



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

“INACTIVACIÓN DE *Salmonella enterica* Y *Listeria monocytogenes* EN PIÑA (*Ananas comosus* L.) MÍNIMAMENTE PROCESADA MEDIANTE LA APLICACIÓN DE DESINFECTANTES QUÍMICOS Y CALENTAMIENTO ÓHMICO”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

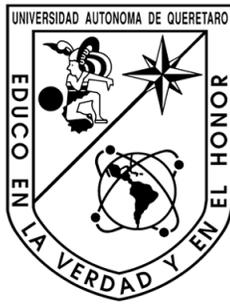
PRESENTA

IQA. Camila Estefanía Navarro García

DIRIGIDO POR

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Querétaro, Qro. Diciembre 2019



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Inactivación de *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes* en piña (*Ananas comosus* L.) mínimamente procesada mediante la aplicación de desinfectantes químicos y calentamiento óhmico”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:
Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta:

IQA. Camila Estefanía Navarro García

Dirigida por:

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Presidente

Dra. Marcela Gaytán Martínez

Secretario

Dr. Eduardo Morales Sánchez

Vocal

Dr. Ramón Álvar Martínez Peniche

Suplente

Dr. Jesús Alejandro Aldrete Tapia

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro

Diciembre, 2019

México

RESUMEN

El aumento en el consumo de frutas mínimamente procesadas como la piña y su implicación en brotes de enfermedad evidencian la necesidad de diseñar tratamientos de desinfección efectivos. Se evaluó el efecto de desinfectantes químicos y calentamiento óhmico sobre la inactivación de *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes* en piña mínimamente procesada y sobre atributos de calidad del producto durante su almacenamiento. Se investigó la presencia de *Salmonella*, *L. monocytogenes* y microorganismos indicadores de calidad sanitaria (bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales y fecales, *Escherichia coli*, hongos y levaduras) en muestras colectadas en supermercados, mercados y vendedores ambulantes de la ciudad de Querétaro; de igual manera se midieron variables físicas y químicas (pH, acidez total titulable, sólidos solubles totales, actividad de agua, color y textura). Posteriormente se evaluó el efecto de tratamientos de desinfección química (hipoclorito de sodio, ácido peracético, agua electrolizada neutra y extracto de cítricos) y calentamiento óhmico sobre la reducción de los microorganismos subrogados de *Salmonella* (*E. faecium*) y *L. monocytogenes* (*L. innocua*). Las muestras obtenidas de puestos ambulantes mostraron los conteos más altos de BMA (5.82 Log UFC g⁻¹), hongos (3.95 Log UFC g⁻¹), levaduras (5.85 Log UFC g⁻¹) y *E. coli* (3.25 NMP g⁻¹) contrastando con las muestras de los supermercados. *Salmonella* spp. estuvo presente en mercados y puestos ambulantes con incidencia fue 8.8 y 18% respectivamente y no se detectó en los supermercados y *L. monocytogenes* lo estuvo en los tres sitios de muestreo (supermercados 33.3 %, mercados 8.8 % y puestos ambulantes 2 %). Los comportamientos de *E. faecium* y *L. innocua* fueron similares a los de *S. enterica* y *L. monocytogenes*, respectivamente ($p \leq 0.05$). Ninguno de los desinfectantes químicos redujo más de 3 Log UFC g⁻¹ de los subrogados en la piña. En contraste, con el calentamiento óhmico a 20 V cm⁻¹, 65 °C y 1 min redujo 4.5 Log UFC g⁻¹, sin afectar las características físicas y químicas del fruto. La vida de anaquel de la piña tratada con calentamiento óhmico almacenada a 4 y 10 °C fue (15 y 9 días, respectivamente) fue superior al de las muestras no tratadas. Se concluye que el calentamiento óhmico es una opción viable para la desinfección de piña mínimamente procesada.

Palabras clave: piña, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, calentamiento óhmico, descontaminación, subrogado.

SUMMARY

The increase in the consumption of minimally processed fruits such as pineapple and its involvement in disease outbreaks show the need to design effective disinfection treatments. The effect of chemical disinfectants and ohmic heating on the inactivation of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in minimally processed pineapple and on product quality attributes during storage was evaluated. The presence of *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* and sanitary quality indicator microorganisms (aerobic mesophilic bacteria, total and fecal coliforms, *Escherichia coli*, fungi and yeasts) in samples collected in markets, supermarkets and street stalls in the city of Querétaro was investigated; Similarly, physical and chemical variables (pH, total titratable acidity, total soluble solids, water activity, color and texture) were measured. Subsequently, the effect of chemical disinfection treatments (sodium hypochlorite, peracetic acid, neutral electrolyzed water and citrus extract) and ohmic heating on the reduction of subrogated microorganisms of *Salmonella enterica* (*E. faecium*) and *L. monocytogenes* (*L. innocua*) were tested. Samples obtained from street stalls showed the highest counts of BMA (5.82 Log UFC g⁻¹), molds (3.95 Log UFC g⁻¹), yeasts (5.85 Log UFC g⁻¹) and *E. coli* (3.25 NMP g⁻¹) contrasting with supermarket samples. *Salmonella* spp. was present in markets and street stalls with an incidence of 8.8 and 18% respectively and was not detected in supermarkets and *L. monocytogenes* was found in the three sampling sites (supermarkets 33.3%, markets 8.8% and street stalls 2%). The behaviors of *E. faecium* and *L. innocua* were similar to those of *S. enterica* and *L. monocytogenes*, respectively ($p \leq 0.05$). None of the chemical disinfectants reduced more than 3 Log UFC g⁻¹ of the surrogates in pineapple. In contrast, with ohmic heating at 20 V cm⁻¹, 65 °C and 1 min reduced 4.5 Log UFC g⁻¹, without affecting the physical and chemical characteristics of the fruit. The shelflife of the pineapple treated with ohmic heating stored at 4 and 10 °C was (15 and 9 days, respectively) was superior to that of the untreated samples. In conclusion, that ohmic heating is a viable option for minimally processed pineapple disinfection.

Keywords: pineapple, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, ohmic heating, decontamination, surrogate.

DEDICATORIA

A mi esposo y a mi hermosa familia

“La fortuna favorece a los valientes”

Virgilio

Dirección General de Bibliotecas UNQ

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su inmenso apoyo e infinito amor que me han dado toda la vida, por enseñarme a siempre luchar por mis sueños y porque siempre tenían las palabras correctas para darme ánimos. Me siento muy afortunada y orgullosa de ser su hija.

A mis hermanos, Gerardo, Francisco y Carlos, por ser mis modelos a seguir, por ser mi inspiración todos los días y por sus palabras de aliento todos los días. A mis pequeños sobrinos, Camis y Gerardito, por ser mis angelitos hermosos. A mi cuñada Claudia por ser mi hermana y confidente.

A la Dra Montse por su infinita paciencia conmigo, por haberme dado la oportunidad de ingresar al laboratorio como chica de servicio social hace algunos años y especialmente por la confianza depositada en mí. Estoy muy agradecida por las experiencias, conocimientos y amistades que obtuve de LECRIMA.

A mis compañeros de maestría Cris, Gaby y Abril, los 100% UAQ. Definitivamente sin nuestra hermosa amistad y compañerismo mi paso por la maestría hubiera sido muy diferente, seguramente con menos risas. La ayuda que de Cristian todas las veces fue invaluable, fuera y dentro del laboratorio, él siempre fue mi mayor apoyo. Te quiero

A los miembros de mi comité, el Dr. Morales, la Dra. Marcela, el Dr. Peniche y el Dr. Alejandro, por sus valiosas aportaciones y comentarios a este trabajo.

A Andrés por siempre llegar a alegrarme cuando más lo necesitaba.

A Mayra, Mari y Susy, por sus hermosas amistades que fueron un alivio en muchos momentos de estrés. Las adoro chicas.

A mis amistades de LECRIMA: Angelica, Lalo, Juan Carlos, Marla, Yuri, Betty, Beto, Daniel y especialmente a nuestro ángel de la guardia en el laboratorio la Sra. Marta quien con una taza de café nos cuidaba.

Al CONACYT por el apoyo económico para poder llevar acabo esta investigación, al CICATA-IPN por la oportunidad de la estancia realizada en sus instalaciones y la UAQ mi alma mater.

A mi esposo, César, por ser mi motivación, mi refugio y mi hogar durante este año. Una de las mayores satisfacciones dentro de estos dos años de maestria fue nuestro matrimonio. Gracias por acompañarme a muestreos, al laboratorio en domingos, a tus ideas y consejos técnicos, por apoyarme en mi etapa de estudiante y ahora de trabajo, por ser paciente conmigo cuando el estrés llegaba. Pero sobre todo gracias por ser el amor de mi vida. Te amo

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
SUMMARY.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
II.1 Tendencias de consumo de alimentos.....	3
II.1.1 Productos de conveniencia.....	3
II.1.2 Frutas mínimamente procesadas.....	4
II.1.2.1 Procesamiento de frutas mínimamente procesadas.....	4
II.2 La piña.....	5
II.2.1 Botánica.....	5
II.2.2 Producción y consumo.....	6
II.2.3 Composición.....	7
II.3 Fuentes de contaminación de frutas.....	8
II.3.1 Contaminación en poscosecha.....	9
II.4 Microorganismos patógenos asociados a frutas.....	9
II.4.1 <i>Salmonella</i> spp.....	11
II.4.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	13
II.4.3 La piña como vehículo de microorganismos patógenos en humanos.....	14
II.4.4 Sobrevivencia de microorganismos patógenos humanos en piña.....	15
II.5 Métodos de descontaminación aplicados a frutas mínimamente procesadas.....	15
II.5.1 Métodos químicos.....	15
II.5.2 Tecnologías emergentes.....	18
II.5.2.1 Generalidades.....	18
II.5.2.2 Calentamiento óhmico.....	18
II.6 Microorganismos subrogados.....	21
III. JUSTIFICACIÓN.....	22

IV. HIPOTESIS	23
V. OBJETIVO.....	23
V.1 Objetivo general	23
V.2 Objetivos específicos	23
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	24
VI.1 Materiales.....	24
VI.1.1 Reactivos y soluciones.....	24
VI.1.2 Medios de cultivo.....	25
VI.1.3 Equipo	26
VI.1.4 Material biológico	27
VI.1.4.1 Cepas.....	27
VI.1.4.2 Piña	28
VI.2 Metodología	28
VI.2.1 Muestreos	28
VI.2.2. Determinación de variables físicos y químicos de la piña	29
VI.2.2.1. pH.....	29
VI.2.2.2 Acidez total titulable	29
VI.2.2.3 Sólidos solubles totales.....	30
VI.2.2.4 Actividad de agua.....	30
VI.2.2.6 Color.....	30
VI.2.2.7 Análisis de perfil de textura	31
VI.2.3 Análisis microbiológicos y detección de patógenos en diferentes establecimientos.....	32
VI.2.3.1 Preparación de las muestras.....	32
VI.2.3.2 Cuantificación de microorganismos indicadores	32
VI.2.4 Evaluación de comportamiento de patógenos vs subrogados.	35
VI.2.4.1 Preparación de la piña	35
VI.2.4.2 Cepas.....	35
VI.2.4.3 Preparación del inóculo.....	36
VI.2.4.4 Comportamiento de los microorganismos patógenos y sus subrogados en caldo de cultivo y rebanadas de piña.....	36
VI.2.5 Evaluación de tratamientos con desinfección en rebanadas de piña	37

VI.2.5.1 Desinfección química	37
VI.2.5.2 Calentamiento óhmico.....	38
VI.2.5.3 Recuento de células sobrevivientes	40
VI.2.6 Vida de anaquel de la piña tratada con calentamiento óhmico	41
VI.2.7 Análisis estadísticos	41
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
VII.1 Microorganismos indicadores en piña mínimamente procesada.....	42
VII.2 Incidencia de microorganismos patógenos	48
VII.3 Comportamiento de patógenos vs subrogados.....	50
VII.3.1 Comportamiento en medio de cultivo	50
VII.3.2 Comportamiento en la piña	53
VII.4 Tratamiento de desinfección química.....	57
VII.4.1 Efecto de los desinfectantes sobre las variables físicas y químicas de la piña.....	61
VII.5 Tratamiento óhmico.....	62
VII.5.1 Tratamiento convencional	62
VII.5.2 Calentamiento óhmico.....	66
VII.5.2.1 Cambios en las variables físicas y químicas por la aplicación del calentamiento óhmico.....	67
VII.5.2.2 Efecto antimicrobiano del calentamiento óhmico en piña mínimamente procesada.....	73
VII.6 Vida de anaquel	78
VII. CONCLUSIONES.....	84
IX. REFERENCIAS	85
X. ANEXOS.....	96
X.1 Valoración de la concentración de los desinfectantes.....	96
X.2 PCR <i>Salmonella</i> spp.	97
X.3 PCR <i>Listeria monocytogenes</i>	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figur a		Págin a
1.	Diagrama de flujo de la preparación de frutas mínimamente procesadas.....	4
2.	Partes de la planta de piña.....	5
3.	Fuentes de contaminación microbiana a frutas.....	8
4.	Infección de <i>Salmonella</i> en células epiteliales del intestino. ..	12
5.	Órganos afectados durante la listeriosis.....	14
6.	Diagrama de electroporación por la aplicación de alto voltaje.	20
7.	Clasificación de la piña de acuerdo con el color interno.....	29
8.	Clasificación de la piña de acuerdo con el color externo.....	35
9.	Equipo y celda de calentamiento óhmico empleado.....	38
10.	Sistema empleado para la piña mínimamente procesada.....	40
11.	Contenido de BMA en piña mínimamente procesada en función del tipo de establecimiento de expedición.....	43
	...	
12.	Contenido de hongos y levaduras en piña mínimamente procesada en función del tipo de establecimiento de expedición.	45
13.	Contenido de coliformes fecales en piña mínimamente procesada en función del tipo de establecimiento de expedición.	46
14.	Comportamiento de <i>S. enterica</i> y <i>E. faecium</i> en caldo soya tripticaseína.....	51
15.	Desarrollo de <i>S. enterica</i> y <i>E. faecium</i> en piña mínimamente procesada almacenada a 35°C.....	53
16.	Desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> y <i>L. innocua</i> en piña minimamente procesada almacenada a 35°C.....	55

17.	Reducción de <i>S. enterica</i> y <i>E. faecium</i> en piña mínimamente procesada sometida a tratamientos de desinfección química.	57
18.	Reducción de <i>L. monocytogenes</i> y <i>L. innocua</i> en piña mínimamente procesada sometida a tratamientos de desinfección química.....	58
19.	Curvas de temperatura para tratamiento de calentamiento convencional aplicado a rebanadas de piña mínimamente procesada.....	62
	...	
20.	Reducción de los microorganismos subrogados por la aplicación del tratamiento de calentamiento convencional (70°C) en piña mínimamente procesada.....	64
21.	Curvas de calentamiento óhmico en piña mínimamente procesada.....	66
	...	
22.	Reducción de <i>Enterococcus faecium</i> y <i>Listeria innocua</i> por la aplicación de calentamiento óhmico en piña mínimamente procesada.....	73
	...	
23.	Reducción de hongos y levaduras por la aplicación de calentamiento óhmico en piña mínimamente procesada.....	74
24.	Efecto del calentamiento óhmico sobre la textura de la piña mínimamente procesada almacenada a 4 y 10 °C.....	77
25.	Efecto del calentamiento óhmico sobre el contenido de sólidos solubles de la piña mínimamente procesada almacenada a 4 y 10°C.....	78
	

26.	Efecto del calentamiento óhmico sobre la diferencia total de color (ΔE) de la piña mínimamente procesada almacenada a 4 y 10°C.....	79
....		
27.	PCR de las cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de la piña.....	96
28.	PCR de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> aisladas de la piña.....	96

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE TABLAS

Tabl	Págin
a	a
1. Clasificación de los productos de conveniencia.....	3
2. Composición de la piña.....	7
3. Brotes de enfermedad asociados al consumo de frutas frescas y mínimamente procesadas en Estados Unidos.....	10
4. Efectividad de desinfectantes químicos en frutas mínimamente procesadas.	17
5. Aplicación del calentamiento óhmico a diversos alimentos para reducir el contenido de microorganismos.....	21
6. Umbrales de Tolerancia de ΔE según la ISO 12647-2.....	31
7. Microorganismos indicadores en piña mínimamente procesada colectada en diferentes puntos de muestreo.....	42
8. Contenido de <i>E.coli</i> en piña mínimamente procesada en diferentes puntos de muestro.....	47
9. Incidencia de <i>Salmonella</i> spp y <i>Listeria monocytogenes</i> en piña mínimamente procesada en diferentes puntos de muestreo.....	48
10. Efecto de la desinfección química en los parámetros físicos y químicos de la piña mínimamente procesada.....	60
11. Cambio en los parámetros físicos y químicos de la piña mínimamente procesada por la aplicación del calentamiento térmico convencional.....	63
12. Cambios en los sólidos solubles y diferencia total de color en la piña mínimamente por la aplicación del calentamiento óhmico.....	67
13. TPA de la piña mínimamente procesada por la aplicación del tratamiento óhmico.....	68

14	TPA de la piña mínimamente procesada por la aplicación del tratamiento óhmico (continuación).....	69
15.	Cambio en la actividad de agua, pH y sólidos solubles en la piña mínimamente procesada tratada con calentamiento óhmico.....	76
16.	Contenido de BMA, enterobacterias y bacterias ácido lácticas en piña mínimamente procesada tratada con calentamiento óhmico almacenada a 4°C.....	80
17.	Hongos y levaduras en piña mínimamente procesada tratada con calentamiento óhmico almacenada a 4°C.....	80
18.	Contenido de BMA, enterobacterias y bacterias ácido lácticas en piña tratada con calentamiento óhmico almacenada a 10°C..	81
19.	Hongos y levaduras en piña mínimamente procesada tratada con calentamiento óhmico almacenada a 10 °C.....	81

I. INTRODUCCIÓN

La población mundial cada día está más consciente de los beneficios del consumo de los productos hortofrutícolas; sin embargo, el estilo de vida actual ha llevado a poner a disposición del consumidor opciones de alimentos mínimamente procesados que no requieran preparación previa a su consumo. Éstos son, generalmente, frutas y hortalizas lavadas, peladas, cortadas y empacadas listas para el consumo (Lagunes-Martínez *et al.*, 2017; Moubarac, 2017)

Desafortunadamente, el número de brotes asociados al consumo de productos mínimamente procesados ha aumentado debido a que durante su procesamiento ocurre fácilmente su contaminación, en especial en la etapa de cortado. En Estados Unidos (EE.UU.), en un periodo de cuatro años se han presentado 71 brotes con más de 2,000 enfermos siendo los principales agentes causales *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 en productos tales como la papaya, pepino, mango, melón, tomate y fresas (CDC, 2017).

En la industria de los productos hortofrutícolas mínimamente procesados, el control de microorganismos patógenos se lleva a cabo tradicionalmente mediante la aplicación métodos de desinfección con productos químicos, siendo el más empleado el hipoclorito de sodio; sin embargo, su uso a las concentraciones permitidas no garantiza la completa eliminación de los microorganismos contaminantes. En estudios en los cuales se aplicó hipoclorito de sodio a 200 ppm se logran reducciones de 1.4 Log UFC g⁻¹ de *E. coli* en guayaba, 2.1 Log UFC g⁻¹ de *Salmonella* en zanahoria y 1.2 Log UFC g⁻¹ de *L. monocytogenes* en zanahoria (Ruiz-Cruz *et al.*, 2007; Har *et al.*, 2013). Otro desinfectante empleado en la industria de productos hortofrutícolas es el dióxido de cloro el cual reduce 1.2 Log UFC g⁻¹ la población de *E. coli* en guayaba y 1.1 Log UFC g⁻¹ de bacterias mesófilas aerobias en fresas (Har *et al.*, 2013; de São José *et al.*, 2015). Alternativas como el ácido peracético reducen entre 2.8 a 3.5 Log UFC g⁻¹ de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en frutas mínimamente procesadas (Abadias *et al.*, 2011).

Por tanto, se hace necesaria la búsqueda de tratamientos de descontaminación efectivos que garanticen el cumplimiento de los estándares establecidos para ser considerados como efectivos (5 Log UFC de reducción). Recientemente, para eliminar microorganismos patógenos en alimentos, se han empleado con éxito tecnologías emergentes como el calentamiento óhmico tanto en líquidos como jugos de naranja, manzana, uva, granada, zanahoria, melón, etc.; y en sólidos como papas, coliflor, fresas, etc.

La piña (*Ananas comosus* L.) es una fruta tropical de las más consumidas a nivel mundial debido a su sabor, presencia de jugo y nutrientes. En México, la producción de piña en las últimas dos décadas ha tenido un crecimiento del 29%, exportando aproximadamente 8% de la producción nacional a EE.UU., siendo este país el principal importador de piña fresca cortada y mínimamente procesada, seguido de los Países Bajos, Alemania y Japón.

La piña no está exenta de una posible contaminación con microorganismos patógenos como *Salmonella* y *L. monocytogenes*. Si bien el pH de la piña (3.5 a 3.7) es una limitante para el desarrollo de microorganismos, se ha documentado que estos patógenos pueden sobrevivir en ambientes ácidos hasta por una semana como es en la propia piña, tomate deshidratado y mango. Sin embargo, hasta el momento no se tienen datos acerca de la incidencia de microorganismos patógenos en piña mínimamente procesada. Tampoco se ha evaluado la eficacia de tratamientos de descontaminación que se aplican sobre la fruta.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de desinfectantes químicos y calentamiento óhmico en la inactivación de *S. enterica* y *L. monocytogenes* en piña mínimamente procesada y en los atributos de calidad del producto durante su almacenamiento.

