	74,11 ±28,83	61,92 ±31,89

Valores expresados en medias ± desviación estándar

#### 4.1.2 Etapa de aclarado del agua

##### Determinación de temperatura y cloro en agua de red

Con el fin de confirmar que el agua proveniente de la red era apta para el proceso de aclarado de los vegetales y una potencial fuente de contaminación del producto tras su desinfección, se procedió a determinar su temperatura y nivel de cloro total.

La medición reflejó una temperatura media de 14,8°C y un nivel medio de cloro total de 0,76 ppm de cloro. Durante todo el estudio los niveles de cloro total en red se mantuvieron dentro de los parámetros expuestos en el *Real Decreto 3/2023*, referente a la calidad del agua y su control, ya que se mantuvieron dentro del rango aceptable (0,2-1ppm) (13).

#### Determinación de cloro en agua residual

Con relación al control de cloro del agua posterior a la desinfección de distintos vegetales, se han obtenido datos de cloro total con el colorímetro HANNA. Se realizó un cálculo promedio de todos los vegetales, obteniendo valores de 0,10 ppm.

Se observa el cloro total en la tabla 4, estos valores están dentro de los parámetros seguros establecidos por el *Real Decreto 3/2023*, que indica una concentración máxima de 1 ppm de cloro en agua (13).

**Tabla 4.** Cloro residual en el agua de aclarado tras la desinfección de vegetales

Control aclarado	Vegetales				
	Pimiento	Puerro	Col	Zanahoria	Cebolla
Cloro total	0,11 ±0,15	0,10 ±0,15	0,09 ±0,15	0,09 ±0,15	0,10 ±0,15

Valores expresados en medias ± desviación estándar

#### **4.2 Determinación de cloratos**

Para verificar que los residuos de cloro en el alimento están dentro de los parámetros establecidos por el *Reglamento 749/2020*, se evaluó la concentración en el pimiento después del proceso de desinfección. Se eligió este vegetal debido a que se obtuvo un valor más elevado de cloro libre residual. Además, el pimiento es el único vegetal al que se le aplica una doble desinfección con cloro por lo que podría tener un mayor riesgo de retención de este. La concentración de cloratos en el pimiento fue de 0,0069 mg/kg. Este valor se encuentra dentro de los límites establecidos, donde se indica que el contenido de cloratos debe ser inferior al límite de 0,3 mg/kg (26).

### 4.3 Evaluación del contenido microbiológico de los vegetales tras su proceso de desinfección con cloro

Con el fin de evaluar si el proceso de desinfección con cloro es eficaz para mantener los criterios microbiológicos establecidos por el *Reglamento 2073/2005* en productos vegetales, se procedió a determinar la cantidad de enterobacterias totales, coliformes totales, *L. monocytogenes*, *E.coli* y *Salmonella spp.* Para este análisis se seleccionaron muestras de pimiento, cebolla y puerro. Se seleccionaron estos vegetales por la presencia de varios problemas que afectan a su calidad, como pueden ser la podredumbre, pérdida de color y firmeza, así como por ser sensibles a la contaminación microbiana. La cebolla y el puerro llegan directamente del huerto a las instalaciones sin sufrir una manipulación previa, por lo que al estar en contacto directo con la tierra son fácilmente contaminables. Por otro lado, el pimiento tampoco sufrió manipulación previa y se seleccionó debido a que no tiene ninguna capa protectora para protegerse de los microorganismos, por lo que se le realiza una doble desinfección (27).

**Tabla 5.** Parámetros específicos de las muestras seleccionadas para el análisis microbiológico

Parámetros	Pimiento	Cebolla	Puerro
<b>PRE-DESINFECCION</b>			
Temperatura producto (°C)	9,80	5,30	6,80
Tiempo exposición (min)	10	-	-
Temperatura agua (°C)	18,31	-	-
pH agua	8,74	-	-
Cloro total (ppm)	80	-	-
<b>DESINFECCIÓN</b>			
Cloro total inicial (ppm)	80	80	80
Cloro total final (ppm)	50	80	80
Cloro libre inicial (ppm)	80	80	80
Cloro libre final (ppm)	50	80	80
Temperatura agua (°C)	11,80	9,50	11,20
pH agua	7,96	8,74	8,70
Tiempo exposición (min)	5	5	5
<b>ACLARADO</b>			
Cloro agua red (ppm)	0,53	0,86	0,61
Temperatura agua red (°C)	18,30	14,20	14,50
Cloro residual total (ppm)	0	0	0
Cloro residual HANNA (ppm)	0,10	0,00	0,12