II. ANTECEDENTES

II.1 Tendencias de consumo de alimentos

II.1.1 Productos de conveniencia

Hoy en día existen cada vez más productos alimenticios en el mercado para que el consumidor elija. El estilo de vida actual, la necesidad de ahorrar tiempo, la facilidad y preparación mínima que requieren los alimentos han desencadenado la popularidad de los productos llamados “de conveniencia”. La comida de conveniencia consiste en productos de origen animal o vegetal, en presentaciones crudas, cocidas o precocidas que pueden comercializarse como listos para el consumo, ya sea directamente o siguiendo métodos adicionales de calentamiento o cocción (Lagunes-Martínez *et al.*, 2017).

Los productos de conveniencia se clasifican según el proceso físico, biológico y químico al que fueron sometidos, así como la naturaleza y el propósito con el que fue aplicado (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los productos de conveniencia.

Clasificación	Descripción	Ejemplos
Listo para comer	No necesitan una preparación	Emparedados, ensaladas, frituras
Listo para calentar	Requiere un calentamiento antes del consumo	Productos congelados Productos deshidratados
Listos para cocinar	Productos que han sido mínimamente procesados	Frutas y hortalizas

(Chen, 2016)

Los productos mínimamente procesados son aquellos que han sido alterados de manera que no se añaden o introducen nuevas sustancias (grasas,

azúcares o sales) pero que generalmente involucran la remoción de partes del producto. Se incluyen hortalizas, frutas, granos, nueces, carnes, pescado, mariscos, huevo y leche. Las técnicas de procesamiento aplicadas preservan al alimento y extienden su vida de anaquel (Moubarac, 2017).

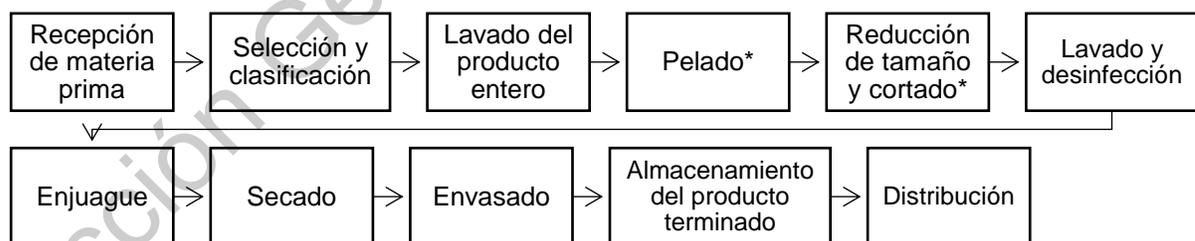
II.1.2 Frutas mínimamente procesadas

La población está cada vez más consciente de los beneficios del consumo de frutas frescas; sin embargo, no muchas personas tienen el tiempo para prepararlas cada día, por lo que el consumo de frutas mínimamente procesadas ha aumentado significativamente en los últimos años (de São José *et al.*, 2012).

Las frutas mínimamente procesadas son productos que están parcialmente preparados mediante una serie de operaciones que no afectan su frescura ni calidad. El resultado es que pueden ser preparados y consumidos inmediatamente (Priyadarshi *et al.*, 2014).

II.1.2.1 Procesamiento de frutas mínimamente procesadas

Los consumidores buscan frutas que estén peladas y si es posible en rodajas, ralladas o trituradas. Un diagrama general de su preparación se presenta en la Figura 1.



*Pasos opcionales dependiendo de la fruta

Figura 1. Diagrama de flujo de la preparación de frutas mínimamente procesadas (Ahvenainen, 1996).

Para el procesamiento mínimo de frutas, primeramente, se desinfecta la superficie exterior, enseguida se pela la fruta y luego se puede pasar por un cortador/rebanador o se corta manualmente. Dependiendo de la fruta, las porciones se pueden o no lavarse después del corte. La preparación de frutas mínimamente procesadas se complica por la naturaleza inherente de las mismas, en las cuales, los procesos de ablandamiento y otros procesos madurativos continúan después de la cosecha. Por lo que el encontrar el balance correcto entre la calidad, sabor y firmeza es un asunto clave para lograr que tengan una vida de anaquel adecuada (Priyadarshi *et al.*, 2014).

II.2 La piña

II.2.1 Botánica

La piña (*Ananas comosus* L., Merrill) es una planta monocotiledónea, herbácea y perenne, originaria de América del Sur, perteneciente a la familia de las bromeliáceas y al género *Ananas*. Aunque la mayoría de las bromeliáceas son epifitas, es decir, que crecen sobre otras plantas terrestres; la piña es una planta que crece en el suelo a expensas de los nutrientes presentes en éste y que son captados por sus raíces (Figura 2) (Stewart, 2018).

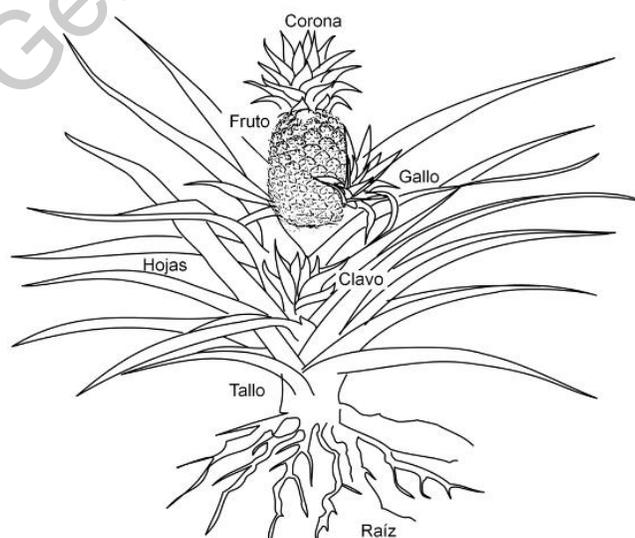


Figura 2. Partes de la planta de piña (Modificado de Stewart, 2018).

Las flores dan fruto sin necesidad de fecundación del óvulo, en cambio se desarrollan unos frutos en forma de baya, que juntamente con el eje de la inflorescencia y las brácteas, dan lugar a una infrutescencia carnosa llamada sorosis. La inflorescencia contiene entre 100 y 200 flores colocadas en forma de espiral, fusionadas al eje central. La floración se prolonga entre 30 y 60 días aproximadamente: el fruto maduro se obtiene 135 días después de haber emergido la flor. Cada tallo florece sólo una vez y muere después de fructificar, entonces, un brote lateral (hijuelo) toma el lugar de la planta madre. Existen muchos cultivares de *Ananas*, no obstante, los predominante son “Cayena Lisa” y “MD2” o “Miel” (Stewart, 2018).

La piña es un fruto múltiple ovalado y grueso que mide en promedio 30 cm de largo y 15 cm de diámetro, en función de la variedad. Su pulpa comestible está rodeada de brácteas verdes que pasan a anaranjadas al madurar, formando la piel del fruto. En el extremo superior las brácteas se transforman en una corona de hojas. Su pulpa amarilla o blanca, es carnosa, aromática, jugosa y agridulce. En su interior hay un tronco fibroso duro que va desde la corona al pedículo (SAGARPA, 2017).

II.2.2 Producción y consumo

La piña es la tercera fruta tropical más producida, comercializada y consumida en el mundo por su sabor, jugo y calidad nutricional; es un fruto con alto valor en el mercado internacional y con potencial en la fabricación de productos agroindustriales. En el periodo 2003-2016, la producción de piña en México creció 29 %, además que las exportaciones aumentaron a un ritmo acelerado en el mismo periodo pasando de 20.8 mil a 86.3 mil toneladas. Las importaciones mundiales han aumentado 38 % en la última década lo que ha generado un incremento en las exportaciones mexicanas, principalmente con destino a EE.UU país que a su vez importa la mayor parte de la piña fresca cortada con un estimado del 46 % del mercado global, siendo uno de los productos tropicales de mayor valor agregado (Strawn *et al.*, 2010; SAGARPA, 2017).

La principal forma de consumo de la piña es en fresco, en cubos y rebanadas. En la industria de los alimentos se elaboran jugos y concentrados, jaleas y preparaciones enlatadas. En el caso de la piña mínimamente procesada, su producción sigue los pasos básicos mencionados en la Figura 1. Brevemente, la fruta se sumerge en una solución de agua clorada o es lavada con una solución de agua con hidróxido de sodio en forma de cascada; en el paso de pelado se elimina la cascara y el corazón para después pasar al cortado. Un paso adicional es la centrifugación para eliminar el exceso de jugo y el almacenamiento se recomienda a 5°C con una humedad relativa del 90% (Priyadarshi *et al.*, 2014).

II.2.3 Composición

La piña es conocida como la reina de las frutas debido a su excelente olor y sabor ligado a sus beneficios para la salud. La piña contiene cantidades considerables de carbohidratos, fibra y agua con un mínimo de lípidos y sodio (Tabla 2); los principales carbohidratos que tiene son sacarosa, glucosa y fructosa así como calcio, potasio y vitamina C. El ácido orgánico más abundante es el ácido cítrico (Joy *et al.*, 2016).

Tabla 2. Composición de la piña (USDA, 2018).

Nutriente	Valor por 100 g
Agua	85.66
Proteína	0.53
Lípidos totales	0.11
Carbohidratos	13.50
Fibra dietaria total	1.4
Azúcares totales	10.32
Vitamina C (Ácido ascórbico total)	0.564

II.3 Fuentes de contaminación de frutas

Las frutas se encuentran expuestas a contaminación por microorganismos patógenos antes, durante y después de su cosecha (Figura 3). Las frutas no suelen contener los microorganismos en su interior, sino que su presencia se limita al exterior. El origen, características físicas y estructurales, y composición química de las frutas son determinantes de su contenido cualitativo y cuantitativo de microorganismos. Los tipos de microorganismos presentes (bacterias, virus, hongos, levaduras y parásitos) dependen de cada producto y pueden ser muy variables (Escartín, 2008).

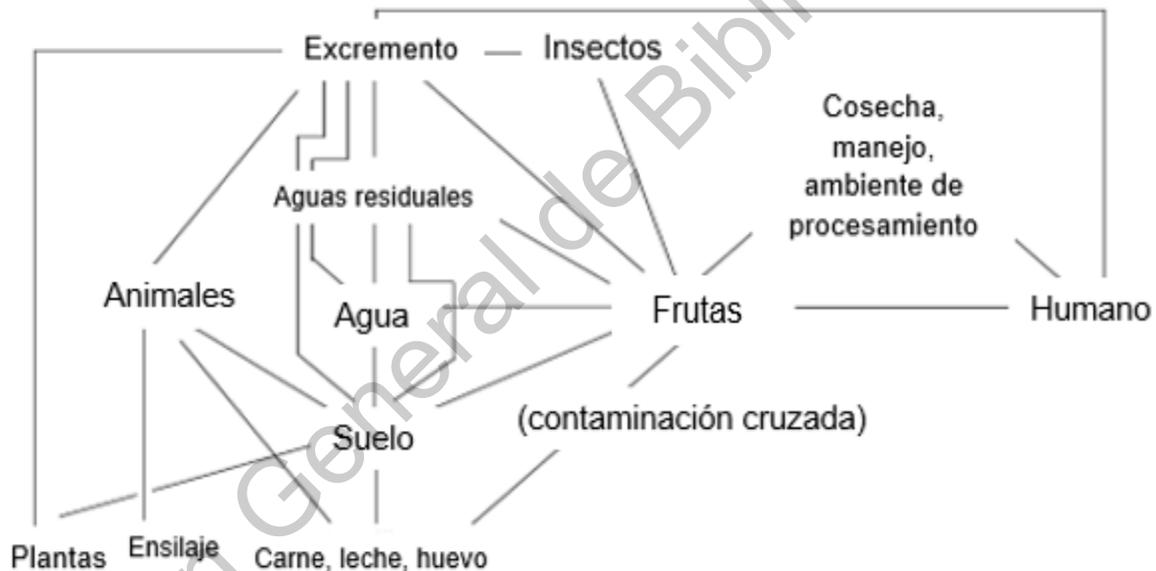


Figura 3. Fuentes de contaminación microbiana a frutas (Modificado de Beuchat, 1996).

Bacterias como *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* y *L. monocytogenes* se encuentran frecuentemente en suelos, mientras *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *E. coli* y *Campylobacter* spp habitan en el tracto intestinal de animales, incluyendo humanos, y contaminan la fruta cruda por el contacto con heces o aguas de riego.

La contaminación puede ocurrir en el manejo en poscosecha, incluyendo los puntos de preparación y de venta (FAO, 1997).

II.3.1 Contaminación en poscosecha

En especial, los pasos de producción en las frutas mínimamente procesadas son de especial atención ya que son los puntos de contaminación más comunes. Durante el pelado, cortado y triturado, la superficie del producto es expuesta al aire y a una posible contaminación con bacterias, hongos y levaduras. Inclusive en estos mismos pasos se puede llevar a cabo una contaminación cruzada debido al uso de los cuchillos, rebanadoras y otros equipos. La barrera de protección epidérmica es rota aumentando la concentración de nutrientes disponibles y proveyendo una gran área superficial que facilita el crecimiento microbiano; en consecuencia, disminuye la calidad de la fruta si se contamina la fruta. Adicionalmente, el daño mecánico causado a las células durante su procesamiento puede incrementar la tasa de senescencia del tejido disminuyendo la resistencia al deterioro microbiano, el procesamiento mínimo no garantiza la esterilidad del producto y se tiene un metabolismo elevado en las células del fruto y su confinamiento (Ramos *et al.*, 2013).

Por lo que se aumenta el riesgo a la salud de los consumidores en caso de que en los productos se encuentren presentes microorganismos patógenos ya que éstos pueden proliferar durante el almacenamiento (Taylor *et al.*, 2009).

II.4 Microorganismos patógenos asociados a frutas

De los riesgos por consumo de alimentos, incluyendo los peligros físicos, químicos y biológico por su consumo, generan un estimado de 48 millones de casos cada año en los EE.UU., incluyendo 9.4 millones ocasionados por bacterias, específicamente por bacterias patógenos. De los brotes presentados el 38 % fue causado por virus, 54 % por bacterias, 7 % por productos químicos y 1 % por parásitos (CDC, 2017). La frecuencia con la que ocurren brotes causados por la ingesta de productos mínimamente procesados ha incrementado en años recientes y esta tendencia tiene relación con el aumento en su consumo. Además, los tratamientos de descontaminación que se aplican a las frutas mínimamente

procesadas no aseguran la inocuidad microbiológica, pudiendo ocurrir la presencia de microorganismos patógenos como *Salmonella*, *L. monocytogenes* y *E. coli* (Sivapalasingam *et al.*, 2004).

En 2015 se registraron un total de 902 brotes en EE.UU., de los cuales *Salmonella* fue el segundo agente etiológico más común, con 34% de brotes y 39% de enfermos, de estos brotes el serotipo Enteritidis fue el más común. Los brotes causados por *Salmonella* resultaron en el mayor número de hospitalizaciones y de muertes seguido de *Listeria* (CDC, 2012). Dentro de estos brotes *E. coli* O175:H7 es la mayor causa de colitis hemorrágica y síndrome hemolítico urémico causando un estimado de 73,000 casos y 61 muertes anualmente. De estos casos, se estima que 85% son causados por transmisión por alimentos. *E. coli* productora de toxina Shiga causo 6% de los brotes y 3% de los enfermos (Sodha *et al.*, 2011).

Dentro de las categorías de alimentos, las frutas mínimamente procesadas y frescas registraron 71 brotes relacionados con su consumo entre 2011 y 2015 conduciendo a 2323 casos (CDC, 2012) (Tabla 3 **Error! Reference source not found.**).

Tabla 3. Brotes de enfermedad asociados al consumo de frutas frescas y mínimamente procesadas en EE.UU. (CDC, 2017).

Fruta	Microorganismo	Casos	Hospitalizados	Muertes
Coco rallado congelado	S. Newport	27	6	0
	S. Urbana	7	4	0
	S. Newport	4	2	0
Papaya 'Maradol'	S. Anatum	20	5	1
	S. Infections	220	68	1
	S. Uganda	81	27	0
Pepino	S. Poona	907	204	6

Pepino	S. Newport	141	38	1
Mangos	S. Braenderup	127	33	0
Melón	S. Typhimurium	261	94	3
Mamey congelado	S. Typhi	9	7	0
Melón	S. Litchfield	51	16	0
Tomates	S. Typhimurium	183	22	0
Frutas congeladas	<i>L. monocytogenes</i>	9	9	4
Manzana	<i>L. monocytogenes</i>	35	34	7
Melón	<i>L. monocytogenes</i>	147	143	33
Melón cortado	S. Adelaide	60	31	0
Melón cortado	S. Carrau	137	38	0

II.4.1 *Salmonella* spp.

Salmonella es una bacteria bacilo, Gram negativo, no esporulada, aerobio o anaerobio facultativo que pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae*, y está asociado al tracto de animales de sangre caliente. El género incluye dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. Esta última es considerada no patógena para el hombre; sin embargo, *S. enterica* tiene numerosos serovares patógenos, tanto para el hombre como para algunos animales. Dentro del género *Salmonella* se ha identificado cerca de 2600 serotipos y la mayoría de estos tienen la habilidad de adaptarse a diversos huéspedes animales, incluyendo humanos (Cosby *et al.*, 2015; Eng *et al.*, 2015).

Salmonella tiene una temperatura óptimo de crecimiento de 35 °C a 40 °C, con un rango de crecimiento de 2 a 54 °C, aunque en general no crece bien a temperaturas bajas. Sin embargo, la mayoría de las cepas sobreviven en ambientes ácidos (pH ≤ 4.6) y resisten la deshidratación (Cosby *et al.*, 2015).

La severidad de la infección de *Salmonella* varía en función del serotipo involucrado y del estado de salud de la persona. Niños por debajo de cinco años, adultos mayores y pacientes inmunocomprometidos son más susceptibles a infecciones por *Salmonella*. La mayoría de las cepas de *Salmonella* son patogénicas

ya que tienen la habilidad de invadir, replicarse y sobrevivir en las células huésped desencadenando una enfermedad. *Salmonella* muestra una característica notable durante la invasión de células humanas ya que induce su propia fagocitosis con el fin de obtener acceso a la célula huésped. Esto se logra mediante las islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs, por sus siglas en inglés) que codifican para las estructuras implicadas en el proceso de invasión. Cuando las bacterias ingresan al tracto digestivo a través de agua o alimentos contaminados, tienden a penetrar en las células epiteliales que recubren la pared intestinal (Figura 4). Las SPIs codifican los sistemas de secreción tipo III, que son proteínas que permiten a *Salmonella* inyectarse a través de la membrana de la célula epitelial intestinal hacia el citoplasma provocando la enfermedad (Eng *et al.*, 2015).

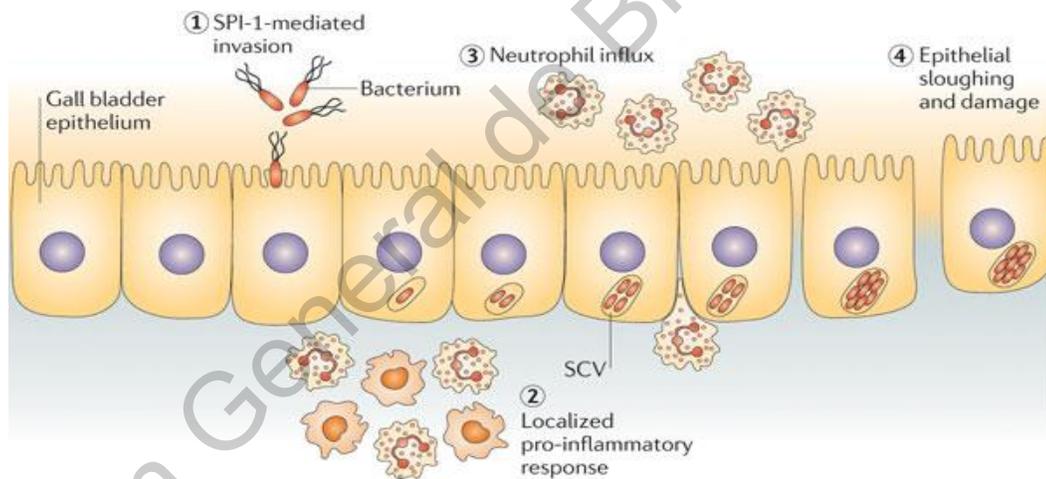


Figura 4. Infección de *Salmonella* en células epiteliales del intestino (Eng *et al.*, 2015).

Los síntomas de la salmonelosis incluyen diarrea, dolor abdominal, náuseas y vómito con una duración de uno a siete días; en casos más extremos la infección puede llevar a una septicemia y muerte. La dosis infectante para salmonelosis en adultos está en un rango de 10^4 a 10^6 células, pero también puede ser muy baja (de

10¹ a 10² células), dependiendo de la persona por lo que es necesario tener un control sobre este patógeno (Cosby *et al.*, 2015).

II.4.2 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes es un bacilo corto Gram positivo, no esporulado, de aproximadamente 1.2 x 0.5µm, a veces calificado de cocoide y corineforme por mostrar diploformas dipuestas en "V". Es una bacteria omnipresente y común en el medio ambiente. Se aísla de ecosistemas, tales como los relacionados con el procesamiento y manejo de los alimentos (Fernández-Escartín, 2008).

El crecimiento de *Listeria* ocurre entre 3 y 45°C, pero el rango de temperatura óptimo es de 30 a 37°C. El organismo se multiplica en condiciones aeróbicas y microaerófilas a valores de pH mayores a 9.6. Se observa que no hay crecimiento en condiciones anaeróbicas y su multiplicación es inhibida a valores de pH menores de 4.5 (Low *et al.*, 1997).

La listeriosis es una enfermedad causada por bacterias del género *Listeria* siendo *L. monocytogenes* la especie más patogénica en animales y humanos. La ingesta de alimentos contaminados es la principal ruta de infección. En el estómago puede ser que el ambiente ácido inactive parte de las bacterias pero la misma matriz alimentaria puede actuar como protección (McLauchlin *et al.*, 2004). Una vez que la bacteria llega al epitelio intestinal, atraviesa la barrera intestinal y se disemina a través del sistema linfático y la sangre hacia órganos: como el hígado, pulmón, bazo, riñón y cerebro (Figura 5) (Radoshevich *et al.*, 2018).

Esta bacteria causa principalmente infecciones intrauterinas, meningitis y septicemia. La listeriosis en el embarazo se manifiesta como una infección sistémica severa en el feto que puede conducir al aborto. En adultos y jóvenes, los principales efectos consisten de una alteración en el sistema nervioso central y/o septicemia, aunque son los inmunocomprometidos los más susceptibles a esta enfermedad. La tasa de mortalidad de listeriosis ha sido estimada entre 20 % y 40 % y los sobrevivientes, particularmente aquellos con afectaciones al sistema nervioso central, desarrollan secuelas (McLauchlin *et al.*, 2004).

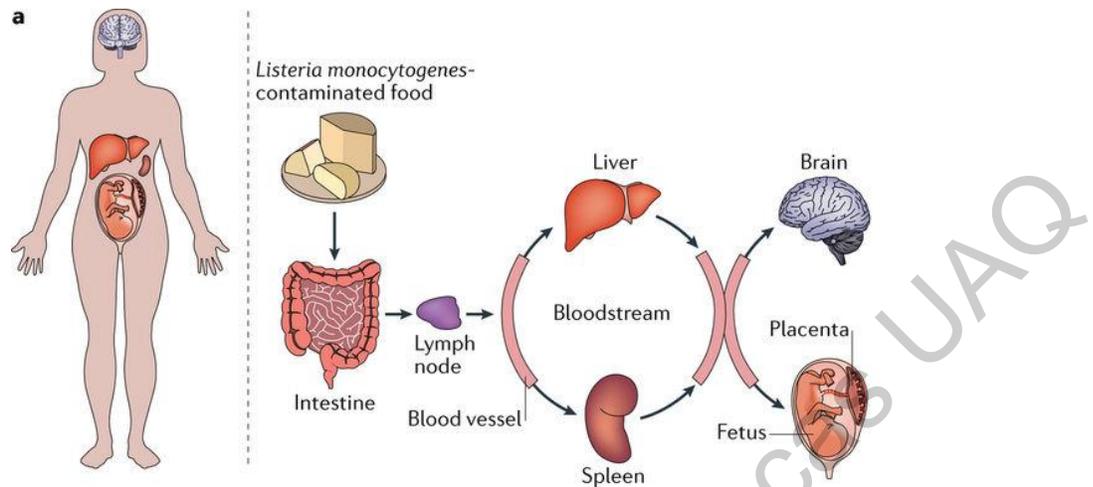


Figura 5. Órganos afectados durante la listeriosis (Radoshevich *et al.*, 2018).

II.4.3 La piña como vehículo de microorganismos patógenos en humanos

Hasta el momento no se conoce la incidencia de microorganismos patógenos en la piña mínimamente procesada, así que los reportes de piña como alimento implicado son reducidos (Sivapalasingam *et al.*, 2004).

Sin embargo, la piña fresca y su jugo han sido vinculados a brotes de enfermedad. En 1994 un brote con un número indefinido de casos de *E. coli* O11:H43 ocurrió en los EE.UU. y en 1996 un brote con 116 casos de salmonelosis se presentó en Singapur, ambos relacionados con el consumo de piña fresca. En el brote de Singapur se identificó a *S. Weltevreden* como el agente etiológico, y fue aislada de la piña fresca cortada y de otras tres frutas. Se concluyó que la fuente de contaminación más probable fue el agua empleada en la línea de producción (Strawn *et al.*, 2010).

Otros patógenos han sido asociados con su consumo como *C. jejuni* en un brote en 2002 en EE.UU., de igual manera cuatro brotes de Norovirus han sido documentados con productos no especificados de piña en 1999, 2001, 2002 y 2003, así como un brote relacionado directamente con el consumo de piña fresca cortada en 2001 (Strawn *et al.*, 2011).

II.4.4 Sobrevivencia de microorganismos patógenos humanos en piña

En un estudio llevado a cabo con piñas inoculadas con *E. coli* O157:H7 y *Salmonella*, se observó que el ambiente ácido de la piña no permite el crecimiento de estos patógenos; sin embargo, logran sobrevivir por varios días en la fruta almacenada a diferentes temperaturas (23, 12, 4 y -20°C). *Salmonella enterica* sobrevive mejor en temperatura de refrigeración (4°C) que a temperaturas más altas (23 y 12°C). La principal limitante para el crecimiento de *E. coli* y *Salmonella* en la piña es el bajo pH y la cantidad de fibra no fermentable que reduce los nutrientes que pueden ser utilizados por los microorganismos (Strawn *et al.*, 2010; Abadias *et al.*, 2012).

L. monocytogenes puede sobrevivir y crecer en una amplia variedad de frutas frescas cortadas como melón, papaya y apio; si bien la alta acidez y composición de la piña puede ser considerada como una barrera para el crecimiento del patógeno, éste se puede mantener viable en piña cortada por cuatro días a 25°C y hasta por seis días a 5°C (Feng *et al.*, 2015).

II.5 Métodos de descontaminación aplicados a frutas mínimamente procesadas.

Los métodos de descontaminación más comunes aplicados a las frutas mínimamente procesadas son la desinfección con agentes químicos o físicos (tratamientos térmicos como esterilización o pasteurización) (Barba *et al.*, 2018). Sin embargo, hoy en día existen otras alternativas llamadas tecnologías emergentes que presentan una serie de ventajas respecto a otros métodos. Las tecnologías emergentes se empezaron a estudiarse a principios del siglo pasado y recientemente se ha visto su aplicación con éxito en el procesamiento de diversos alimentos como jugos de frutas. En la actualidad, muchas tecnologías ya tienen aplicaciones y equipos industriales (Barba *et al.*, 2018).

II.5.1 Métodos químicos

Los agentes químicos frecuentemente son usados para la inactivación de microorganismos patógenos; sin embargo, estos tratamientos permiten también la eliminación de algunos microorganismos causantes de deterioro y en consecuencia se extiende la vida de almacén de los productos mínimamente procesados. Es un

hecho que los desinfectantes químicos no propician una reducción microbiana eficiente (Tabla 4). El hipoclorito de sodio ha sido ampliamente empleado como desinfectante para el lavado de frutas, hortalizas y productos cortados. Las concentraciones empleadas en la industria están en un rango de 50 a 200 ppm. Su efectividad depende de la proporción de hipoclorito y ácido hipocloroso, pero se ha visto que esta concentración máxima (200 ppm) no reduce los 5 Log UFC requeridos por la FDA para considerarlo un desinfectante eficiente (Jin *et al.*, 2017).

Los desinfectantes químicos son percibidos como negativos por los consumidores, peligrosos para la salud humana y dañinos para el medio ambiente, además de que su efectividad depende del pH y algunos son inactivados con materia orgánica (Pinela *et al.*, 2017). Otros desinfectantes químicos usados son el yodo, las sales cuaternarias y los ácidos orgánicos débiles que comparten las limitaciones de ser dependientes del pH, corrosivos y prohibidos en algunos países. Existen algunas alternativas como el uso de ácido peracético que se considera menos contaminante y más seguro, su mecanismo de acción se basa en el rompimiento de la membrana celular oxidándola con el radical hidroxilo. Una alternativa más reciente son los extractos de cítricos (toronja, mandarina, naranja) los cuales contienen ácidos orgánicos, polifenoles y glúcidos que llevan a una deshidratación de la membrana. El agua electrolizada es un nuevo desinfectante muy popular debido a su facilidad de producción y numerosas aplicaciones (Ramos *et al.*, 2013).

Tabla 4. Efectividad de desinfectantes químicos en frutas mínimamente procesadas.

Desinfectante	Alimento	Microorganismos	Reducción (Log)	Referencia
Hipoclorito de sodio 200 ppm	Carambola	<i>E. coli</i>	3.4	Har <i>et al.</i> , 2013

Peróxido de hidrógeno 5%			3.9	
Aqua plus (Dióxido de cloro) 10 ppm			2.5	
Hipoclorito de sodio 200 ppm			1.4	
Peróxido de hidrógeno 5%	Guayaba	<i>E. coli</i>	2.0	
Aqua plus (Dióxido de cloro) 10 ppm			1.2	
Dicloroisocianurato de sodio 200 mg/L			1.6	
Peróxido de hidrógeno 5%	Fresa	Bacterias mesófilas aeróbicas	2.4	de São José <i>et al.</i> , 2015
Ácido peracético 40 mg/L			3.0	
Dióxido de cloro 10 mg/L			1.1	
Dicloroisocianurato de sodio 200 mg/L	Tomate cherry	<i>Salmonella</i>	0.41	de São José <i>et al.</i> , 2012
Ácido peracético 40 mg/L			2.73	
Hipoclorito de sodio 200 ppm	Zanahoria	<i>Salmonella</i>	2.1	Ruiz-Cruz, <i>et al.</i> , 2007
Ácido peracético 40 mg/L			3.3	

Hipoclorito de sodio 200 ppm	Zanahoria	<i>L. monocytogenes</i>	1.2	
Ácido peracético 40 mg/L			2.8	
Ácido peracético 40 mg/L			4.0	
Peróxido de hidrogeno 5%	Manzanas	<i>L. innocua</i>	1.5	Abadias et al., 2011
Citrox 5 mL/L			2.2	

II.5.2 Tecnologías emergentes

II.5.2.1 Generalidades

Estas tecnologías se enfocan en la preservación de los alimentos manteniendo los atributos de calidad; es decir, inactivan microorganismos y enzimas sin dañar las propiedades nutricionales y sensoriales del alimento a comparación con los tratamientos convencionales. Algunas de estas tecnologías ya tienen una aplicación en la industria y otras siguen en desarrollo. El interés científico en estas tecnologías es la versatilidad de los procesos, la posibilidad de controlar más de dos variables y por lo tanto la oportunidad en el diseño de nuevos productos (Butz *et al.*, 2002).

Existen varios criterios de clasificación de las tecnologías emergentes que se usan en la industria de alimentos, la más clásica las divide en térmicas y no térmicas (Butz *et al.*, 2002). Las tecnologías emergentes térmicas son el uso de microondas y el calentamiento óhmico; y las no térmicas son las altas presiones hidrostáticas, plasma frío, campos eléctricos pulsados, luz ultravioleta y ultrasonido (Barba *et al.*, 2017).

II.5.2.2 Calentamiento óhmico

El calentamiento óhmico es una técnica en la cual una corriente eléctrica pasa a través del alimento, generando calentamiento interno dentro en el alimento (Butz *et al.*, 2002). El principio básico del calentamiento óhmico es la disipación de

la energía eléctrica en forma de calor dentro del alimento. Los parámetros de operación tales como el voltaje eléctrico (la intensidad del campo eléctrico) y la corriente eléctrica definen la cantidad de energía transferida por unidad por unidad de tiempo de acuerdo con la ley de Joule (Ecuación 1).

$$\text{Potencia eléctrica consumida (Watts/horas)} = \left(\frac{V^2}{R}\right) * t = V * I * t \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde V es el voltaje eléctrico aplicado en volts; R es la resistencia eléctrica del alimento en Ohm; I es la corriente eléctrica en amperes y t es tiempo de horas (Barba *et al.*, 2018).

La resistencia eléctrica es el parámetro que depende del alimento (Barba *et al.*, 2018). Si el alimento tiene una resistencia eléctrica alta (5000 ohms) la potencia eléctrica consumida es baja de tal forma que tarda en calentarse el alimento. Por ello se recomienda que el alimento tenga una resistencia de 100 a 500 ohm asegurando que se tiene la potencia eléctrica suficiente para calentar al alimento a una temperatura de 100° C (Butz *et al.*, 2002). En investigación no se reporta el parámetro resistencia eléctrica (R) del alimento sino la propiedad llamada conductividad del alimento (σ). La relación entre la conductividad y la resistencia se muestra en la Ecuación 2:

$$\sigma = R * \frac{L}{A} = \left(\frac{I}{V}\right) \left(\frac{L}{A}\right) \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde R es la resistencia eléctrica medida del alimento (ohms); V es el voltaje eléctrico aplicado (volts); I es la corriente eléctrica (amperes); L es la distancia entre los electrodos donde se aplica el voltaje eléctrico y A es el área de los electrodos que están en contacto con el alimento.

La destrucción microbiana celular se lleva a cabo por el rompimiento de la membrana celular inducida por la aplicación del alto voltaje. Los altos pulsos eléctricos generan una diferencia de potencial a través de la membrana, si la diferencia de potencial entre la del exterior y el interior de la membrana alcanza un

punto crítico de aproximadamente 1 V, se induce la polarización y el rompimiento de la membrana (Figura 6) (Barba *et al.*, 2018).

Una desventaja del calentamiento óhmico es que bajo ciertas condiciones se pueden presentarse cambios de consistencia, sabor y color en los productos tratados (Jaeger *et al.*, 2016).

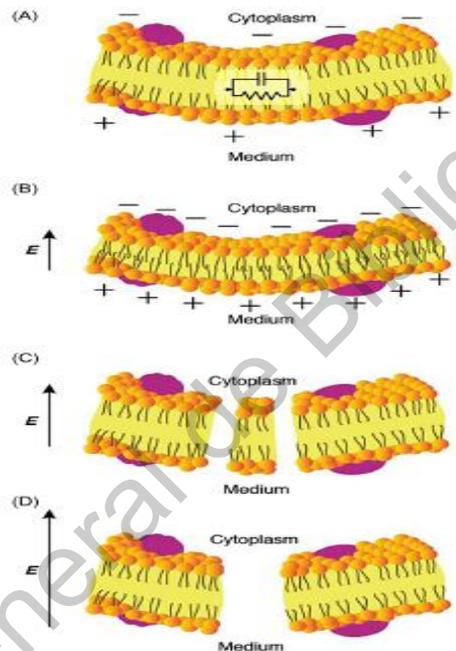


Figura 6. Diagrama de electroporación por la aplicación de voltaje (Barba *et al.*, 2017).

Las principales aplicaciones del calentamiento óhmico son la pasteurización y esterilización de líquidos y alimentos como frutas, hortalizas, carnes, etc. (Tabla 5). Experimentos llevados a cabo con bacterias Gram negativas (*E. coli*) así como con esporas de *Bacillus subtilis* mostraron que a través del calentamiento óhmico pueden lograrse reducciones similares a las observadas con un calentamiento convencional. En el caso de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*, la inactivación fue estudiada a temperaturas subletales observando un aumento de la permeabilidad celular en

matrices ácidas teniendo una mayor efectividad de reducción por el ambiente ácido (Barba *et al.*, 2018).

Tabla 5. Aplicación del calentamiento óhmico a diversos alimentos para reducir el contenido de microorganismos.

Matriz	Tratamiento	Resultados	Referencias
Jugo de Naranja	20 V/cm	Reducción de 5 log de <i>E. coli</i>	Sagong <i>et al.</i> , 2011
Jugo de Tomate		Reducción de >5 Log de <i>E. coli</i>	Sagong <i>et al.</i> , 2011
Salsa	25-40 V/cm	Reducción de 5 Log de <i>E. coli</i> y <i>S. enterica</i>	Lee <i>et al.</i> , 2013

II.6 Microorganismos subrogados

En la industria es necesario evaluar los tratamientos de desinfección, en el caso de frutas y productos frescos cortados donde no se usan pasos de inactivación tradicional, se deben hacer ensayos y validar los procesos de descontaminación. Validar en un laboratorio es un método viable; sin embargo, cepas patógenas no pueden ser empleadas en una industria procesadora de alimentos como objetivo de validar un paso de la producción, debido a las preocupaciones de bioseguridad y la posible contaminación del producto. En este sentido los microorganismos subrogados son una alternativa atractiva. (Busta *et al.*, 2003; Deen *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2019).

Los microorganismos subrogados son cepas no patógenas que se comportan de manera similar que el patógeno de interés en la misma matriz alimentaria y condiciones ambientales. Generalmente los subrogados son seleccionados de poblaciones de microorganismos con características bien definidas y con una larga historia de no ser patógenos. Un subrogado ideal tiene mismas

características de crecimiento y supervivencia que el patógeno en cuestión, es fácil de usar, fácil de almacenar y genéticamente estable (Busta *et al.*, 2003; Deen *et al.*, 2019)

Para *Salmonella*, *Enterococcus faecium* NRRL-B2354 ha sido ampliamente usado a pesar de que no es un microorganismo GRAS. La habilidad de *E. faecium* de modelar la inactivación de especies de *Salmonella* a través de una variedad de matrices alimentarias muestra el gran potencial para realizar validaciones (Busta *et al.*, 2003). *L. innocua* es la especie de *Listeria* más comúnmente detectada en la industria alimentaria y es una forma no patogénica de *Listeria*. La contaminación en alimentos por otras especies de *Listeria* indica que esta *Listeria* no patogénica posee características que permiten su desarrollo ya que todas las especies de *Listeria* tienen homología entre sus genomas (Silva-Angulo *et al.*, 2015; Deen *et al.*, 2019).

III. JUSTIFICACIÓN

La piña es una fruta tropical, apreciada por su sabor y nutrientes, con alto valor en el mercado internacional, con potencial en la fabricación de productos alimenticios y con un claro incremento tanto en producción y exportación hacia EE.UU., el principal comprador de piña mínimamente procesada. El incremento en la ingesta de los productos mínimamente procesados ha llevado a una preocupación sobre la inocuidad de los mismos, ya que los pasos que se involucran dentro de su producción pueden propiciar una contaminación con microorganismos patógenos, siendo *S. enterica* y *L. monocytogenes* los de mayor preocupación.

Hasta ahora la estrategia para el control de los microorganismos patógenos en la industria de frutas mínimamente procesadas se ha fundamentado en la aplicación de desinfectantes químicos cuya efectividad es limitada. El uso de tecnologías emergentes ha tomado importancia en el procesamiento de algunos alimentos; sin embargo, su aplicación en frutas mínimamente procesadas ha sido limitada. En este trabajo se propone la evaluación de las tecnologías emergentes, específicamente el calentamiento óhmico, como una alternativa eficaz para eliminar microorganismos patógenos presentes en piña mínimamente procesada que pueden afectar la salud del consumidor.

IV. HIPOTESIS

La aplicación de tratamientos con calentamiento óhmico genera una mayor reducción en las poblaciones de *S. enterica* y *L. monocytogenes* inoculadas en piña mínimamente procesada, en comparación con la aplicación de los tratamientos con desinfección química.

V. OBJETIVO

V.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la aplicación de desinfectantes químicos o calentamiento óhmico en la inactivación de *S. enterica* y *L. monocytogenes* en piña mínimamente procesada y en los atributos de calidad del producto durante su almacenamiento.

V.2 Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de microorganismos indicadores de calidad sanitaria así como *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* en piña mínimamente procesada.

2. Evaluar el comportamiento de *Enterococcus faecium* y *L. innocua* como subrogados de *S. enterica* y *L. monocytogenes*, respectivamente, en piña mínimamente procesada.

3. Evaluar la eficacia de la desinfección química en la inactivación de *S. enterica* y *L. monocytogenes* así como de sus subrogados en piña mínimamente procesada.

4. Evaluar el efecto de la aplicación de calentamiento óhmico en la inactivación de los subrogados de *S. enterica* y *L. monocytogenes* en piña mínimamente procesada.

5. Evaluar el efecto del calentamiento óhmico en la vida de anaquel así como el cambio en las variables físicas y químicas por la aplicación de los tratamientos de desinfección.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Materiales

VI.1.1 Reactivos y soluciones

- Solución salina isotónica estéril (DIBICO)
- Etanol 75%
- NaOH 0.01 N (Sigma-Aldrich)
- Fenolftaleína (Sigma-Aldrich)
- Rifampicina 10000 ppm
- Solución amortiguadora pH 7 (DIBICO)
- Glicerol (Sigma-Aldrich)
- Reactivo de Kovac (DIBICO)
- Ácido tartárico 10% (Sigma-Aldrich)
- Manitol (DIBICO)

- Ramnosa (DIBICO)
- Xilosa (DIBICO)
- Antisuero polivalente *Salmonella* O Antiserum Poly A-I & Vi (Bioxon)
- Agarosa
- Soluciones estándar del Aqualab
- Hipoclorito de sodio (Sigma-Aldrich)
- Ácido peracético (Oxidial)
- Extracto de cítricos (CitruX)
- Agua electrolizada neutra (Agua pura)
- Ácido cítrico (Sigma-Aldrich)
- Ácido sulfúrico (Sigma-Aldrich)
- Ferroína (Sigma-Aldrich)
- Tiosulfato de sodio 0.1 N (Sigma-Aldrich)
- Yoduro de potasio (Sigma-Aldrich)
- Almidón (Sigma-Aldrich)
- Permanganato de potasio (Sigma-Aldrich)
- Reactivos de PCR para *Salmonella*
- Reactivos de PCR para *Listeria*

VI.1.2 Medios de cultivo

- Agar hierro lisina (LIA) (DIBICO)
- Agar Oxford modificado (MOX) (DIBICO)
- Agar papa dextrosa (APD) (DIBICO)
- Agar sulfito bismuto (ASB) (DIBICO)
- Agar soya tripticaseína (AST) (DIBICO)
- Agar triple azúcar y hierro (TSI) (DIBICO)
- Agua peptonada (AP) (DIBICO)
- Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) (DIBICO)
- Agar cuenta estándar (ACE) (DIBICO)
- Agar sulfito bismuto (SB) (DIBICO)

- Agua peptonada (AP) (DIBICO)
- Agua peptonada bufferada (DIBICO)
- Caldo soya tripticasa (CST) (DIBICO)
- Caldo lactosado (CL) (DIBICO)
- Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante (CLBVB) (DIBICO)
- Caldo Lauril Sulfato con MUG (DIBICO)
- Caldo Tretrationato (DIBICO)
- Caldo Urea (DIBICO)
- Caldo Rappaport (DIBICO)
- Caldo UVM (DIBICO)
- Agar SIM(DIBICO)
- Caldo Fraser(DIBICO)
- Caldo Neutralizante (DIBICO)
- Diluyente de peptona (DIBICO)
- Agar bilis esculina (DIBICO)
- Placas PetriFilm (3M)

VI.1.3 Equipo

- Agitador mecánico, Vortex Fisher Scientific
- Autoclave eléctrica de mesa, All american
- AquaLab, CX-2
- Balanza analítica, Answorth 100
- Baño María con termostato, RIOSSA
- Campana de flujo laminar, Alder
- Centrífuga de mesa, Sol-Bat 1300
- Cuenta colonias, Quebec
- Homogenizador mecánico, Stomacher, Seward, London, England
- Micropipetas de 5-1000 μ L, Labsystems
- Ollas de presión Presto, Steele
- Potenciómetro, Orion 410A

- Refrigerador, IEM
- Incubadoras (35, 25 y 22°C), Thermo Scientific
- Lámpara Luz UV
- Termoblock, Eppendorf
- Termociclador, Techne TC-512
- Equipo de electroforesis (BIO-RAD)
- Refractómetro, ATAGO
- Horno, FELISA
- Colorímetro, Minolta
- Texturometro, Brookfield
- Equipo de calentamiento óhmico, armado a partir de piezas
- Plato caliente con agitación, Termo Fisher

VI.1.4 Material biológico

VI.1.4.1 Cepas

Las cepas fueron obtenidas del cepario de Laboratorio para la Evaluación y Control de Riesgos Microbianos en Alimentos.