Indicar que para tener un control más específico se expone la diferenciación en los parámetros que afectan a la eficacia del cloro durante la recogida de las muestras de vegetales para el análisis microbiológico, en la tabla 5. Se observa que todos estos parámetros que afectan a la funcionalidad del cloro entran dentro de los parámetros establecidos en la tabla1, excepto el pH, que en el caso de la cebolla y el puerro se ve elevado en comparación con los rangos previamente establecidos de 6,5 – 7,5. Esto puede ser debido a que se recogió la muestra justo después de llenar el vaso higienizador por primera vez, por lo que los niveles de pH son más elevados en ese momento. En el caso del cloro libre inicial, en los tres casos se encuentra dentro de los parámetros establecidos en el *Reglamento 773/2023*.

Una vez confirmado que los vegetales seleccionados tuvieron un correcto proceso de desinfección, se procedió a realizar el análisis microbiológico, cuyos resultados se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6.** A microbiológico de los vegetales seleccionados

Vegetal	Enterobacterias		<i>E. coli</i>		<i>Salmonella</i>		<i>Listeria</i>		Coliformes totales	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
Pimiento	$2,0 \cdot 10^7 \pm 2,2 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^7 \pm 2,8 \cdot 10^7$	<10	<10	N, D	N, D	N, D	N, D	$9,9 \cdot 10^2 \pm 5,8 \cdot 10^2$	$8,7 \cdot 10^3 \pm 7,9 \cdot 10^3$
Puerro	$7,5 \cdot 10^4 \pm 3,6 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^4 \pm 1,1 \cdot 10^5$	<10	<10	N, D	N, D	N, D	N, D	$1,1 \cdot 10^5 \pm 6,9 \cdot 10^5$	$8,6 \cdot 10^4 \pm 1,7 \cdot 10^5$
Cebolla	$8,3 \cdot 10^6 \pm 1 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^6 \pm 1,7 \cdot 10^6$	<10	<10	N, D	N, D	N, D	N, D	$1,4 \cdot 10^7 \pm 8,6 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^6 \pm 7,8 \cdot 10^5$

A: antes de la desinfección, D: después de la desinfección, ND: no detectado, Valores expresados en medias  $\pm$  desviación estándar

En relación a *E.coli*, *L. monocytogenes* y *Salmonella*, se observa que todos los valores obtenidos están dentro de los estándares descritos en el *Reglamento 2073/2005*. En el que se establece un límite de detección de *E. coli* inferior a 10 UFC/g y para *L. monocytogenes* y *Salmonella* debe haber ausencia. En cuanto a las enterobacterias, a pesar de que no están reguladas en la legislación, se ve una reducción de 11,3%, 81,7% y un 76,5% en el pimiento, cebolla y puerro, respectivamente, después de su desinfección. Se puede observar la eficacia de los 80 ppm de cloro en la reducción de enterobacterias en el caso de la cebolla y el puerro. En cambio, para el pimiento a pesar de producirse una reducción, esta ha sido menor. Esta diferencia podría atribuirse a que el pimiento tiene una capa más resistente, ya que esta recubierta de ceras vegetales, lo que

podría dificultar la acción del cloro. Por otro lado, se observó una reducción en los recuentos de coliformes totales para la cebolla, y puerro con un 74,7% y 21% respectivamente. En contraste, el recuento de coliformes totales en el pimiento después de la desinfección fueron mayores que antes de la desinfección. Esto podría ser debido a que la selección de la muestra sin desinfectar es homogénea, ya que se utilizaron pocas piezas de vegetal, mientras que, para la muestra desinfectada, era más heterogeneidad debido a que durante el lavado y centrifugación se mezclaron varias piezas de vegetal. Tras observar los resultados, podemos afirmar que la efectividad del proceso depende del tipo de vegetal.