- *S. Enteritidis* ATCC 13076
- *S. Typhimurium* ATCC 23595
- *S. Typhimurium* ATCC 14028
- *S. Thompson* ATCC 8391
- *S. Montevideo* ATCC 8387
- *E. faecium* NRRL-B2354
- *L. monocytogenes* ATCC 19115
- *L. monocytogenes* Scott A
- *L. monocytogenes* LCDC
- *L. monocytogenes* V7
- *L. innocua* ATCC 33090

VI.1.4.2 Piña

Se emplearon piñas del cultivar 'Gold' o 'Miel', el cual es un híbrido entre otros cultivares. Este cultivar se caracteriza por tener un sabor más dulce así como un contenido de menor bromelina con el objetivo de hacer más fácil su ingesta.

VI.2 Metodología

VI.2.1 Muestreos

Piñas (*Ananas comosus* L.) mínimamente procesadas (cortadas y peladas) fueron colectadas en: a) supermercados, b) mercados y c) puestos de vendedores ambulantes de la ciudad de Querétaro. Las piñas seleccionadas fueron aquellas que tuvieron un color interno de amarillo encendido identificado con el número 5 en la Figura 7.

Se realizaron muestreos semanales durante julio-agosto del 2018 y enero-julio del 2019 y se colectaron de manera aséptica muestras de cada sitio de muestreo (ambulantes, supermercados y mercados). Dichas muestras se transportaron al Laboratorio para la Evaluación y Control de Riesgos Microbianos en Alimentos (LECRIMA) de la Universidad Autónoma de Querétaro para llevar a cabo los análisis microbiológicos y fueron almacenadas a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ por un máximo de 24 h para llevar a cabo los análisis microbiológicos.

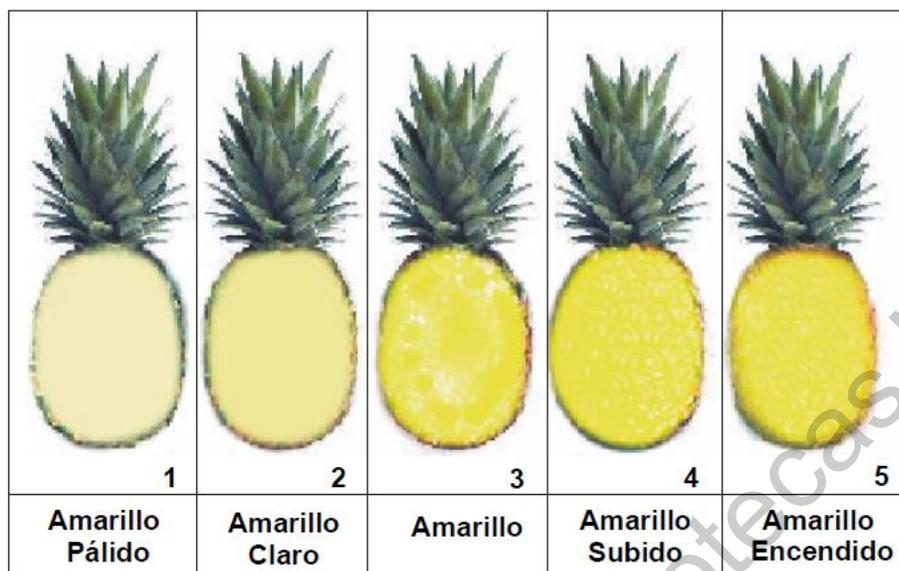


Figura 7. Clasificación de la piña de acuerdo con el color interno (SAGARPA, 2013).

VI.2.2. Determinación de variables físicos y químicos de la piña

Se determinaron las variables del pH, actividad de agua, acidez titulable y sólidos solubles según los métodos de la AOAC (AOAC, 1990) y el resto de las variables (color y textura) mediante metodologías previamente reportadas en piña, para lo cual una porción de 50 g se molió hasta obtener una pasta uniforme que se filtró en papel Whatman del número 1 de las muestras tratadas.

VI.2.2.1. pH

El pH se midió con un potenciómetro, previamente calibrado, sumergiendo el electrodo en la muestra. Las mediciones se realizaron por triplicado y se obtuvo el promedio (AOAC 981.12).

VI.2.2.2 Acidez total titulable

La acidez total titulable se midió con una titulación con NaOH 0.1 N hasta un pH de 8.1 empleando fenolftaleína como indicador y expresados como porcentaje de ácido cítrico mediante la siguiente ecuación 3:

$$\text{mg g}^{-1} \text{ Ácido cítrico} = \left(\frac{(\text{VNaOH})(\text{NNaOH})(0.064)}{(\text{Vol muestra})} \right) \times 100 \quad (\text{Ec.3})$$

VNaOH: volumen de NaOH gastado durante la titulación

NNaOH: Normalidad del NaOH empleado

Vol muestra: volumen de la muestra que se tituló

Las mediciones se realizaron por triplicado y se obtuvo el promedio (AOAC 942.15).

VI.2.2.3 Sólidos solubles totales

Los sólidos solubles se determinaron por el método AOAC 932.12 con la medición del índice de refracción en un refractómetro previamente calibrado con agua destilada y fueron reportados como grados Brix (°Bx). Las mediciones se realizaron por triplicado y se obtuvo el promedio.

VI.2.2.4 Actividad de agua

La determinación de la actividad de agua (Aa) se llevó a cabo mediante el método (AOAC 978.18) y se utilizó el equipo Aqualab Lite calibrado con soluciones estándares. Las mediciones se realizaron por triplicado y se obtuvo el promedio.

VI.2.2.6 Color

Para la medición del color se usó un equipo Minolta usando la escala CIE-Lab, donde L* define luminosidad, a* denota rojo/verde y b* valores amarillos/azul; se obtuvieron tres lecturas por cada réplica cambiando la posición de la pieza de pinya para obtener medidas de color representativas. El equipo se configuró para iluminar el ángulo del observador D₆₅ y 10° y se calibró utilizando una placa reflectora blanca estándar (Montero-Calderón *et al.*, 2008; Türkmen *et al.*, 2018).

La variable considerada para la evaluación del cambio de color fue la diferencia total de color (TCD por sus siglas en inglés) o ΔE. Esta variable cuantifica la diferencia de color global de una muestra en comparación con una muestra de referencia (L₀, a₀, b₀), de acuerdo con la siguiente ecuación 4:

$$\Delta E = \sqrt{(a-a_0)^2 + (b-b_0)^2 + (L-L_0)^2} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde el índice “0” es un indicativo de pña de referencia sin tratar (de São José *et al.*, 2015).

Actualmente no hay una norma o restricción que delimite los valores colorimétricos para los productos alimenticios, por lo que para fines prácticos se tomó como referencia a la norma ISO 12647-2 de especificaciones técnicas y tolerancias para la reproducción del color para impresión, prensa, huecograbado, serigrafía, flexografía e impresión de pruebas digitales que aborda los umbrales de tolerancia de ΔE (Tabla 6).

Tabla 6. Umbrales de tolerancia de ΔE según la ISO 12647-2.

ΔE	Calidad
1	Excelente
1-2	Buena
2-4	Normal
4-5	Suficiente
>5	Mala

Valores superiores a 5 se consideran como inaceptables en la mayoría de los procesos ya que se considera que la diferencia de color es especialmente evidente respecto a un control y el consumidor aprecia dicha diferencia.

VI.2.2.7 Análisis de perfil de textura (TPA por sus siglas en ingles)

El análisis de textura se llevó a cabo en un texturómetro a temperatura ambiente y con las siguientes condiciones: 5.0 mm s⁻¹ velocidad de prueba. 20% de compresión, intervalo de 10 s y con una carga de activación de 0.05 N. Las muestras de fruta se comprimieron dos veces empleando una sonda cilíndrica de 25.4 mm de diámetro para asegurar que toda la muestra recibiera el tratamiento. Se eligieron

trozos de diferentes partes de la piña para generar un promedio de dureza, adhesividad, resiliencia, fracturabilidad, cohesividad, elasticidad, gomosidad e índice de masticabilidad para cada piña y se midió en forma general en tres piñas (Montero-Calderón *et al.*, 2008; Sagong *et al.*, 2011).

VI.2.3 Análisis microbiológicos y detección de patógenos en diferentes establecimientos.

VI.2.3.1 Preparación de las muestras

Se pesaron asépticamente porciones de 10 g de muestra de las piñas mínimamente procesadas y se adicionaron 90 mL de amortiguador de fosfatos, se homogenizaron en un homogenizador mecánico, durante 1 min a velocidad normal y se realizaron las diluciones decimales en tubos con amortiguador de fosfatos. A partir de estas suspensiones se llevó a cabo el análisis microbiológico.

VI.2.3.2 Cuantificación de microorganismos indicadores

La cuantificación de microorganismos indicadores se realizó según las Normas Oficiales Mexicanas.

- × Bacterias mesófilas aerobias (BMA) (NOM-092-SSA1-1994).

El recuento de BMA se llevó a cabo mediante la técnica de vaciado en placa en agar cuenta estándar. Las placas de agar se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h.

- × Coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF) y *E. coli* (NOM-112-SSA1-1994).

La cuantificación de los CT, CF y *E. coli* se realizó mediante la técnica de número más probable (NMP) empleando caldo lactosado, caldo lactosa bilis verde brillante, caldo lauril sulfato con MUG y agua peptonada.

- × Hongos y levaduras (NOM-111-SSA1-1994).

El recuento de hongos y levaduras se llevó a cabo por la técnica de vaciado en placa en agar papa dextrosa acidificado a pH de 3.5 con ácido tartárico. Las placas de agar se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por un lapso de 72 hasta 120 h.

- × Detección de *Salmonella* spp.

La detección de *Salmonella* se llevó a cabo mediante las metodologías Oficiales Mexicanas y el método de la FDA (FDA, 2014b).

Se pesaron 25 g de muestra y se añadieron 225 mL de agua peptonada amortiguada ajustándose a un pH final de 6.8 ± 0.2 para incubarse a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. Una alícuota de 1 mL se inoculó en caldo tetratonato y caldo Rappaport, incubándose a $42 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. A partir de estos medios se realizó el estriado en placas de XLD y SB. Las colonias presuntivas se inocularon en tubos con agar TSI, LIA, citrato y caldo urea. Las colonias positivas se confirmaron mediante serología con el antisuero polivalente *Salmonella* O Antiserum Poly A-I & V y PCR.

Para la confirmación mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en ingles) se extrajo el ADN mediante el calentamiento en un Termoblock (95°C por 30 min). La mezcla de reactivos del PCR consistió en 5 μL de Master Mix 2x GoTaq, 0.5 μL MINf primer (5'-ACGGTAACAGGAAGCAG-3'), 0.5 μL MINr primer (5'TATTAACCACAACACCT-3'), 1 μL de ADN y 3 μL de agua grado molecular para dar un volumen final de reacción de 10 μL . El programa de amplificación para *Salmonella* consistió en una etapa inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 min, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 20 s, alineamiento a 55°C durante 30 s, extensión a 72°C durante 30 s y extensión final de 72°C por 2 min para el gen blanco 16S. El producto de esta PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa a 2 % a 50V / 60 min. Transcurrido el tiempo de electroforesis se observó el gel de agarosa en cámara de luz UV para analizar el tamaño del amplicón generado. Para la detección de *Salmonella* el tamaño del

amplificación resultante mediante la técnica de PCR fue de 402 pb (Trkov *et al.*, 2003). Las cepas de *Salmonella* se almacenaron a -70°C .

× Detección de *L. monocytogenes*

La detección de *L. monocytogenes* se llevó a cabo mediante las metodologías Oficiales Mexicanas y el FDA (FDA, 2014a).

Se pesaron asépticamente 25 g de la muestra y se enriqueció con 225 mL de caldo de enriquecimiento primario caldo UVM se homogenizó la muestra mecánicamente a velocidad normal durante 1 minuto y se incubó a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Finalizando el tiempo de incubación se transfirieron 100 μL de cada muestra a tubos con 10 mL de caldo de enriquecimiento secundario Fraser y se incubó a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Los cultivos de enriquecimiento secundario que resultaron positivos (oscurecimiento), se estriaron en agar MOX y se incubó 48 h a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Las colonias presuntivas se confirmaron por pruebas bioquímicas: fermentación de manitol, ramnosa y xilosa; y movilidad en SIM a 22°C .

Las colonias presuntivas también se confirmaron por PCR extrayendo el ADN de las colonias. La mezcla de reactivos del PCR consistió en 12.5 μL de Master Mix Go Taq Colorless, 1 μL del iniciador LM1f (CCTAAGACGCCAATCGAA), 1 μL del iniciador LM1r (AAGCGCTTGCAACTCGTC), 2 μL de ADN y 8.5 μL de agua grado molecular para dar un volumen final de reacción de 25 μL . El programa de amplificación para *L. monocytogenes* consistió de en una etapa inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 min, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 s, alineamiento a 60°C durante 90 s y extensión a 72°C durante 90 s, extensión final de 72°C por 5 min para el gen blanco *hlyA*. El producto de esta PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2% a 50 V/30 min. El gen esperado fue de 702 pb. Las cepas de *L. monocytogenes* se almacenaron a -70°C (Aznar *et al.*, 2002).

VI.2.4 Evaluación de comportamiento de patógenos vs subrogados.

VI.2.4.1 Preparación de la piña

Se adquirieron piñas enteras (*Annanas comusus L. cv 'Gold'*) en mercados locales con un color amarillo-naranja que cubriera del 80 a 100% de la superficie (piña 5 Figura 8).

Las piñas enteras se lavaron con agua y jabón, se retiraron las coronas y núcleos, se pelaron y cortaron en rebanadas de aproximadamente 2.5 cm de ancho. El área de trabajo, tablas de cortar, cuchillos y superficies en contacto con la fruta durante el proceso fueron lavadas y desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio a 50 ppm (Montero-Calderón *et al.*, 2008). La piña cortada se colocó en bandejas (una bandeja por grupo de cepa) formando una capa homogénea.

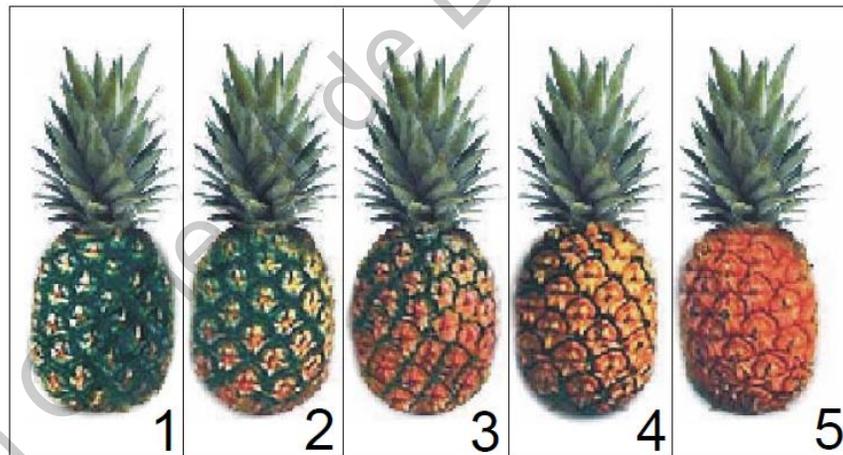


Figura 8. Clasificación de la piña de acuerdo con el color externo (SAGARPA, 2013).

VI.2.4.2 Cepas

Se empleó una mezcla de cinco cepas de *S. enterica* (*S. Enteritidis* ATCC 13076, *S. Typhimurium* ATCC 23595, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Thompson* ATCC 8391, *S. Montevideo* ATCC 8387) y otra mezcla de cepas de *L.*

monocytogenes (*L. monocytogenes* ATCC 19115, *L. monocytogenes* Scott A, *L. monocytogenes* LCDC y *L. monocytogenes* V7). Así mismo, se empleó una cepa de *E. faecium* (NRRL B-2354) y otra cepa de *L. innocua* (ATCC 33090) como subrogados de *S. enterica* y *L. monocytogenes*, respectivamente. Tanto a las cepas de los patógenos como los subrogados se les indujo la resistencia a rifampicina (200 ppm).

VI.2.4.3 Preparación del inóculo

El inóculo se preparó a partir de cultivos (tanto cepas de referencia como subrogados) resistentes a rifampicina previamente almacenadas a -70°C CST adicionado con 15% de glicerol. Una cantidad de 100 µL de los cultivos se transfirió a tubos con 3 mL de CST adicionado con rifampicina (200 ppm) y se incubaron a 35 ± 2 °C por 24, este paso se repitió por tres días consecutivos.

Al cuarto día las cepas se mezclaron en cuatro tubos Falcon de 15 mL un tubo por grupo, el grupo A (cepas de referencia de *S. enterica*), grupo B (*E. faecium*), grupo C (cepas de referencia de *L. monocytogenes*) y grupo D (*L. innocua*) y se realizó una centrifugación a 15000 rpm durante 2 min, seguido de un lavado con solución salina isotónica estéril a 0.85%, se realizó nuevamente una centrifugación y otro lavado con solución salina; este paso se repitió dos veces más. Las células lavadas se suspendieron en una solución amortiguadora de fosfatos estéril (pH 7) (Maribel Abadias *et al.*, 2012). Se cuantificó el número de células presentes en cada una de las suspensiones bacterianas mediante la técnica de vaciado en placa en agar soya tripticaseína (AST) suplementado con rifampicina (200 ppm).

VI.2.4.4 Comportamiento de los microorganismos patógenos y sus subrogados en caldo de cultivo y rebanadas de piña

Para comparar el comportamiento de los patógenos y sus subrogados, se evaluó su desarrollo en CST y en la misma matriz de la piña mínimamente procesada. Se preparó CST a pH de 3.5, 4.0 y 4.5 mediante la adición, previa a la esterilización, de una solución de ácido cítrico al 1% hasta lograr el pH deseado. Partiendo de una concentración inicial de 9 Log UFC mL⁻¹, se inoculó 1 mL de cada grupo de

microorganismo en tubos diferentes de cada pH. Se homogenizó durante 1 min a velocidad normal para después incubarse cada pH a 20 ± 2 y $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (Koutsoumanis *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2018).

La inoculación de las rebanadas de piña se realizó con 100 μL de cada microorganismo, en muestras diferentes, mediante goteo seguido de un secado por 20 min en campana de flujo laminar. El comportamiento de los microorganismos en comparación con sus subrogados se evaluó incubando las rebanadas de piña a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 36 h. (Strawn *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2015).

Tanto en los tubos con caldo como en las rebanadas de piña, se realizaron conteos de los microorganismos cada 2 h las primeras 12 h de incubación y después cada 6 h. A las porciones de piña se les adicionaron 90 mL de diluyente de peptona y se homogenizaron de manera automática durante 1 min a velocidad normal. A partir del homogenizado o de los tubos con CST ajustados a diferentes pH se prepararon diluciones decimales y se efectuó el recuento de las células mediante la técnica de extensión por superficie en AST con rifampicina a 200 ppm; las placas se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 h.

VI.2.5 Evaluación de tratamientos con desinfección en rebanadas de piña

VI.2.5.1 Desinfección química

Se prepararon porciones individuales de piña inoculada con las cuatro suspensiones celulares (A, B, C, D) como se describió en el apartado 6.2.4.4 y posteriormente se sumergieron durante cinco min en 100 mL de los siguientes desinfectantes: a) hipoclorito de sodio (50 y 200 ppm), b) agua electrolizada neutra (25 ppm), c) ácido peracético (40 y 80 ppm), d) desinfectante a base de extracto de semillas de cítricos (0.1 y 0.2%) y agua destilada. La concentración de las soluciones desinfectantes se comprobó mediante los métodos descritos en el Anexo 1. Pasado el tiempo de contacto, las porciones de piña fueron retiradas de las soluciones con cucharas estériles, se colocaron en bolsas de polietileno estériles y se adicionó 90 mL de caldo neutralizante. Todos los tratamientos se llevaron a cabo a temperatura ambiente ($25 \pm 0.2^\circ\text{C}$) (Brilhante *et al.*, 2012).

VI.2.5.2 Calentamiento óhmico

Los estudios de calentamiento óhmico se llevaron a cabo en el Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CICATA) en un equipo desarrollado por el grupo de investigación del Dr. Eduardo Morales en el laboratorio de Tecnología de Alimentos. El equipo de calentamiento óhmico consta de un medidor/controlador de temperatura marca Autonics, un controlador de voltaje marca VARIAC de 120 VAC, un transformador de voltaje de 120 VAC /440VAC, un medidor de voltaje AC, un medidor de corriente AC y un plato agitador magnético. El equipo de calentamiento óhmico puede variar el voltaje desde 1 hasta 450 VAC; puede controlar temperatura desde temperatura ambiente hasta 95° C (temperatura de ebullición). La celda está fabricada de acrílico y sus dimensiones son de 20 cm x 20 cm x 20 cm. Los electrodos son de acero inoxidable y son de 20 cm x 20 cm. La Figura 9 muestra la celda y el equipo de calentamiento óhmico utilizado.



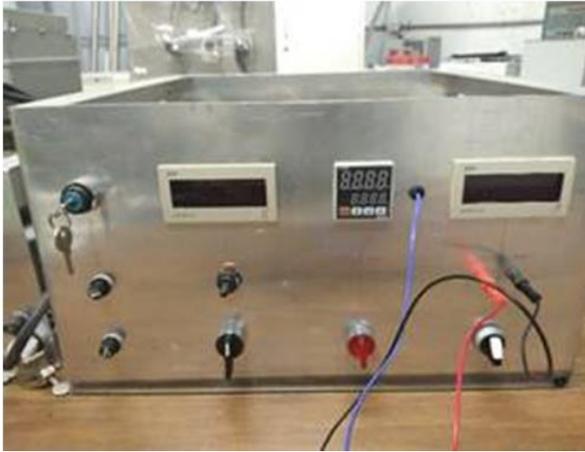


Figura 9. Equipo y celda de calentamiento óhmico empleada.

Se realizaron estudios preliminares para establecer las condiciones de tiempo y temperatura del calentamiento óhmico mediante un tratamiento convencional. Para ello, las rebanadas de piña se trataron temperaturas de 55, 60, 65, 70 y 75 °C en un vaso de vidrio con agua, retirando del calentamiento las muestras a los 0, 1, 2 y 3 min a partir de que se alcanzó la temperatura deseada. Después de los tratamientos, las muestras se enfriaron en baño de hielo para posteriormente evaluar su textura, color y sólidos solubles. La temperatura y tiempo elegidas fueron aquellas en donde no se encontraron diferencias significativa respecto a un control sin tratar (Barrón, 2017).

Una vez definidas las condiciones de tiempo y temperatura se procedió a la aplicación del tratamiento óhmico, Se inocularon rebanadas de piña como previamente se describió en el apartado 6.2.4.4 pero únicamente con los microorganismos subrogados: *E. faecium* (suspensión celular B) y *L. innocua* (suspensión celular D).

Los tratamientos por calentamiento óhmico se realizaron por triplicado empleando una celda de vidrio de 4 L con tapa acoplada a un sensor de temperatura con electrodos de acero inoxidable donde se colocó una rebanada de la piña mínimamente procesada para cada temperaturas elegidas previamente y se

aplicaron 15 y 20 V cm⁻¹. La muestra se mantuvo sumergida en el agua mediante un cilindro de plástico como se muestra en la Figura 10; el agua de tratamiento se mantuvo en agitación para distribuir la temperatura uniformemente. Una vez alcanzado el tiempo y temperatura las rebanadas se retiraron, se enfriaron en un baño de hielo y se drenó el exceso de agua durante 2 min. Se incluyó un control sin tratamiento con calentamiento óhmico (Jaeger *et al.*, 2016).

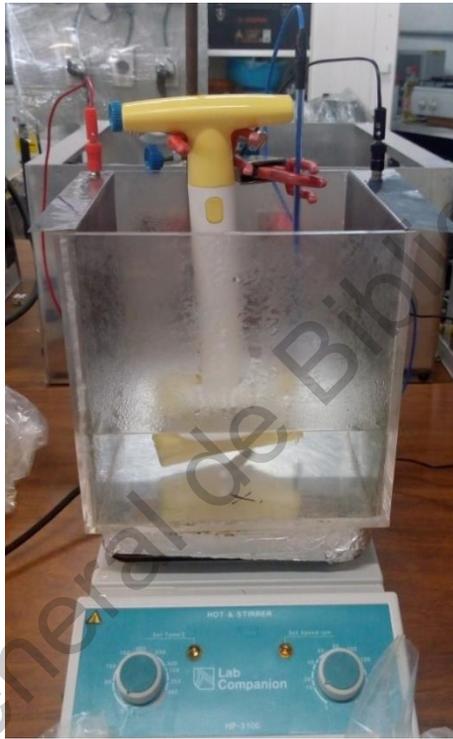


Figura 10. Sistema empleado para la piña mínimamente procesada.

VI.2.5.3 Recuento de células sobrevivientes

A las porciones de piña sometidas a los tratamientos de desinfección química se les adicionaron 90 mL de caldo neutralizante, mientras que a las piñas tratadas con el calentamiento óhmico 90 mL de diluyente de peptona. Se homogenizó la muestra empleando un homogenizador durante 1 min a velocidad normal. A partir del homogenizado se prepararon diluciones decimales y se efectuó el recuento de las células mediante la técnica de extensión en superficie en agar soya tripticaseína con rifampicina a 200 ppm; las placas se incubaron a 35 ± 2°C durante 48 h.

VI.2.6 Vida de anaquel de la piña tratada con calentamiento óhmico

A rebanadas de piña mínimamente procesada se les aplicó el mejor tratamiento de calentamiento óhmico y fueron colocadas en bolsas Ziploc a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ y $10 \pm 2^\circ\text{C}$. Se tomaron bolsas aleatoriamente cada tercer día durante 22 días a partir del primer día para efectuar el análisis de las características físicas y químicas (color, textura y sólidos solubles) y análisis microbiológicos (bacterias mesófilas aerobias, enterobacterias, ácido lácticas, hongos y levaduras) en placas de Petrifilm de acuerdo con las instrucciones del fabricante

VI.2.7 Análisis estadísticos

El análisis del contenido de microorganismos indicadores se llevó a cabo mediante una comparación de medianas con una prueba no paramétrica de Wilcoxon. El comportamiento de las diferentes cepas en caldo de cultivo y rebanadas de piña se analizó mediante una prueba de t de Student. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Los experimentos de desinfección química y óhmica se llevaron a cabo por triplicado y en cada replica se incluyeron cinco muestras por cada uno de los tratamientos. El recuento de las células sobrevivientes se transformó a Log UFC g^{-1} . Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) con una prueba de medias de Dunnet usando agua como control en caso de la desinfección química y una prueba de Tukey en el caso del calentamiento óhmico.

Se utilizó el Programa estadístico R (3.5.0) y todos los valores fueron considerados estadísticamente significativos basados en un valor de significancia de $p \leq 0.05$.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1 Microorganismos indicadores en piña mínimamente procesada

Durante los meses de julio-agosto del 2018 y enero-febrero del 2019 se realizaron muestreos en la ciudad de Querétaro recolectándose 57 muestras de supermercados, 33 muestras de mercados públicos y 50 muestras puestos ambulantes (Tabla 7). Para cada muestra se cuantificaron los microorganismos indicadores de calidad sanitaria: BMA, hongos y levaduras, coliformes y *E. coli*.

Tabla 7. Microorganismos indicadores en piña mínimamente procesada colectada en diferentes puntos de muestreo.

Lugar	Bacterias mesófilas aerobias	Hongos	Levaduras	Coliformes totales	Coliformes fecales
	Log UFC g ⁻¹			Log NMP g ⁻¹	
Supermercados	5.08b (4.74-7.39)	2.91b (2.23-5.15)	5.04b (2.72-7.40)	2.15b (0.98-3.29)	1.28b (0.96-3.29)
Mercados	5.20ab (3.49-7.79)	3.91a (3.13-5.60)	5.08b (3.77-6.67)	2.34a (1.08-3.55)	2.20a (1.08-3.36)
Ambulantes	5.82a (3.93-7.79)	3.95a (3.49-4.67)	5.85a (3.49-7.89)	2.46a (0.83-3.32)	2.43a (0.80-3.32)

¹Mediana (límite inferior-límite superior) de 140 muestras.

Los valores seguidos de letras iguales en la misma columna indica que no existen diferencias según la prueba de Wilcoxon ($p < 0.05$).

La mediana del contenido de BMA en las muestras de piña mínimamente procesada obtenidas en supermercados, mercados y puestos ambulantes fue similar y superior a 5 Log UFC g⁻¹ (Tabla 7, Figura 11). En los supermercados se observó que la piña rebanada comúnmente se almacena a temperatura de refrigeración, mientras que en los puestos ambulantes y mercados se mantiene a temperatura ambiente, lo que evidencia que la forma en la que se conservan tiene mayor efecto en el contenido de BMA; de igual manera los recuentos obtenidos de deben a las malas prácticas de higienización. Neetoo *et al.* (2019) analizaron piñas mínimamente procesadas cultivar “Reina Victoria” cuantificando BMA y obteniendo valores de 5.2 – 5.5 Log UFC g⁻¹ lo cual concuerda con los datos obtenidos en este trabajo.

En México no existe una Norma Oficial que haga referencia a los límites permisibles de contaminación microbiológica este tipo de producto pero según lo que señala en la legislación española se considera que el límite de BMA en productos mínimamente procesados es de 7 Log UFC g⁻¹. En EE.UU. el límite es de 6 Log UFC g⁻¹, por lo que los valores de la mediana de las muestras analizadas se encuentran dentro de ambos criterios; sin embargo, los límites superiores obtenidos están por arriba de lo permitido si se consideran los rangos mencionados (Ministerio de la Presidencia, 2000). La agencia de Normas Alimentarias de Australia considera que no existe un límite de BMA en frutas frescas ya que es evidente encontrar cuentas altas (Fasnz, 2001).

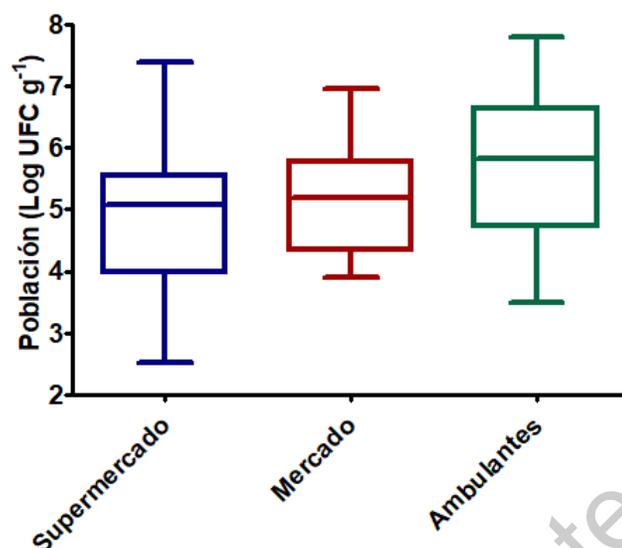


Figura 11. Contenido de BMA en piña mínimamente procesada en función del tipo de establecimiento de expedición.

En relación al contenido de hongos y levaduras, las muestras con las mayores poblaciones se obtuvieron en puestos ambulantes con valores de 3.95 y 5.85 Log UFC g⁻¹, respectivamente (Tabla 7, Figura 12) aunque con rangos muy amplios. Neetoo *et al.* (2019) encontraron valores alrededor de 5.8 - 6.3 Log UFC g⁻¹ que concuerda sensiblemente con lo encontrado en las muestras colectadas en Querétaro.

El elevado contenido de hongos y levaduras pueden deberse a la exposición del alimento a contaminación ambiental como las corrientes de aire, o bien a que durante su procesamiento no se llevó a cabo un paso de lavado y desinfección de la piña para remover la suciedad y la contaminación. De igual manera la piña presenta carga altas con hongos y levaduras epífitas debido a la fisiología de la fruta ya que los nectarios presentan canales que dan paso a los microorganismos capaces de tolerar estos ambientes de alta acidez (Di *et al.*, 2010). Por otro lado, el pH del alimento influye en la composición de la microbiota y los hongos y levaduras pueden sobrevivir e incluso desarrollar en ambientes ácidos como la piña y son los principales deterioradores de color, olor y textura (Perricone *et al.*, 2017) y su presencia también es indeseable debido a que cuando su cuenta total de hongos filamentosos es mayor

a 10^6 UFC g^{-1} , son capaces de producir metabolitos tóxicos, como micotoxinas (Dermesonlouglou, 2018).

Se ha reportado que los principales deterioradores en frutas picadas son las levaduras osmofílicas por su habilidad para crecer más rápido que los hongos, este rápido crecimiento se observó al realizar las cuentas en placa donde al tener una cuenta alta de levaduras casi no se presentaba crecimiento de hongos. Sin embargo, en general, 2/3 partes del deterioro en las frutas mínimamente procesadas es causado por hongos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Sclerotinia*, *Botrytis*, *Eurotium* spp., *Alternaria*, *Cladosporium*. y *Rhizopus*. Un criterio microbiológico recomendado por la FDA en frutas mínimamente procesadas es que el límite máximo de levaduras debe ser 10^3 UFC g^{-1} (Dermesonlouglou, 2018); sin embargo, en este trabajo, en todos los puntos de muestreo los valores de la mediana se encontraron por arriba de estas recomendaciones observándose un rápido deterioro de las muestras.

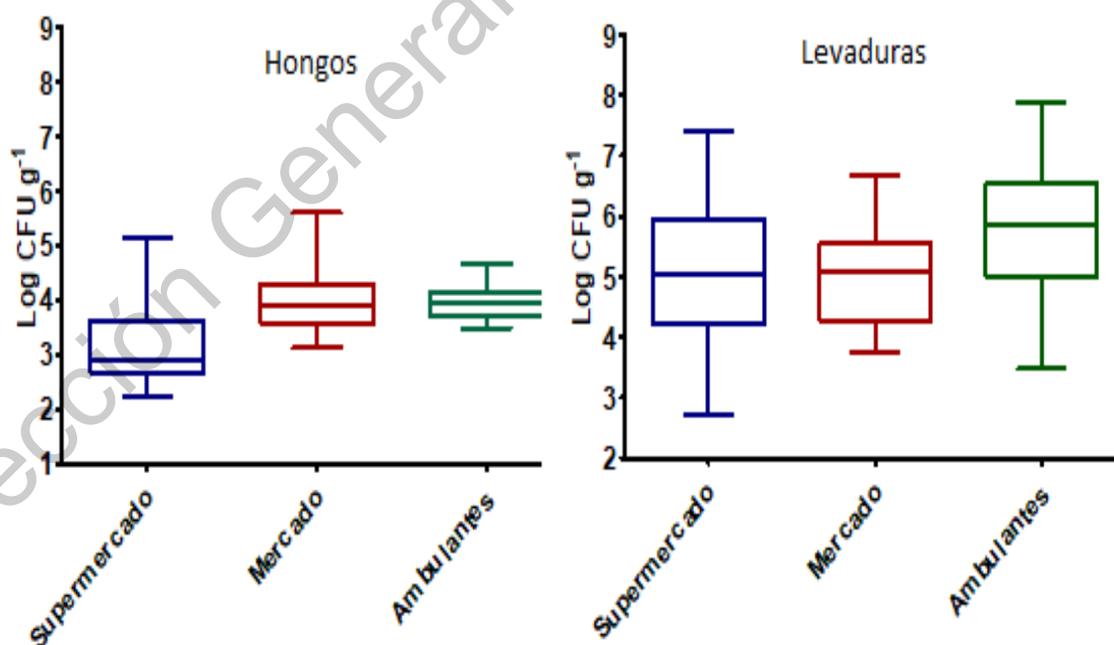


Figura 12. Contenido de hongos y levaduras en piña mínimamente procesada en función del tipo de establecimiento de expedición

Los valores de coliformes totales fueron mayores en las muestras de puestos ambulantes respecto a las muestras de supermercados (Tabla 7). Neetoo *et al.* (2019) reportaron <1 Log UFC g^{-1} de coliformes totales en piña mínimamente procesada cultivar 'Reina Victoria', es decir, valores por debajo del límite de cuantificación de la técnica de vaciado en placa empleada.

Cifras elevadas de coliformes totales en alimentos procesados sugieren malas prácticas de elaboración así como contaminación durante su producción así como la forma de obtención de la materia prima, que en caso de un producto mínimamente procesado hay muchas etapas donde se puede llevar a cabo la contaminación (Abadias *et al.*, 2008).

En todas las muestras se detectó la presencia de coliformes fecales y su contenido fue variable (de 0.8 a 3.36 Log NMP g^{-1}) (Tabla 7, Figura 13). Las muestras más contaminadas fueron las que se adquirieron en puestos ambulantes, lo que claramente refleja una mayor exposición a fuentes de contaminación.

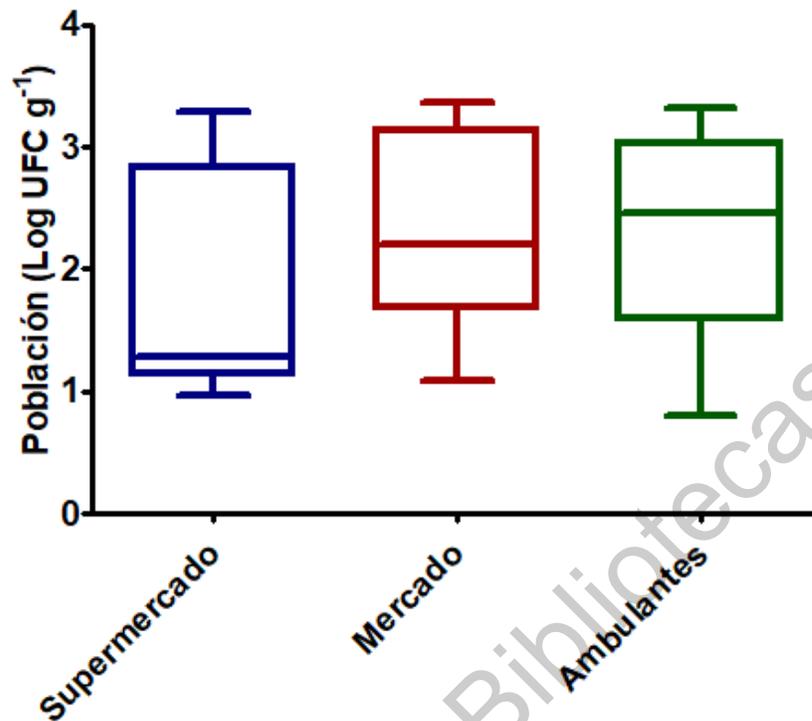


Figura 13. Contenido de coliformes fecales en piña mínimamente procesada en función del tipo de establecimiento de expedición

En relación a *E. coli*, el indicador por excelencia de contaminación fecal en los alimentos, la mayor incidencia se encontró en puestos ambulantes (Tabla 8). Cabe destacar que en los tres sitios de muestreo se aisló al menos una muestra positiva.

Tabla 8. Contenido de *E.coli* en piña mínimamente procesada en diferentes puntos de muestreo.

Lugar	<i>E. coli</i> %(+/n) ¹	Log NMP g ^{-1 2}
Supermercados	3.5% (2/57)	<0.80b (0.77-0.80)
Mercados	9% (3/33)	2.93a (1.75-2.99)

Ambulantes	10% (5/5)	3.25a (2.40-3.36)
------------	--------------	----------------------

¹ Porcentaje de positividad (número de muestras positivas/número de muestras analizadas)

² Mediana (límite superior-límite inferior)

² El límite de detección de la técnica fue 0.80 Log NMP g⁻¹

Los valores seguidos de letras iguales en la misma columna indica que no existen diferencias según la prueba de Wilcoxon (p<0.05)

La presencia de estos microorganismos evidencia deficiencias en los procesos de desinfección, ya que se observa que conforme aumenta el grado de tecnificación del establecimiento disminuye el conteo. *E. coli* es un indicador de materia fecal cuyo origen puede ser las personas que manipulan el producto así como contaminación por fauna nociva como las moscas.

VII.2 Incidencia de microorganismos patógenos

La incidencia de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* se muestra en la Tabla 9. *L. monocytogenes* se detectó en los tres sitios de muestreo, mientras que *Salmonella* únicamente en los mercados y puestos ambulantes.

Tabla 9. Incidencia de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* en piña mínimamente procesada en diferentes puntos de muestreos.

Lugar	<i>Salmonella</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>
	% (+/n) ¹	
Supermercados	0%	33.3%
	(0/33)	(10/33)
Mercados	8.8%	8.8%
	(5/57)	(5/57)
Ambulantes	18%	2%
	(9/50)	(1/50)

¹Porcentaje de positividad (número de muestras positivas/ número de muestras analizadas).

La mayor incidencia de *Salmonella* spp. se encontró en muestras obtenidas de puestos ambulantes (18 %), mientras que no se detectó en supermercado, lo que evidencia claramente que las condiciones de almacenamiento y venta influyen en el nivel de exposición a la contaminación de origen fecal, ya que son los puestos ambulantes y mercados en donde la piña mínimamente procesada es vendida en condiciones higiénicas cuestionables y a temperatura ambiente que puede propiciar el crecimiento de *Salmonella* spp. En los supermercados la piña generalmente se comercializa sobre camas de hielo o bien el producto se mantiene en refrigeración.

La mayor incidencia de *L. monocytogenes* se encontró en los supermercados (33.3%) lo que puede estar asociado con el carácter psicrótrofo del microorganismo. En los productos mínimamente procesados aumenta la cuenta de microorganismos psicrótrofos, como *L. monocytogenes* cuando no se almacena el producto a temperatura apropiada por un periodo largo (Graça *et al.*, 2017).

Cabe destacar que todas las cepas aisladas, tanto de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* se confirmaron por PCR (Anexo 2 y Anexo 3).

Este escenario donde en los puestos ambulantes y mercados públicos se encontró la mayor incidencia de microorganismos patógenos es de especial interés ya que según un estudio de la PROFECO, de las personas que compran alimentos preparados o bebidas fuera del hogar 43 % consumen en puestos móviles, como puestos ambulantes, y 7 % en mercados públicos. Además, 19.5% de la población mexicana consume alimentos preparados en la calle para el desayuno o colación el 21.1% compra fruta fresca picada (Profeco, 2013), por lo que el porcentaje de la población en riesgo de enfermar es considerable.

Salmonella spp. y *L. monocytogenes* han sido los principales microorganismos patógenos asociados al consumo de piña registrándose varios brotes en el mundo. Sin embargo, la información sobre su incidencia es escasa.