Como se ha comentado anteriormente el hipoclorito sódico puede reducir entre 1-2 log la población inicial de microorganismos en la superficie del producto, con una concentración aproximada de 80 ppm (15). En nuestro caso, para enterobacterias se reduce 0,96, 0,64 y 0,74 log en pimiento, puerro y cebolla, respectivamente. La reducción logarítmica en las coliformes totales, fueron 0,10 y 0,58 log, en puerro y cebolla. Podemos afirmar que, se ha reducido la carga microbiana pero no ha sido tan eficaz como se expone en otros estudios (1,15), ya que no llega a reducir 1 log en ninguno de los casos.

El hipoclorito sódico es el desinfectante más utilizado en la industria alimentaria por su accesibilidad y eficacia, sin embargo, un estudio, comparó el uso de otro tipo de coadyuvante tecnológico, como es el desinfectante de ozono acuoso usando 5 ppm, con el hipoclorito de sodio usando 100 ppm, dando mejores resultados en la reducción de microorganismos y en el mantenimiento de las características organolépticas de los alimentos el ozono acuoso (28). No obstante, y a pesar de estos hallazgos, la legislación actualmente solo permite el uso de hipoclorito de sodio y no especifica el pH de la solución.

#### **4.3.1 Comparación de la concentración de enterobacterias en muestras de vegetales desinfectadas con diferentes concentraciones de cloro**

Anterior a la implementación del *Reglamento 773/2023*, no existía una concentración máxima de cloro en el agua de desinfección de vegetales. Es por ello, que se utilizaba una cantidad de entre 100 – 200 ppm de cloro, en lugar de los 80 ppm actuales. Para evaluar si ambas concentraciones son igualmente

eficaces, en la reducción de carga microbiana en productos de IV y V gama, se compararon resultados de recuento microbiológico de la campaña actual, con los de periodos anteriores. En concreto, el recuento de enterobacterias totales durante las campañas de 2017 a 2023, en muestras de pimiento, cebolla y puerro. En estas campañas se utilizaba una concentración de cloro de aproximadamente 200 ppm de cloro libre y un tiempo de exposición de 10 minutos. En cuanto al pH, no era registrado, pero en base a los resultados obtenidos en el presente estudio, probablemente fuera un pH más alcalino. Queda representados los resultados de enterobacterias y su reducción en la tabla 8.

**Tabla 8.** Recuento de enterobacterias a lo largo de diferentes campañas.

Enterobacterias	Campañas						
	2017	2018	2019	2021	2023	Media 2017-2023	2024
Nº UFC/g antes	$2,0 \cdot 10^5 \pm 2,8 \cdot 10^5$	$4,9 \cdot 10^4$	$4,9 \cdot 10^4$	$3,9 \cdot 10^4 \pm 1,6 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^5 \pm 3,5 \cdot 10^4$	$4,7 \cdot 10^5 \pm 8,9 \cdot 10^5$	$9,7 \cdot 10^6 \pm 1,6 \cdot 10^7$
Nº UFC/g después	$6,5 \cdot 10^5 \pm 1,7 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^3$	$4,9 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^4 \pm 3,8 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^5 \pm 6,6 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^5 \pm 2,7 \cdot 10^5$	$6,6 \cdot 10^6 \pm 1,7 \cdot 10^7$
Reducción UFC/g	$1,4 \cdot 10^6$	$4,6 \cdot 10^4$	0,0	$2,8 \cdot 10^4$	$4,1 \cdot 10^4$	$7,7 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^6$

Valores expresados en medias  $\pm$  desviación estándar

Los resultados expuestos en la tabla 8 reflejan una alta variabilidad intercampaña en cuanto al contenido de enterobacterias totales, siendo los datos en la campaña actual más similares a los de la campaña del 2017. Por otro lado, es importante destacar que los porcentajes de reducción de enterobacterias en 2024 ha sido superior con un 64%, respecto a un 34% en el promedio de las campañas de 2017-2023. Mediante el análisis estadístico, comparando el promedio de campañas anteriores con la actual, no se presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Se puede afirmar con los datos obtenidos, que con una concentración menor se consigue un efecto positivo similar y con menor riesgo a la formación de subproductos tóxicos para la salud.