Respecto a los alimentos mínimamente procesados; Montero *et al.* (2008) realizaron muestreos de fruta mínimamente procesada (manzana, piña, naranja y mango) en la ciudad de Lleida, España durante un año sin detectarse *Salmonella* o *L. monocytogenes*.

VII.3 Comportamiento de patógenos vs subrogados.

Como etapa inicial para la evaluación de los métodos de desinfección en piña mínimamente procesada, se procedió a verificar que los subrogados elegidos (*E. faecium* y *L. innocua*) se comportaran de manera similar que los patógenos en la matriz de interés. La razón de usar microorganismos subrogados en el estudio fue debido a que el equipo en donde se aplicaron los tratamientos de desinfección con calentamiento óhmico no se encontraba dentro de las instalaciones del LECRIMA y, por tanto, por cuestiones de seguridad no se usaron microorganismos patógenos para evitar correr riesgos de contaminación.

VII.3.1 Comportamiento en medio de cultivo

Como se mencionó previamente, *E. faecium* es un subrogado de *S. enterica* que ha sido ampliamente usado en la industria en procesos térmicos pero la información de su uso en productos frescos es limitado. Por lo tanto, se verificó el comportamiento del subrogado y del patógeno en CST a pH 3.5, 4.0 y 4.5 incubados a 25 y 35°C.

Tanto *S. enterica* como *E. faecium* tuvieron comportamientos similares en todas las combinaciones de pH y temperatura de incubación sin encontrarse diferencias significativas ($p \leq 0.05$) (Figura 14). Independientemente de la temperatura de incubación, a pH 3.50 y 4.00 se observa un periodo de aproximadamente 12 h en donde la población permaneció estable para finalmente empezar a decrecer hasta 4 Log UFC g⁻¹ a las 24 h. Este fenómeno concuerda con Ita *et al.*, (1991) quienes reportaron que *S. enterica* puede mantenerse estable por 24 h en CST suplementado con levadura y acidificado con ácido cítrico a pH 3.50.

En contraste a pH 4.50, se observa que las poblaciones permanecen estables y luego desarrollan hasta aumentar 2 y 3 Log UFC g⁻¹ a 35°C y 25°C, respectivamente, para finalmente declinar.

La fase de adaptación de *Salmonella* en caldo infusión de cerebro corazón a pH más cercanos a 6.5 es más corta y también depende de la fase en que se encuentre la célula ya que en la fase exponencial requiere un pH 5.5 para empezar la adaptación, sin embargo en la fase estacionaria las células son naturalmente resistentes (Driscoll *et al.*, 1996).

Independientemente del pH y/o la temperatura, el destino final de ambos microorganismos es la muerte como se puede empezar a ver en la tendencia de la Figura 14. Los ácidos orgánicos como ácido acético, láctico y cítrico tienen un efecto tóxico sobre *Salmonella* causando un efecto letal (Cotter *et al.*, 2001). Esta inhibición puede ser mediante dos mecanismos: una acidificación intracelular en general y el efecto específico del ácido no disociado en las actividades metabólicas (Ita *et al.*, 1991).

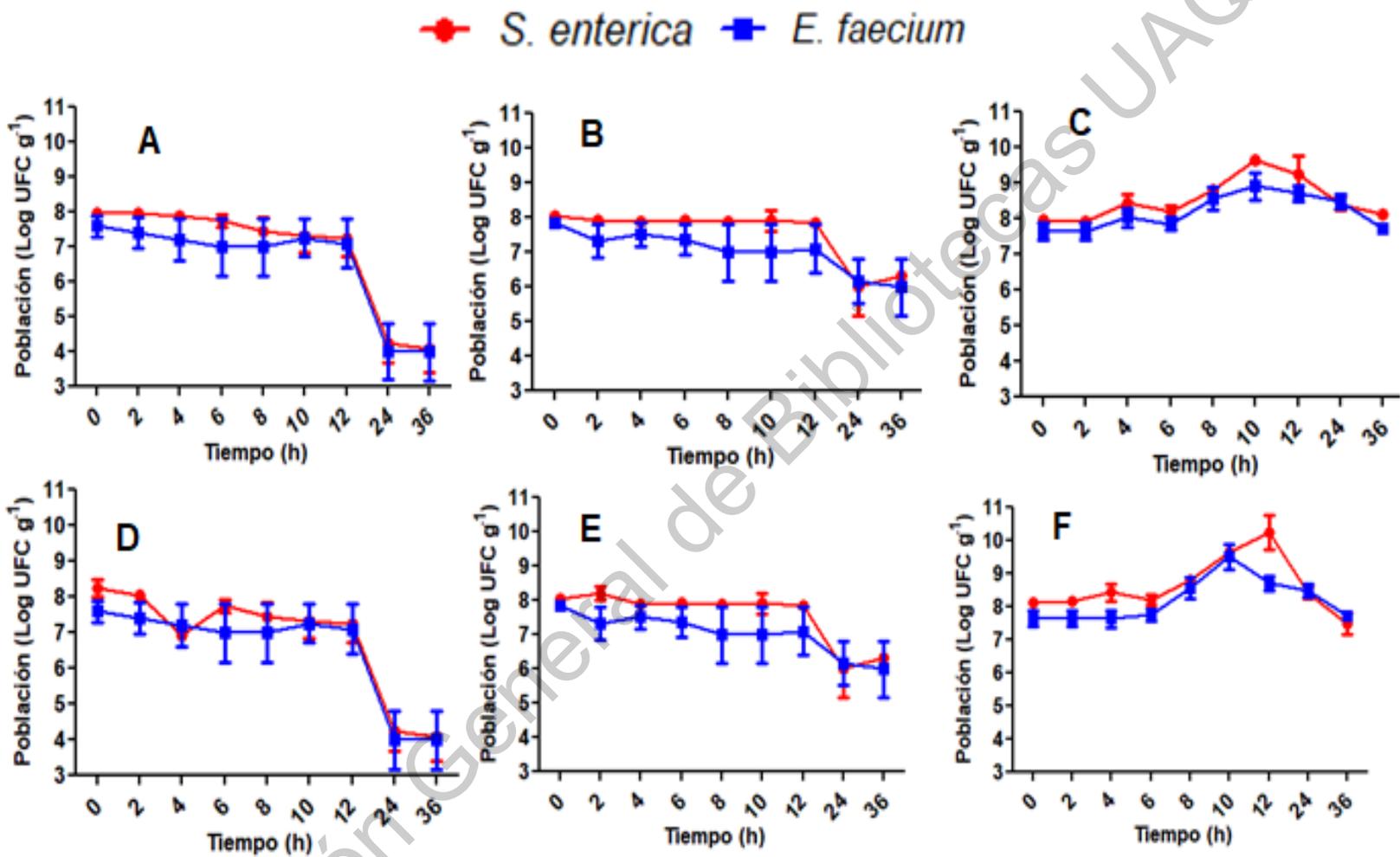


Figura 14. Comportamiento de *S. enterica* y *E. faecium* en caldo soya tripticaseíana. A: 25°C pH 3.5, B: 25°C pH 4.0, C: 25°C pH 4.5, D: 35°C pH 3.5, E: 35°C pH 4.0 y F: 35°C y pH 4.5.

L. innocua ha sido ampliamente usado como subrogado de *L. monocytogenes* en la industria alimentos frescos (lechuga, fresa cortada, etc.) y fermentados (salchichas). Mohan *et al.* (2019) evaluaron en caldo el comportamiento de 9 cepas de *L. innocua* y 11 cepas de *L. monocytogenes* y no encontraron diferencias significativas entre el patógeno y el subrogado. Es por eso que se realizó la validación directamente en la piña mínimamente procesada sin hacerse la validación en el caldo

VII.3.2 Comportamiento en la piña

Una vez verificado que el comportamiento de los microorganismos subrogados y los patógenos fue similar al de los patógenos correspondientes en CST a pH bajos, se procedió a verificar el comportamiento en la matriz de interés. Los sólidos solubles de las piñas utilizadas oscilaron entre 12 y 14 °Brix y el pH entre 3.7 y 3.9.

En la Figura 15 se observa que *S. enterica* y su subrogado (*E. faecium*) son capaces de desarrollar en la piña mínimamente procesada, mostrando comportamientos muy similares a través del tiempo ($p \geq 0.05$). En ambos casos se tiene un tiempo de adaptación de aproximadamente 10 h, para después iniciar con la fase de desarrollo.

E. faecium ha sido empleado ampliamente como subrogado de *S. enterica* en validación de tratamientos térmicos en productos como almendras y harinas. Chen *et al.* (2019) observaron comportamientos similares entre el patógeno y el subrogado en polvo de chocolate; sin embargo, la información de su uso en frutas frescas hasta el momento es limitado siendo este trabajo uno de los primero en usar *E. faecium* como subrogado en un producto mínimamente procesado.

El comportamiento de *S. enterica* en la piña ha sido previamente estudiado por varios autores. Strawn *et al.*, (2010) no encontraron crecimiento de *S. enterica* en piñas frescas cortadas, inoculadas y almacenadas a 5 °C manteniéndose estables por seis días para finalmente declinar. Este comportamiento fue similar cuando la piña se almacenó a 13 °C y 25 °C.

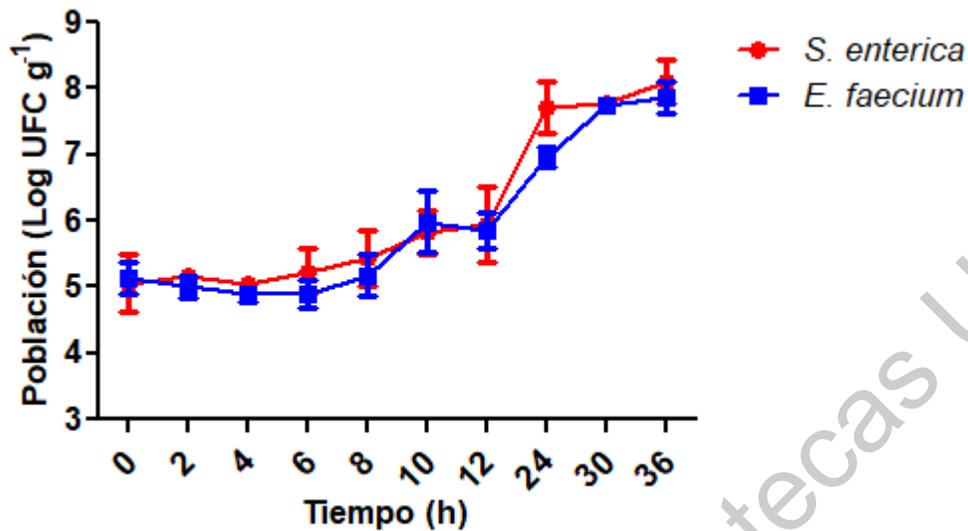


Figura 15. Desarrollo de *S. enterica* y *E. faecium* en piña mínimamente procesada almacenada a 35°C.

La temperatura de almacenamiento es un factor extrínseco que juega un gran papel en el crecimiento. Temperaturas de refrigeración inhiben el crecimiento de patógenos sin embargo, almacenamientos a temperaturas de entre 13 y 25°C estimulan el crecimiento de *Salmonella* (Feng *et al.*, 2015).

Beteseb *et al.* (2001) reportaron el crecimiento de *S. Typhimurium* y *S. Choleraesuis* en jugo de piña con un pH 3.8 duplicando su concentración en 24 h a temperatura ambiente y en manzana mínimamente procesada incubada a 25 °C la población de *L. monocytogenes* aumento de 1 a 4 Log (Salazar *et al.*, 2016).

La supervivencia de microorganismos patógenos en frutas mínimamente procesadas depende de las capacidades metabólicas las cuales están influenciadas por factores intrínsecos y extrínsecos. La piña posee nutrientes (cuantificados como sólidos solubles) y Aa adecuados para el crecimiento de *Salmonella* y *L. monocytogenes* sin embargo el pH de la piña, menor a cuatro, es una limitante para su crecimiento así como la composición de la piña con un alto contenido de fibra que limita su obtención de azúcares simples (Feng *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que *S. Typhimurium* muestra dos etapas de respuesta a bajos pH. Durante la fase Log se puede presentar la respuesta de tolerancia al ácido (ATR) incluyendo una etapa de choque pre-ácido en las que las células están expuestas a un pH medio (5.8) que induce la ATR de un sistema de homeostasis. Este sistema de homeostasis dependiente del pH es un proceso en el cual la célula mantiene un pH intracelular constante a pesar del pH externo. Su fundamento es la modulación primaria de la bomba de protones así como los sistemas de transporte de sodio y potasio. Esta homeostasis funciona normalmente en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas. La segunda etapa de choque pos-ácido ocurre cuando las células están en un pH menor a 4.5 e incluye la activación de más de 40 proteínas de choque ácido (ASPs). Algunas de estas ASPs son esenciales para el desarrollo de la resistencia a ambientes ácidos. De igual manera se sabe que las células en fase estacionaria exhiben un ATR mayor del ATR de la fase logarítmica y la resistencia al estrés general es dependiente de la expresión de RpoS de las células al encontrarse en la fase estacionaria (Foster *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1994).

L. monocytogenes presentó el mismo comportamiento que su subrogado (*L. innocua*) al través del tiempo (Figura 16). Se observó un descenso en la población tras seis h de incubación y a partir de ese momento se inició un crecimiento acelerado hasta llegar a 7 Log UFC g⁻¹ después de 36 h. Se ha reportado que *Listeria* tiene una adaptación de aproximadamente 3 a 4 h en ambientes ácidos; sin embargo, en la piña se pudo haber alargado debido a las limitantes de nutrientes como azúcares para finalmente empezar su desarrollo con ayuda de sus múltiples mecanismos como la ATR y la modificación de la composición de su membrana (Phan-thanh *et al.*, 2000).

L. monocytogenes es reconocido por no ser ácido tolerante sin embargo, se ha observado su sobrevivencia en jugo de naranja a 4 °C y que cultivos en fase estacionaria son más resistentes al ácido. En otro estudio *L. monocytogenes* inoculada en piña fresca cortada se presentó una disminución discreta a bajas temperaturas y a temperatura ambiente la disminución fue mayor (Feng *et al.*, 2015).

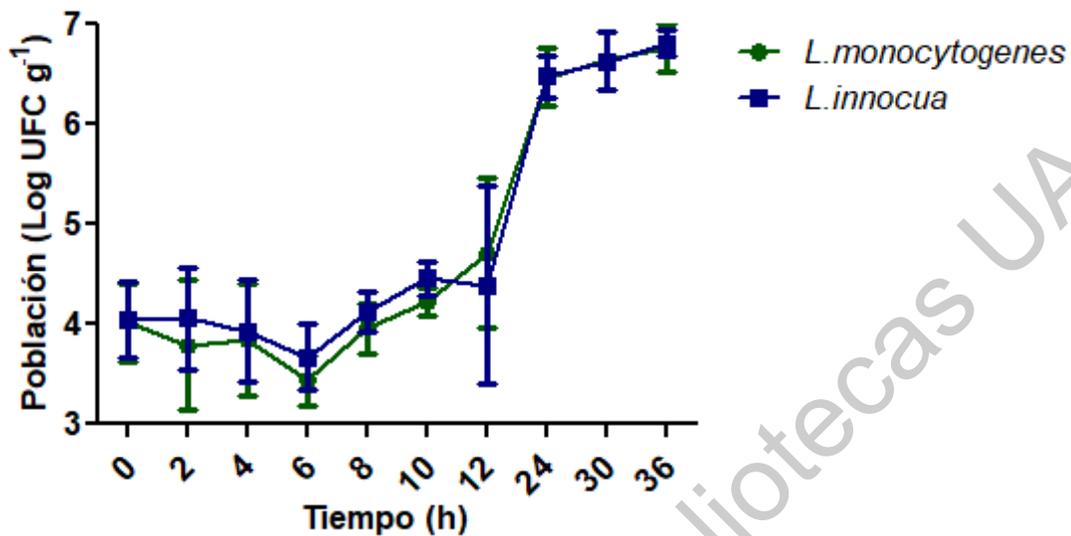


Figura 16. Desarrollo de *L. monocytogenes* y *L. innocua* en piña mínimamente procesada almacenada a 35 °C.

De igual manera se sabe que su exposición a bajos pH previa a contaminar alimentos lo puede llevar a una supervivencia en alimentos con un pH bajo y que podría estar relacionado con las alteraciones en la composición o en las funciones de la membrana citoplasmática (Kroll *et al.*, 1992). Alteraciones en los perfiles de los ácidos grasos de la membrana incrementan la resistencia térmica de las células de *L. monocytogenes* en caldo cerebro-corazón a diferentes pH ajustados con ácido láctico o acético lo cual puede ser una respuesta por la síntesis de proteínas de estrés pudiendo estar relacionado con el factor sigma (Juneja *et al.*, 1998).

Otra teoría para explicar este fenómeno es la respuesta de tolerancia al ácido (ATR). La efectividad de esta respuesta para ser crítica dependiendo de dos factores, el primero el pH durante la fase adaptativa y a la duración de la fase adaptativa. Las células a un pH 4.0 inducen una mayor respuesta pero siempre relacionado con la síntesis de nuevas proteínas (Davis *et al.*, 1996), en el estudio realizado la adaptación a pH 4.0 fue de aproximadamente 4 horas.

Investigaciones posteriores demostraron que *L. monocytogenes* posee un sistema ácido resistente GAD (ácido glutamato decarboxilasa) incorporado en un sistema con dos enzimas GAD, su mecanismo consiste en la conversión del glutamato internalizado a γ -aminobutirato mediante la adición de un protón dando como resultado el incremento del pH citoplasmático. El producto de la reacción, γ -aminobutirato, es intercambiado por otro glutamato mediante el transportador de membrana GadC (Cotter *et al.*, 2001)

En todos los casos, a pesar de tener mecanismos para poder sobrevivir en el medio, el resultado final es una inactivación ya sea por la permanente exposición a pH bajo, se ha reportado que el ácido cítrico de la piña puede actuar como inhibidor de patógenos (Feng *et al.*, 2015) o que los patógenos pueden ser inhibidos por otros microorganismos ya que la microbiota natural ha sido reconocida como ser capaz de impedir el crecimiento de algunos patógenos en la forma de producción de compuestos antimicrobianos o de competición (Graça *et al.*, 2017).

VII.4 Tratamiento de desinfección química

Una vez que se validó que el comportamiento de los patógenos y sus respectivos subrogados en la piña mínimamente procesada era similar, se procedió a aplicar el tratamiento de desinfección con compuestos químicos para corroborar su similitud respecto a un tratamiento. Debido a que este tratamiento de desinfección se realizó en las instalaciones de LECRIMA, se decidió aplicar los desinfectantes a ambos tipos de microorganismos.

El hipoclorito de sodio (50 y 200 ppm) y el desinfectante a base de cítricos (0.1 y 0.2 %) resultaron fueron los desinfectantes más efectivos para reducir las poblaciones de *Salmonella* y *E. faecium* en relación al tratamiento control ($p \leq 0.05$) (Figura 17). Sin embargo, ninguno de los desinfectantes logró la reducción mínima recomendada por la FDA de 5 Log, el efecto del desinfectante es muy baja si consideramos que el agua, que era un control de arrastre, tuvo un efecto importante sobre las reducciones. La efectividad de los desinfectantes puede estar disminuida por la presencia de materia orgánica, pH, etc.

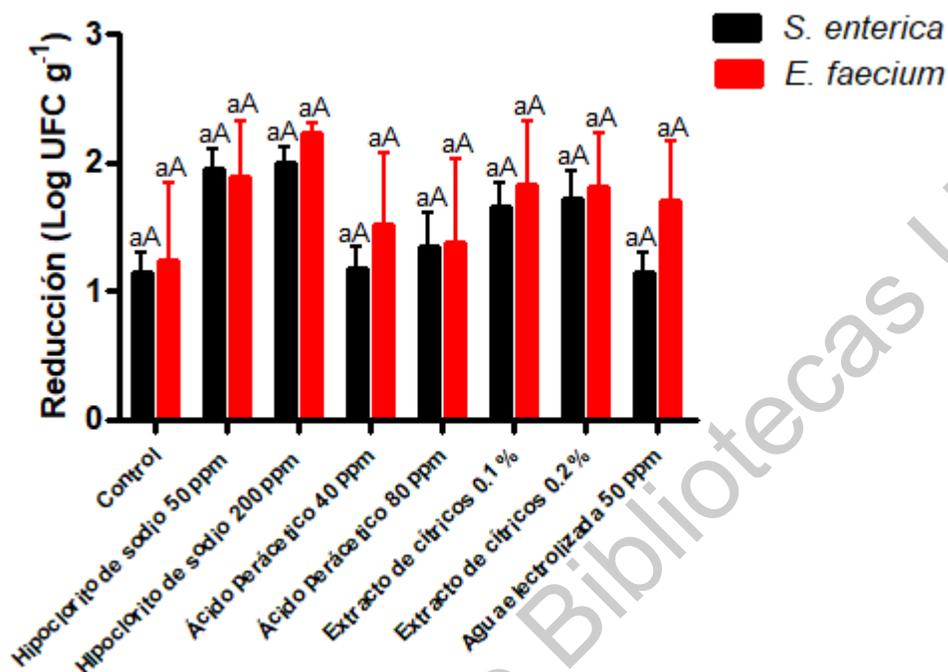


Figura 17. Reducción de *S. enterica* y *E. faecium* en piña mínimamente procesada sometida a tratamientos de desinfección química.

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre el uso del patógeno y el subrogado. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias ($p \leq 0.05$) entre desinfectantes y concentraciones.

Un aspecto importante de destacar es que las reducciones de *S. enterica* obtenidas con los distintos desinfectantes fueron estadísticamente iguales a las logradas sobre el subrogado *E. faecium*, si bien se tienen desviaciones elevadas. Estos resultados confirman que el *E. faecium* ser utilizado como sustituto del patógeno en experimentos de desinfección de piña mínimamente procesada.

El uso de *E. faecium* como subrogado en procesos de desinfección es muy reciente, Hylton *et al.* (2019) lo emplearon como subrogado en semillas de lino y chía en desinfección con etanol y ácido peracético logrando reducciones de 3 Log UFC g⁻¹ sin encontrar diferencias significativas con *Salmonella*. En otros productos

mínimamente procesados, como zanahorias cortadas se han observados reducciones de solo 2 Log UFC g⁻¹ concordando sensiblemente con nuestros resultados (Ruiz-Cruz *et al.*, 2007).

Las reducciones obtenidas en la desinfección de *L. monocytogenes* y su subrogado (*L. innocua*) fueron menores a los 5 Log UFC g⁻¹ por lo que no se puede considerar la desinfección como un proceso efectivo (Figura 18).

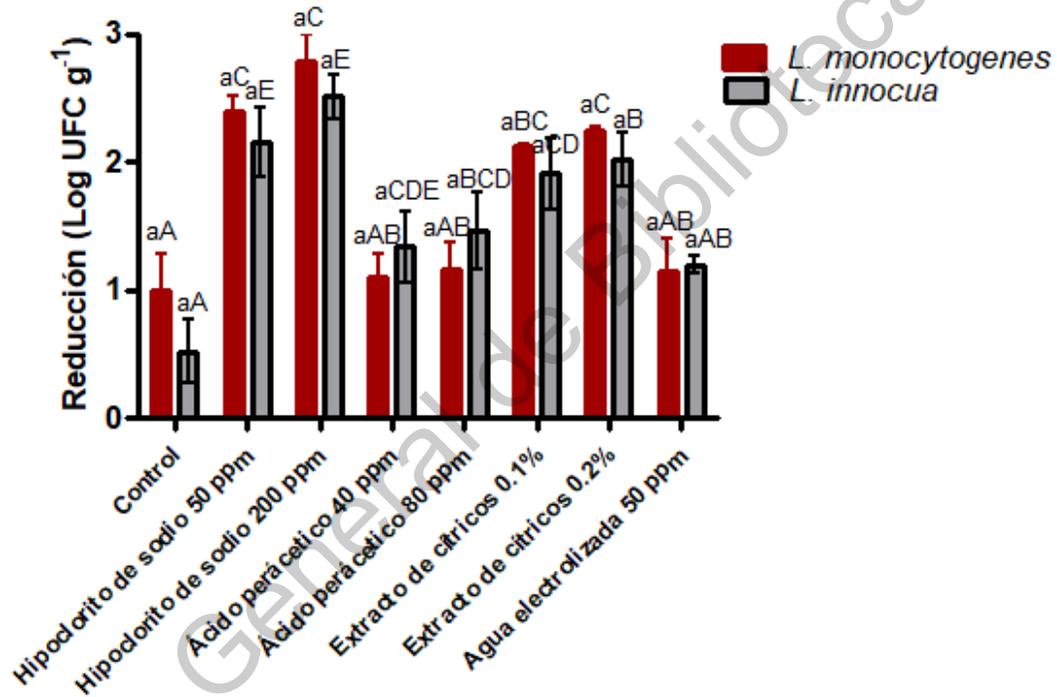


Figura 18. Reducción de *L. monocytogenes* y *L. innocua* en piña mínimamente procesada sometida a tratamientos de desinfección química.

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre el uso del patógeno y el subrogado. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias ($p \leq 0.05$) entre desinfectantes y concentraciones.

En los estudios realizados con *L. monocytogenes* y *L. innocua* tampoco se observaron diferencias significativas entre el patógeno y el subrogado ($p \leq 0.05$), si bien se presentan elevadas desviaciones. Estos resultados confirman que *L. innocua*

puede ser un subrogado adecuado en procesos de desinfección en piña mínimamente procesada (Figura 18). Por otra parte, se encontraron diferencias significativas entre los desinfectantes siendo el hipoclorito de sodio y el extracto de cítricos lo que presentaron las mayores reducciones microbianas a las concentraciones empleadas. Kim *et al.* (2018) realizaron desinfección en manzana cortada logrando reducciones máximas de 2 Log UFC g⁻¹ concordando con nuestros resultados.

Para ambos tipos de microorganismos, *Salmonella* y *L. monocytogenes*, el hipoclorito de sodio fue el desinfectante más efectivo pero sin llegar a los 5 Log UFC de reducción sugeridos por FDA. El mecanismo de acción de este desinfectante se basa en la desestabilización de la membrana celular llevando a la inhibición de síntesis de proteínas, oxidación de RNA y proteínas. Su actividad antimicrobiana está estrictamente relacionada con la cantidad de cloro libre presente, el pH, la temperatura y la presencia de material orgánico en la superficie (De Corato, 2019). En el caso de la piña mínimamente procesada se encontraba con mucha materia orgánica que interfirió en el resultado final.

Otro desinfectante con resultados interesantes fue el del extracto de cítricos, cuyo principal compuesto activos son los ácidos orgánicos, aceites esenciales y compuestos fenólicos. Como ya se comentó el ácido cítrico, láctico, ascórbico, acético, etc., poseen una actividad antimicrobiana y son reconocidos como GRAS, es decir se pueden agregar con libertad en los alimentos. Estos mecanismos anti microbianos están referidos a la reducción del pH y al rompimiento de la membrana (De Corato, 2019).

Los desinfectantes ácido peracético y agua electrolizada mostraron reducciones similares que las del agua (control). El agua electrolizada neutra contiene ácido hipocloroso, cloro y ozono cuyo mecanismo es un gran potencial oxido-reducción en la membrana celular dependiente al pH. El ácido peracético no es corrosivo y no es afectado por la presencia de materia orgánica, su mecanismo

se basa en la oxidación de la membrana celular causando además la oxidación de proteínas, enzimas, ADN, etc. (De Corato, 2019).

VII.4.1 Efecto de los desinfectantes sobre las variables físicas y químicas de la piña

Se realizó la medición de los cambios en la piña mínimamente procesada después de la aplicación de los tratamientos de desinfección química en las variables físicas y químicas de interés: sólidos solubles, Aa, pH, ácidos titulables, el cambio total de color (ΔE) y dureza (Tabla 10). El control se refiere a una muestra de piña sin tratamiento

Tabla 10. Efecto de la desinfección química en las variables físicas y químicas de la piña mínimamente procesada.

	Sólidos solubles (°Brix)	Aa	pH	ácido cítrico (mg g ⁻¹)	ΔE	Dureza (N)
Control	12.15 ± 1.17 ^{a1}	0.982 ± 0.008 ^a	3.65 ± 0.24 ^a	0.245 ± 0.081 ^a		85.70 ± 9.39 ^a
Agua	10.52 ± 1.26 ^a	0.982 ± 0.012 ^a	3.66 ± 0.18 ^a	0.327 ± 0.038 ^a	1.55 ± 0.88	75.43 ± 6.73 ^a
Hipoclorito de sodio (50 ppm)	9.47 ± 0.41 ^b	0.973 ± 0.009 ^a	3.77 ± 0.08 ^a	0.324 ± 0.036 ^a	13.11 ± 1.88	81.98 ± 6.35 ^a
Hipoclorito de sodio (200 ppm)	10.05 ± 0.11 ^b	0.970 ± 0.015 ^a	3.74 ± 0.010 ^a	0.349 ± 0.027 ^b	13.84 ± 2.25	65.93 ± 5.55 ^b
Ácido peracético (40 ppm)	10.03 ± 0.92 ^b	0.990 ± 0.007 ^a	3.69 ± 0.15 ^a	0.375 ± 0.051 ^b	12.65 ± 3.25	79.77 ± 8.79 ^a
Ácido peracético (80 ppm)	9.73 ± 0.69 ^b	0.988 ± 0.005 ^a	3.70 ± 0.13 ^a	0.375 ± 0.073 ^b	12.44 ± 3.91	64.25 ± 6.15 ^b
Extracto de cítricos (0.1%)	10.72 ± 1.59 ^a	0.985 ± 0.007 ^a	3.63 ± 0.19 ^a	0.401 ± 0.068 ^b	8.95 ± 1.61	74.02 ± 8.86 ^a
Extracto de cítricos (0.2%)	11.17 ± 1.64 ^a	0.965 ± 0.013 ^a	3.66 ± 0.18 ^a	0.361 ± 0.027 ^b	9.71 ± 1.40	71.71 ± 5.32 ^b
Agua Electrolizada (25 ppm)	11.05 ± 0.53 ^a	0.985 ± 0.005 ^a	3.77 ± 0.02 ^a	0.369 ± 0.013 ^b	10.09 ± 2.45	79.03 ± 9.51 ^a

¹ Promedio de nueve mediciones. Dentro de las columnas los valores seguidos de la misma letra indica que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) por prueba de Tukey.

De manera general se puede observar un descenso en los sólidos solubles en todos los tratamientos, que puede atribuirse a que se solubilizan los azúcares al

agregar un líquido que contacta a la piña, y esto a su vez genera un leve aumento en la acidez titulable expresada como ácido cítrico (Tabla 10). El cambio es más notorio cuando se aplicó el desinfectante de extractos de cítricos, ya que uno de sus ingredientes es precisamente el ácido cítrico. La Aa y el pH prácticamente se mantuvieron sin cambios en los tratamientos.

El desinfectante con la mayor reducción de patógenos y subrogados, el hipoclorito de sodio, resultó ser el tratamiento que más cambios generó en la piña mínimamente procesada. Cabe señalar que si bien, el desinfectante de extractos de cítricos no alcanzó la reducción de 5 Log UFC, el efecto desinfectante fue similar al observado con el hipoclorito de sodio y, además, provoca menos cambios en la matriz de interés y su aplicación y manejo es más sencillo.

La diferencia total de color (ΔE) indica que valores mayores de 5 representan un cambio especialmente evidente contra un control, por lo que se deduce que todos los tratamientos desinfectantes que se aplicaron a la piña generan cambios que serían previsible al consumidor. La dureza de igual manera disminuye en todos los tratamientos de desinfección cambio que es evidente desde el control de agua debido los mecanismos de acción, donde la mayoría se basan en la oxidación de la membrana.

VII.5 Tratamiento óhmico

La siguiente etapa fue la aplicación del calentamiento óhmico como alternativa a la desinfección química de la piña. Debido a que los tratamientos se aplicaron en el CICATA, únicamente se midió el efecto sobre los subrogados *E. faecium* y *L. innocua* para evitar riesgos de contaminación.

VII.5.1 Tratamiento convencional

Para poder elegir las temperaturas y tiempos a aplicar en el calentamiento óhmico, se generaron curvas de temperatura simulando un calentamiento convencional para observar el efecto del calor sobre el fruto. En primer lugar, se realizó la verificación del funcionamiento de los termopares a utilizar comparándolos

con un termopar electrónico calibrado sin encontrarse diferencias significativas (datos no mostrados).

El tratamiento convencional se aplicó en una celda de vidrio de 2 L con agitación constante a las temperaturas de 55, 60, 65, 70 y 75°C durante 1, 2 y 3 min y se cuantificó el cambio en las variables de color, sólidos solubles y dureza. El tiempo promedio para alcanzar la temperatura fue de 20 min y una vez alcanzada la temperatura se añadieron las rebanadas de piña y se contó el tiempo de tratamiento.

Se observó mucho error debido a la variabilidad al comparar todas las piñas (desviación estándar) en los datos de mediciones que se realizaron a 55 y 75°C así como en el tiempo de 3 min de calentamiento (Figura 19, Tabla 11).

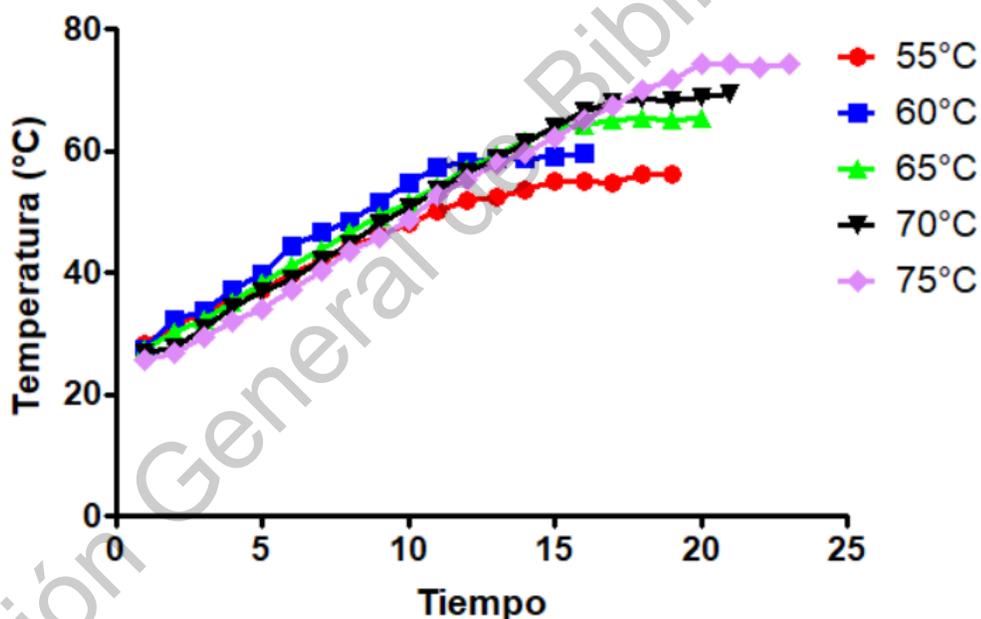


Figura 19. Curvas de temperatura para tratamiento de calentamiento convencional aplicado a rebanadas de piña mínimamente procesada.

Tabla 11. Cambio en las variables físicas y químicas de la piña mínimamente procesada por la aplicación de calentamiento convencional.

Tratamiento	ΔE	Sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix)	Dureza (N)
Control		8.97 ± 0.047 ^{a1}	64.31 ± 5.66 ^a
60 $^{\circ}$ C/ 1 min	7.74 ± 0.59	8.20 ± 0.00 ^b	64.72 ± 5.95 ^a
60 $^{\circ}$ C/ 2 min	7.86 ± 1.68	7.23 ± 0.047 ^d	64.93 ± 3.39 ^a
65 $^{\circ}$ C/ 1 min	4.67 ± 1.19	8.00 ± 0.000 ^c	65.89 ± 4.27 ^a
65 $^{\circ}$ C/ 2 min	6.10 ± 1.60	8.00 ± 0.000 ^c	69.21 ± 2.74 ^a
70 $^{\circ}$ C/ 1 min	6.34 ± 2.49	7.03 ± 0.047 ^e	64.08 ± 2.83 ^a
70 $^{\circ}$ C/ 2 min	8.19 ± 2.94	7.20 ± 0.000 ^d	100.84 ± 11.00 ^b

¹Promedio de 9 mediciones. Dentro de las columnas los valores seguidos de la misma letra indica que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) por la prueba de Tukey.

La aplicación del calentamiento convencional sobre la piña mínimamente procesada generó, al igual que el tratamiento de desinfección, cambios en las variables de interés. En todos los casos, la diferencia total de color ($8.19 - 4.67$) mostró valores superiores a 5, aunque el incremento observado no es tan grande como el obtenido en la desinfección química. En relación a los sólidos solubles, hubo una disminución en relación al control, que fue más drástica conforme aumentaba la temperatura y el tiempo de exposición; por ejemplo, a 70°C por 1 min se tuvo una reducción de casi 1.5°Brix de sólidos solubles respecto al control.

Para evaluar el efecto del calentamiento convencional sobre *E. faecium* y *L. innocua*, se inoculó piña mínimamente procesada y se aplicó la temperatura más alta propuesta (70°C) durante 1, 2 y 3 min y se calculó la reducción en las poblaciones de los microorganismos (Figura 20). A mayor tiempo de tratamiento mayor fue el efecto letal; sin embargo, la máxima reducción lograda fue de 1.35 ± 0.07 Log UFC g^{-1} para *E. faecium* y 1.65 ± 0.12 Log UFC g^{-1} para *L. innocua* en el tratamiento de 70°C y 3 min (Figura 20).

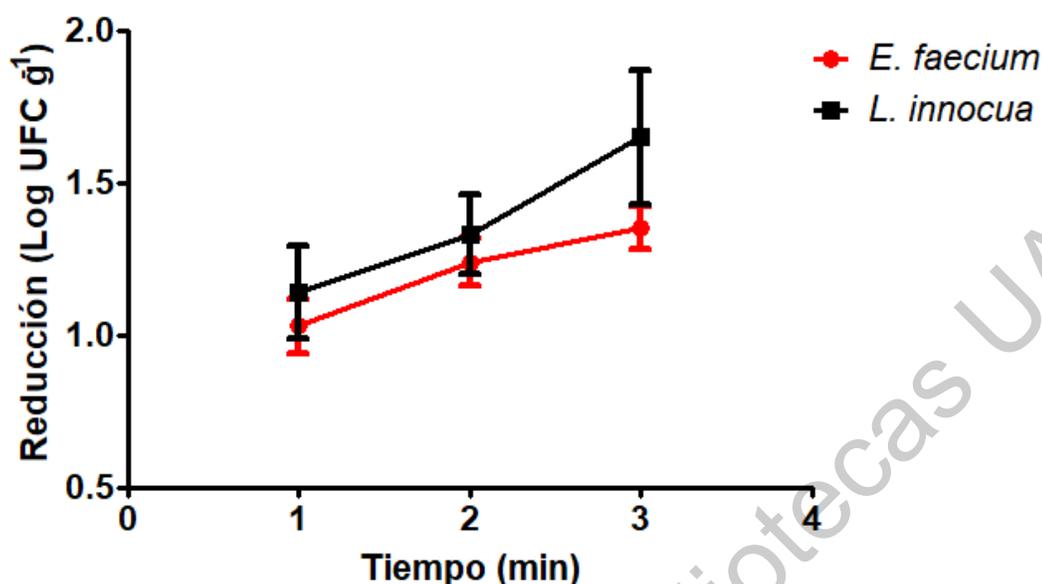


Figura 20. Reducción en las poblaciones de los microorganismos subrogados por la aplicación del tratamiento de calentamiento convencional (70°C) en piña mínimamente procesada.

Numerosos métodos de preservación de alimentos han sido desarrollados para extender la vida de anaquel e inhibir el crecimiento de patógenos como *Salmonella* y *L. monocytogenes*. Los tratamientos térmicos son considerados como uno de los métodos más efectivos para eliminar patógenos en productos alimenticios como el pollo, carne de res y huevos. Sin embargo, en productos frescos como las frutas las reducciones bajas observadas concuerdan con las encontradas en este trabajo (Jarvis *et al.*, 2016).

El efecto del calentamiento sobre frutas ya ha sido evaluado. La aplicación de un tratamiento térmico de 97°C por 60 s en melón entero logró una reducción de 3 Log UFC g⁻¹ de *Salmonella* sin embargo al cortar el melón se recuperó *Salmonella* de la fruta picada. Cambios como disminución de la dureza y oscurecimiento en la pulpa del melón fueron también reportados (Jarvis *et al.*, 2016). Tratamientos térmicos sobre tomates han sido igualmente inefectivos al solo disminuir < 2 Log UFC después del calentamiento a 60°C por 2 min (Delaquis *et al.*, 2007).

También se han reportado cambios en otras variables físicas y químicas como la disminución de concentración de azúcares en fruta fresca como papaya; si bien las altas temperaturas llevan a la inactivación de enzimas causantes del oscurecimiento, se ha observado que la aplicación de calor puede cambiar la retención de color ya que se afecta el sistema de co-pigmentación en litchi. La co-pigmentación es el fenómeno por medio del cual hace que el color de las antocianinas sea más intenso, brillante y estable debido a la interacción entre sustancias orgánicas y las antocianinas. Las altas temperaturas degradan estas antocianinas pertenecientes a este sistema (Sivakumar *et al.*, 2013).

Aunque en este trabajo no se usaron células estresadas, se sabe que la exposición a pH ácidos puede inducir otras respuestas de estrés incluyendo la resistencia al estrés térmico, que se atribuye a cambios en la membrana, específicamente a que los ácidos grasos de 15 carbonos disminuyen mientras que los ácidos grasos de 17 carbonos aumentan (Juneja *et al.*, 1998).

VII.5.2 Calentamiento óhmico

Un tratamiento térmico convencional está caracterizado por una baja tasa de penetración, mientras que el tratamiento óhmico permite una distribución del calor más rápida y uniforme (Guida *et al.*, 2013). En la Figura 21 se puede observar las curvas de calentamiento de la piña a un gradiente de voltaje de 15 y 20 V cm⁻¹, estos valores fueron elegidos debido a su rápida capacidad de calentamiento considerando el volumen de la celda del equipo y el volumen de agua a emplear.

El calentamiento óhmico es más rápido que el calentamiento convencional con agua ya que tardó en promedio 10 min en alcanzar la temperatura deseada. Datos que son acordes con el hecho de que un tratamiento térmico convencional se caracteriza por una baja tasa de penetración.

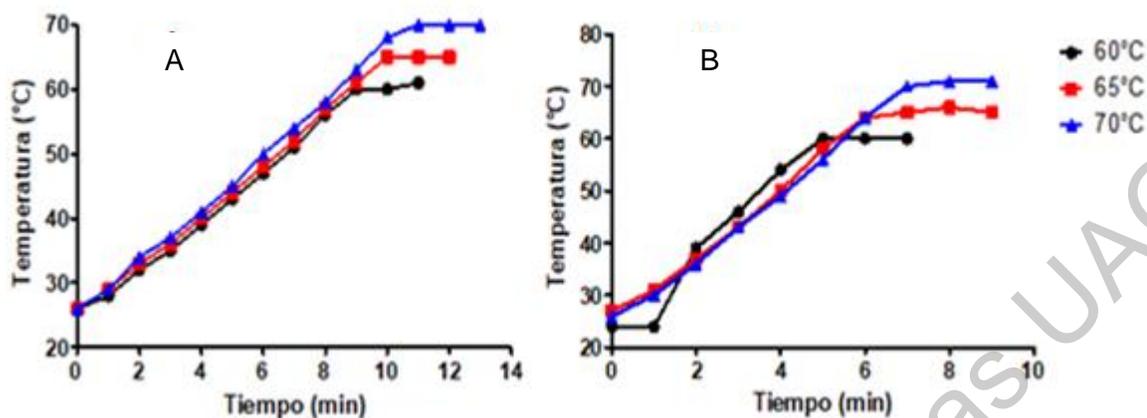


Figura 21. Curvas de calentamiento óhmico en piña mínimamente procesada
A) 15 V cm⁻¹, B) 20 V cm⁻¹.