#### 4.3.2 Comparación de muestras de cebolla con distintos pH controlado con ácido acético

Como se ha mencionado previamente, el pH afecta a la eficacia del cloro. Las determinaciones de pH realizadas a lo largo de todo el proceso de desinfección

han mostrado que estaba elevado con respecto al pH al que es más efectivo el cloro, 6,5 - 7,5 (15,21). Por ello, en el presente estudio se evaluó si la realización de un control del pH, con el fin de que en todo momento éste se encontrara en la franja en la que hipoclorito es más efectivo tenía un efecto sobre su capacidad antimicrobiana. Para ello, se seleccionaron dos muestras de cebolla, siendo una de ellas sometidas a un control de pH (muestra 2). Con el fin de tener una mayor trazabilidad del proceso de desinfección de las dos muestras de cebolla, se recogen las diferentes condiciones que se presentaron durante la recogida en la tabla 9.

**Tabla 9.** Condiciones específicas durante la recogida de las muestras de cebolla

Parámetros	Cebolla M1	Cebolla M2
<b>DESINFECCIÓN</b>		
Cloro total inicial (ppm)	80	100
Cloro total final (ppm)	80	100
Cloro libre inicial (ppm)	80	80
Cloro libre final (ppm)	80	80
Temperatura del producto (°C)	5,30	6,30
Temperatura agua (°C)	9,50	6,30
pH agua	<b>8,74</b>	<b>6,79</b>
Tiempo exposición (min)	5	5
<b>ACLARADO</b>		
Cloro agua red (ppm)	0,86	0,55
Temperatura agua red (°C)	14,20	15,20
Cloro residual total (ppm)	0,00	0,00
Cloro residual HANNA (ppm)	0,00	0,00

M1: no control pH, M2: control Ph

Para ajustar el pH se utilizó ácido acético proveniente de vinagre blanco comercial con pH de 3,03. En concreto, y tras la determinación mediante la fórmula para neutralizar ácido-base, se usó 0,3 mL de vinagre por cada litro de agua. El motivo por el que se usó este tipo de ácido es porque en estudios previos no se han observado efectos indeseables como si se han observado al usar ácidos como el ácido cítrico que redujo la efectividad del cloro y tuvo un efecto negativo en la suspensión bacteriana. Por otro lado, es importante que la reducción de pH no sea muy brusca y alcance pH ácido como 4 - 5 ya que

puede tener efectos negativos debido a que el ácido hipocloroso (HOCl) puede descomponerse en cloro gaseoso (Cl<sub>2</sub>), provocando así una disminución de la eficacia de desinfección debido a la evaporación, debido al equilibrio ácido-base (20,29). Por ello, en el presente estudio el pH de la muestra se ajustó entorno el intervalo pH 6,5 – 7,5, ya que se ha descrito que este es el intervalo en el que el cloro tiene un mayor efecto antimicrobiano (15,21).

Los resultados obtenidos mostraron que el porcentaje de reducción de enterobacterias y coliformes totales en la muestra 1 (no control pH) fue de 81,7% y 74,7%, respectivamente, mientras que el caso de la muestra 2 (control pH) fue de 35,7 % y 83,8%, respectivamente (Tabla 10). Los resultados obtenidos sugieren que a un pH más alcalino el cloro tiene más efecto antimicrobiano frente a enterobacterias, mientras que a un pH más neutro-ácido es más antimicrobiano frente a coliformes.

Sin embargo, estudios han comparado la eficacia de hipoclorito de sodio (pH 6,5 – 7,5) con el clorito de sodio acidificado (pH 2,5 – 2,9) en la reducción de microorganismos patógenos. Se observó que, a diferencia de los resultados obtenidos en el presente estudio, el clorito de sodio acidificado tuvo resultados más efectivos que el hipoclorito de sodio, tanto en la reducción de carga microbiana general como en la reducción más concreta de *E. coli* (30–32).

**Tabla 10.** Recuento microbiológico en muestras de cebolla desinfectadas a diferentes pH reducción de bacterias en muestras de cebolla con distinto Ph

Cebolla	Enterobacterias		<i>E. coli</i>		<i>Salmonella</i>		<i>Listeria</i>		Coliformes totales	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
Muestra 1	8,3·10 <sup>6</sup> ± 1,0· 10 <sup>7</sup>	1,5· 10 <sup>6</sup> ± 1,7· 10 <sup>6</sup>	<10	<10	N, D	N, D	N, D	N, D	1,4·10 <sup>7</sup> ± 8,6·10 <sup>5</sup>	3,6·10 <sup>6</sup> ±7,8·10 <sup>5</sup>
Muestra 2	8,2· 10 <sup>5</sup> ± 1,5·10 <sup>5</sup>	5,2· 10 <sup>5</sup> ± 3,2· 10 <sup>5</sup>	<10	<10	N, D	N, D	N, D	N, D	7,0·10 <sup>4</sup> ± 1,5·10 <sup>6</sup>	1,1·10 <sup>4</sup> ±3,2·10 <sup>3</sup>

A: antes de la desinfección, D: después de la desinfección, ND: no detectado, Valores expresados en medias ± desviación estándar

Tras realizar el análisis estadístico de las dos muestras de cebolla desinfectados con distinto pH, se ha visto que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre ellas, tanto en el recuento de enterobacterias como en coliformes. por lo que ambas soluciones con pH distintos tienen similar efecto antimicrobiano frente a microorganismos patógenos.

## 5. CONCLUSIÓN

La preocupación por la seguridad alimentaria ha crecido en los últimos años y ha provocado una reducción en la cantidad de cloro durante la desinfección de vegetales de V y IV gama. En el presente estudio se ha verificado que el uso de hipoclorito sódico a una concentración de 80 ppm durante la desinfección de productos de IV gama reducía su carga microbiana, siendo esta reducción comparable a la obtenida en campañas previas con 200 ppm. El análisis de los parámetros de T<sup>a</sup>, pH, tiempo y concentración de cloro en las diferentes etapas de desinfección han sido efectivas en todas ellas, con excepción del pH, que ha sido ligeramente superior en algunos casos, aun así, el pH no tiene efecto sobre la capacidad antimicrobiana del hipoclorito sódico a 80 ppm durante la desinfección de vegetales, por lo que no afectaría a la eficacia del cloro.

El conjunto de todos los resultados obtenidos avala que la limitación de la concentración de hipoclorito sódico a 80 ppm descrita en el *Reglamento 773/2023*, es una estrategia óptima durante las labores de desinfección de productos de IV gama.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Davidovich G, Wong E, De la Asunción R, Bustamante M. Effect of peeling, cutting, or shredding of lettuce, carrot, or potato on the efficacy of chlorine disinfection. *Food Sci Technol Int*; 2023.
2. Albó JA. Farré R. Garriga M. Mariné A. Rodríguez JJ. Castell V y Vidal MC. Medidas que deben tenerse en cuenta para el lavado de frutas y hortalizas que se consumen crudas. El uso del hipoclorito de sodio. ACSA Gencat; 2018.
3. Pretel MT. Bases teóricas para la asignatura: Innovaciones en alimentos vegetales de IV y V gama. Universidad Miguel Hernández. 1 ed. España; 2023, 1–106p.
4. Informe del consumo alimentario en España 2022. MAPA. 2022.
5. Enciso Y, Barrios E, Valencia D, Alaya J. Microorganismos patógenos y benéficos en los alimentos de origen vegetal. Universidad de Sonora. 2002 Nov; (25) 411–26.
6. Fang Y. Wakisaka M. A Review on the Modified Atmosphere Preservation of Fruits and Vegetables with Cutting-Edge Technologies. *Agriculture*. 2021;11(10):992.
7. Center for Food Safety, Applied Nutrition. Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Fresh-cut Fruits and Vegetables. FDA; 2008.
8. Silvia J, Ramírez L, Alfieri A, Rivas G, Sánchez M. Determinación de microorganismos indicadores de calidad sanitaria. Coliformes totales, coliformes fecales y aerobios mesófilos en agua potable envasada y distribuida en San Diego, estado Carabobo, Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2004 Jan;24(1–2).
9. Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos

- alimenticios. (Boletín Oficial del Estado, número 338, de 22 de diciembre de 2005).
10. Scott VN. Interaction of Factors to Control Microbial Spoilage of Refrigerated Foods. *J Food Prot.* 1989;52(6):431–5.
  11. Zhang S, Wang Y, Lu J, Yu Z, Song H, Bond PL, et al. Chlorine disinfection facilitates natural transformation through ROS-mediated oxidative stress. *ISME J.* 2021 Oct 1;15(10):2969–85.
  12. Reglamento (CE) nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos. (Boletín Oficial del Estado, número 139, de 30 de abril de 2004).
  13. Real Decreto 3/2023, de 10 de enero, por el que se establece los criterios técnico-sanitarios de la calidad del agua de consumo, su control y suministro. (Boletín Oficial del Estado, número 9, de 11 de enero de 2023).
  14. Real Decreto 773/2023, de 3 de octubre, por lo que se regulan los coadyuvantes tecnológicos utilizados en los procesos de elaboración y obtención de alimentos. (Boletín Oficial del Estado, número 237 de 04 de octubre de 2023).
  15. Jennylynd B. James and Tipvanna Ngarmrak. Processing of fresh-cut tropical fruits and vegetables: A technical guide. FAO. Rosa S. Rolle, editor. Bangkok; 2011. 31–33 p.
  16. López F, Gil MI. La importancia del agua en la industria de alimentos vegetales. *Arbor.* 2020;196(795):547.
  17. Garmedina G. Vero S. Métodos para la desinfección de frutas y hortalizas. *Distribución y alimentación.* 2006 ;18–27.
  18. Zuniga I. Importancia de la cloración del agua: sitios de abastecimiento con presencia de bacterias patógenas. *ENF INF MICROBIOL.* 2019;39(3):86–92.

19. Gil MI, Selma M V., López-Gálvez F, Allende A. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. *Int J Food Microbiol.* 2009 Aug 31;134(1–2):37–45.
20. Sanz S, Gimenez M, Olarte C, Lomas C, Portu J. Effectiveness of chlorine washing disinfection and effects on the appearance of artichoke and borage. *J Appl Microbiol.* 2002 Dec;93(6):986–93.
21. Code of Practice of Minimally Processed Ready-to-Eat Vegetables. CFIA; 2009.
22. Masson P, Alves AC, Ebbels TMD, Nicholson JK, Want EJ. Optimization and Evaluation of Metabolite Extraction Protocols for Untargeted Metabolic Profiling of Liver Samples by UPLC-MS. *Anal Chem.* 2010 Sep 15;82(18):7779–86.
23. March SB, Ratnam S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol.* 1986 May;23(5):869–72.
24. Perry JD, Ford M, Taylor J, Jones AL, Freeman R, Gould FK. ABC Medium, a New Chromogenic Agar for Selective Isolation of *Salmonella* spp. *J Clin Microbiol.* 1999 Mar;37(3):766–8.
25. Sewell A. The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of *Listeria* spp. from foods. *Int J Food Microbiol.* 2003 Mar 15;81(2):123–9.
26. Reglamento (UE) 2020/749 de la Comisión de 4 de junio de 2020 que modifica el anexo III del Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de clorato en determinados productos. (Diario Oficial de la Unión Europea, número 178, de 8 de junio de 2020).
27. Rokayya S, Khojah E. Physical-mechanical Estimation of Pepper (*Capsicum annum* L.) Fruit Varieties. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition).* 2016 Sep;23(3):61–9.

28. Aslam R, Alam MS, Kaur P. Comparative Study on Efficacy of Sanitizing Potential of Aqueous Ozone and Chlorine on Keeping Quality and Shelf-life of Minimally Processed Onion ( *Allium Cepa* L.). *Ozone Sci Eng*. 2022 Mar 4;44(2):196–207.
29. Greenbaum J, Nirmalan M. Acid–base balance: The traditional approach. *Curr Anaesth Crit Care*. 2005 Jun;16(3):137–42.
30. Tomás-Callejas A, López-Velasco G, Artés F, Artés-Hernández F. Acidified sodium chlorite optimisation assessment to improve quality of fresh-cut tatsoi baby leaves. *J Sci Food Agric*. 2012 Mar 15;92(4):877–85.
31. Elano RR, Kitagawa T, Bari MdL, Kawasaki S, Kawamoto S, Inatsu Y. Comparison of the Effectiveness of Acidified Sodium Chlorite and Sodium Hypochlorite in Reducing *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis*. 2010 Dec;7(12):1481–9.
32. Sun SH, Kim SJ, Kwak SJ, Yoon KS. Efficacy of Sodium Hypochlorite and Acidified Sodium Chlorite in Preventing Browning and Microbial Growth on Fresh-Cut Produce. *Prev Nutr Food Sci*. 2012 Sep 30;17(3):210–6.