Estas curvas presentan un ajuste que se realizó a la conductividad eléctrica para mantener constante el amperaje a 2.70 A, para hacer posible la uniformidad de la distribución del calor en el tratamiento. La diferencia de temperatura entre el agua de tratamiento y el interior de la rebanada sumergida fue menos de un 1°C durante el tratamiento.

VII.5.2.1 Cambios en las variables físicas y químicas por la aplicación del calentamiento óhmico.

Al igual que con el calentamiento convencional, se cuantificó el cambio en las variables físicas y químicas ocasionado para el calentamiento óhmico. Adicionalmente se realizó un análisis de perfil de textura a las piñas tratadas.

En relación a los cambios en las variables físicas y químicas, se observó que los cambios en los sólidos solubles, específicamente la reducción, fueron menores y dependientes del tiempo de tratamiento, en comparación con los efectos causados por la desinfección química y el calentamiento convencional (Tabla 12). Los tratamientos de 1 min presentaron valores similares al control ($p < 0.05$), mientras que en los tratamientos por 2 min si se observó una disminución en los sólidos totales. A 20 V cm⁻¹, 65 y 70°C por un 1 min, los sólidos solubles tuvieron un valor de alrededor de 11° Brix similares al control.

La diferencia total de color mostró valores por arriba de 5 en todos los tratamientos. Se observó una relación entre el tiempo y el voltaje, ya que a menor tiempo de exposición y mayor voltaje, el ΔE disminuyó; por ejemplo, para el tratamiento de 20 V cm⁻¹ a 65°C y 1 min la diferencia total de color fue de 5.75, el valor más bajo obtenido en todos los tratamientos de desinfección aplicados. De manera general se sabe que los tratamientos térmicos convencionales aumentan el oscurecimiento de los productos frescos mientras que el tratamiento óhmico aumentan la luminosidad del producto presentando una apariencia más fresca (Guida *et al.*, 2013).

Tabla 12. Cambios en los sólidos solubles y la diferencia total de color en piña mínimamente procesada por calentamiento óhmico.

Tratamiento	Sólidos solubles (°Brix)	ΔE
Control	11.01 ± 0.45 ^{a1}	
	15 V cm ⁻¹	
60 °C/ 1 min	10.77 ± 0.42 ^a	8.12 ± 0.95
60 °C/ 2 min	9.85 ± 0.29 ^c	8.59 ± 0.49
65 °C/ 1 min	10.80 ± 0.69 ^a	7.84 ± 0.26
65 °C/ 2 min	9.90 ± 0.77 ^c	8.69 ± 0.67
70 °C/ 1 min	11.37 ± 0.44 ^a	7.83 ± 0.46
70 °C/ 2 min	9.83 ± 0.18 ^c	8.22 ± 0.41
	20 V cm ⁻¹	
60 °C/ 1 min	9.35 ± 1.05 ^c	6.58 ± 0.29
60 °C/ 2 min	9.75 ± 0.64 ^c	8.37 ± 0.25
65 °C/ 1 min	11.38 ± 1.02 ^a	5.75 ± 0.15
65 °C/ 2 min	9.12 ± 0.22 ^c	7.39 ± 0.69
70 °C/ 1 min	11.37 ± 0.65 ^a	6.95 ± 0.58
70 °C/ 2 min	10.03 ± 0.47 ^b	10.64 ± 1.87

¹Promedio de 9 mediciones. Dentro de las columnas los valores seguidos de la misma letra indica que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) por la prueba de Tukey.

Tabla 13. Análisis de perfil de textura de la piña mínimamente procesada por la aplicación del tratamiento óhmico.

Tratamiento	Dureza (N) (1ra compresión)	Adhesividad (mJ)	Resiliencia	Fracturabilidad (N)
Control	121.42 ± 6.93 ^a	1.10 ± 0.08 ^b	0.07 ± 0.005 ^a	120.78 ± 6.94 ^{ab}
15 V cm ⁻¹				
60 °C/ 1 min	111.58 ± 1.45 ^b	1.02 ± 0.04 ^b	0.09 ± 0.006 ^a	133.70 ± 1.69 ^a
60 °C/ 2 min	133.70 ± 1.69 ^a	1.70 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.003 ^c	111.58 ± 1.45 ^b
65 °C/ 1 min	93.86 ± 6.80 ^c	0.72 ± 0.02 ^d	0.08 ± 0.006 ^a	114.26 ± 1.70 ^b
65 °C/ 2 min	114.85 ± 1.18 ^b	1.70 ± 0.01 ^a	0.07 ± 0.002 ^b	93.86 ± 6.80 ^d
70 °C/ 1 min	104.20 ± 1.16 ^c	1.18 ± 0.07 ^b	0.06 ± 0.002 ^c	113.30 ± 3.72 ^b
70 °C/ 2 min	114.46 ± 2.93 ^b	1.38 ± 0.04 ^b	0.06 ± 0.003 ^c	104.20 ± 1.16 ^b
20 V cm ⁻¹				
60 °C/ 1 min	83.04 ± 2.12 ^d	0.80 ± 0.06 ^c	0.07 ± 0.05 ^b	117.87 ± 9.92 ^{ab}
60 °C/ 2 min	104.57 ± 3.26 ^c	1.92 ± 0.48	0.04 ± 0.02 ^c	103.84 ± 3.93 ^b
65 °C/ 1 min	119.51 ± 7.98 ^a	0.93 ± 0.05 ^c	0.09 ± 0.04 ^a	102.36 ± 6.57 ^c
65 °C/ 2 min	121.84 ± 4.20 ^a	1.02 ± 0.04 ^b	0.07 ± 0.05 ^b	82.38 ± 2.60 ^d
70 °C/ 1 min	102.43 ± 6.65 ^c	0.85 ± 0.05 ^c	0.07 ± 0.04 ^b	122.48 ± 4.47 ^{ab}
70 °C/ 2 min	122.48 ± 4.47 ^a	1.42 ± 0.08 ^a	0.06 ± 0.03 ^b	119.51 ± 7.98 ^{ab}

¹Promedio de 9 mediciones. Dentro de las columnas los valores seguidos de la misma letra indica que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) por la prueba de Tukey (Continua en la próxima página).

Tabla 14. Análisis de perfil de textura de la piña mínimamente procesada por la aplicación del tratamiento óhmico (continuación).

Tratamiento	Dureza (N) (2da compresión)	Cohesividad	Elasticidad (mm)	Gomosidad (N)	Masticabilidad (mJ)	Índice de masticabilidad (N)
Control	66.29 ± 2.18 ^b	0.13 ± 0.03 ^c	5.86 ± 4.21 ^c	15.38 ± 0.26 ^d	93.15 ± 6.43 ^d	10.32 ± 0.40 ^c
15 V cm ⁻¹						
60 °C/ 1 min	79.90 ± 1.04 ^a	0.16 ± 0.02 ^b	6.64 ± 1.56 ^{bc}	16.75 ± 0.00 ^c	126.88 ± 4.72 ^b	16.95 ± 1.56 ^a
60 °C/ 2 min	65.65 ± 3.60 ^c	0.17 ± 0.03 ^{ab}	5.90 ± 1.19 ^c	20.78 ± 0.95 ^{ab}	116.31 ± 2.74 ^b	12.76 ± 0.97 ^b
65 °C/ 1 min	75.12 ± 1.05 ^a	0.17 ± 0.01 ^{ab}	6.78 ± 0.54 ^b	15.81 ± 0.86 ^d	140.38 ± 3.29 ^a	17.05 ± 0.82 ^a
65 °C/ 2 min	54.16 ± 1.44 ^d	0.18 ± 0.02 ^a	4.90 ± 1.90 ^d	20.73 ± 0.69 ^{ab}	93.23 ± 9.87 ^d	11.61 ± 0.64 ^c
70 °C/ 1 min	75.12 ± 3.51 ^a	0.15 ± 0.02 ^c	9.34 ± 4.70 ^a	17.90 ± 0.51 ^c	157.33 ± 9.81 ^a	13.78 ± 0.18 ^b
70 °C/ 2 min	60.99 ± 8.69 ^c	0.18 ± 0.03 ^{ab}	5.84 ± 2.20 ^c	15.79 ± 0.62 ^d	101.33 ± 6.65 ^d	12.05 ± 0.74 ^b
20 V cm ⁻¹						
60 °C/ 1 min	73.77 ± 5.47 ^a	0.15 ± 0.02 ^c	7.60 ± 3.54 ^b	17.32 ± 0.59 ^c	133.58 ± 2.21 ^b	12.89 ± 0.25 ^b
60 °C/ 2 min	54.88 ± 1.11 ^d	0.15 ± 0.02 ^c	4.70 ± 1.63 ^d	15.12 ± 0.64 ^d	80.30 ± 3.84 ^e	11.28 ± 0.29 ^c
65 °C/ 1 min	71.33 ± 5.13 ^{ab}	0.18 ± 0.03 ^a	6.50 ± 0.46 ^{bc}	19.48 ± 0.21 ^b	127.90 ± 6.76 ^b	15.05 ± 0.31 ^{ab}
65 °C/ 2 min	53.53 ± 3.14 ^d	0.19 ± 0.02 ^a	5.67 ± 1.26 ^c	14.63 ± 0.02 ^d	87.48 ± 6.76 ^e	10.74 ± 0.31 ^c
70 °C/ 1 min	74.62 ± 0.38 ^a	0.16 ± 0.03 ^c	7.90 ± 3.96 ^b	23.41 ± 0.25 ^a	136.02 ± 5.66 ^b	17.59 ± 0.72 ^a
70 °C/ 2 min	67.38 ± 2.72 ^b	0.20 ± 0.01 ^a	5.06 ± 1.79 ^d	18.42 ± 0.80 ^b	103.98 ± 6.07 ^c	13.92 ± 0.63 ^b

Misma letra en columnas indica que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) por prueba de Tukey

En relación a los cambios en las variables físicas y químicas, se observó que los cambios en los sólidos solubles, específicamente la reducción, fueron menores y dependientes del tiempo de tratamiento, en comparación con los efectos causados por la desinfección química y el calentamiento convencional (Tabla 12).

La diferencia total de color mostró valores por arriba de 5 (inclusive de 8) en todos los tratamientos. Se observó una relación entre el tiempo y el voltaje, ya que a menor tiempo de exposición y mayor voltaje, el ΔE disminuyó; por ejemplo, para el tratamiento de 20 V cm⁻¹ a 65°C y 1 min la diferencia total de color fue de 5.75, el valor más bajo obtenido en todos los tratamientos de desinfección aplicados. De manera general se sabe que los tratamientos térmicos convencionales aumentan el oscurecimiento de los productos frescos mientras que el tratamiento óhmico aumentan la luminosidad del producto presentando una apariencia más fresca (Guida *et al.*, 2013).

Los tratamientos de 1 min presentaron valores similares al control ($p < 0.05$), mientras que en los tratamientos por 2 min si se observó una disminución en los sólidos totales. A 20 V cm⁻¹, 65 y 70°C por un 1 min, los sólidos solubles tuvieron un valor de alrededor de 11° Brix similares al control.

La textura es una de los principales variables de aceptación del consumidor, el análisis de perfil de textura (APT) es el método más usado debido que simula el proceso de masticación. Durante un APT se miden varios atributos como:

- Dureza: fuerza necesaria para lograr una deformación determinada
- Adhesividad: fuerza de atracción física entre diferentes materiales
- Resiliencia: contra mayor es la resiliencia, más capacidad tiene el alimento de volver a su forma original. Tiene que ser 1 o menor, no puede ser superior porque no puede aumentar a su forma original.
- Fracturabilidad: la tendencia de un material a romperse después de una leve deformación.
- Cohesividad: resistencia de un material a una segunda deformación con relación a una primera deformación.

- Elasticidad: la tendencia de un objeto a regresar a su forma original antes de la deformación,
- Gomosidad: fuerza necesaria para desintegrar una muestra de alimento semi-sólida a un estado tal que facilite su ingesta.
- Masticabilidad: medida de la energía requerida para masticar un alimento sólido hasta el punto adecuado para la deglución.

(Peleg, 2019)

Las curvas obtenidas por el TPA, con las variables previamente enlistados, realizado en las muestras de piña mínimamente procesada tratadas con calentamiento óhmico mostraron múltiples máximos conforme la sonda avanzaba para la primera compresión antes de alcanzar el máximo (dureza) (Tabla 13 y Tabla 14). Esto puede ser explicado por la estructura no uniforme de la piña fresca (Montero-Calderón *et al.*, 2008).

Durante un tratamiento de calentamiento óhmico pasa corriente eléctrica a través del alimento, al material del alimento actúa como un resistor y su temperatura aumenta conforme al efecto Joule. El incremento de la temperatura puede afectar las micro y macroestructuras y resultar en fenómenos de migración de humedad, gelatinización y desnaturalización de las proteínas. También se ha observado que estos efectos negativos sobre la matriz alimentaria dependen del propósito de la aplicación, por ejemplo, cuando la aplicación del calentamiento óhmico es con fines de escalado y esterilización los cambios en textura son mínimos, inclusive estudios en coliflor revelan que el calentamiento óhmico puede mejorar las propiedades de textura (Pasha *et al.*, 2014).

Según los resultados de APT en cubos de manzana tratados con calentamiento óhmico, la dureza se mantuvo o aumento levemente lo que podría estar relacionado con la lixiviación de la célula y la deshidratación de los cubos de manzana, lo cual concuerda con lo encontrado en la piña mínimamente procesada que conforme aumentaba el voltaje la dureza aumento aproximadamente 10 N. La fracturabilidad y resiliencia mantuvieron el mismo comportamiento de aumentar

conforme aumentaba el voltaje y el tiempo lo cual concuerda con el aumento de la dureza (Pasha *et al.*, 2014). La gomosidad disminuyó conforme aumentaba el voltaje y la masticabilidad se mantuvo constante durante los tratamientos.

En los tratamientos aplicados en la piña mínimamente procesada en orden de mantener una intensidad constante se preparaba un solución de agua destilada con agua de remojo de piña en la cual podría encontrarse ácido cítrico el cual puede aumentar la conductividad y aumentar los cambios en la estructura de la piña (Gavahian *et al.*, 2019). Es importante mantener la intensidad constante ya que suele aumentar conforme el tiempo.

VII.5.2.2 Efecto antimicrobiano del calentamiento óhmico en piña mínimamente procesada.

La evaluación del efecto del calentamiento óhmico en la descontaminación de la piña se realizó a 65°C durante 1 y 2 min a 15 y 20 V cm⁻¹ ya que en estas condiciones se presentaron los ΔE más bajos y no se generaron cambios significativos en el contenido de sólidos solubles ni en la dureza del producto.

Las reducciones logradas por la aplicación del calentamiento óhmico fueron considerablemente mayores que las obtenidas por el tratamiento de desinfección química y tratamiento térmico convencional (Figura 22). Independientemente del tiempo, la aplicación del calentamiento a 20 V cm⁻¹ causó una reducción similar en las poblaciones de *E. faecium* y *L. innocua* ($p \leq 0.05$) que oscilaron entre 2.79 a 4.72 Log UFC g⁻¹ para *E. faecium* y 2.80 a 5.00 Log UFC g⁻¹ para *L. innocua*. Cuando se aplicaron los tratamientos a un voltaje de 15 V cm⁻¹, el efecto antimicrobiano disminuyó considerablemente.

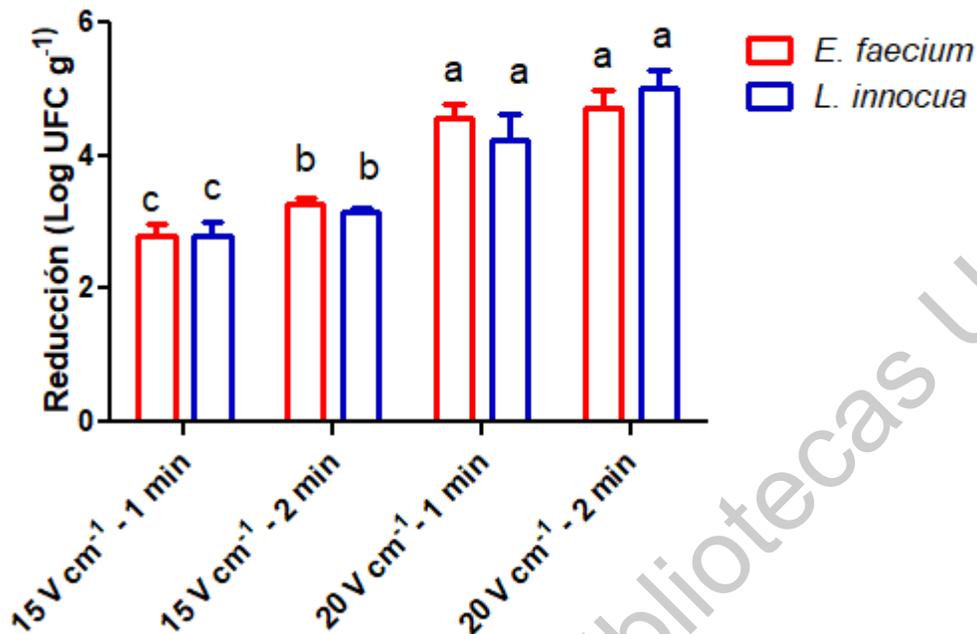


Figura 22. Reducción de *E. faecium* y *L. innocua* por la aplicación de calentamiento óhmico en piña mínimamente procesada.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) según la prueba de Tukey

Debido a las altas cuentas de hongos y levaduras encontradas durante los muestreos realizados y a la importancia de estos en el deterioro de la piña, también se cuantificó la reducción de hongos y levaduras como consecuencia de la aplicación del calentamiento óhmico. La máxima reducción de hongos (2.33 ± 0.18 Log UFC g⁻¹) y levaduras (2.41 ± 0.25 Log UFC g⁻¹) se observó cuando se aplicó el tratamiento a 20 V cm^{-1} , 65°C por 2 min (Figura 23).

El calentamiento óhmico es una tecnología conocida desde principios del siglo XX que desafortunadamente encontró limitaciones para su aplicación en la industria alimentaria debido a los requerimientos de energía y a la preocupación del contacto entre el alimento y los electrodos. Sin embargo, recientemente se han desarrollado diversos materiales que permiten el uso de esta tecnología ya que optimizan el uso de la energía. Los electrodos empleados en la celda eran de acero

inoxidable los cuales se monitorearon en busca de oxidación de los mismos. Las primeras aplicaciones del calentamiento óhmico se realizaron en alimentos líquidos como jugos (Shirsat *et al.*, 2004).

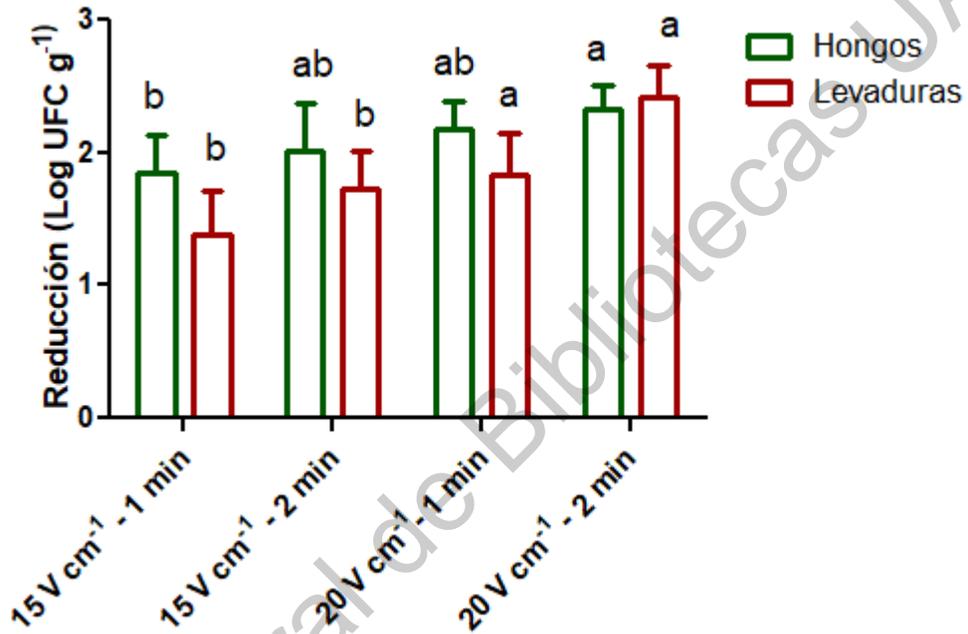


Figura 23. Reducción de hongos y levaduras por la aplicación de calentamiento óhmico en piña mínimamente procesada.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) según la prueba de Tukey

El calentamiento óhmico permite incrementar la temperatura de un alimento a una velocidad muy rápida bajo ciertas condiciones que permite aplicar tratamientos a alta temperatura por tiempos cortos, como en el caso de la aplicación realizada en la piña mínimamente procesada en donde los tratamientos fueron efectivos a partir del minuto del tratamiento.

Al aplicar calentamiento óhmico en un alimento sólido, el tamaño de la muestra se vuelve muy relevante y una limitante ya que se ha observado que en

casos donde la concentración de partículas es muy alta, esas mismas partículas de baja conductividad pueden calentarse más rápido que el fluido circundante. Este fenómeno ocurre porque, con el aumento de la concentración de partículas la ruta de la corriente eléctrica a través del fluido se vuelve menos tortuosa, lo que obliga a un mayor porcentaje de la corriente fluir a través de las partículas. Esto puede dar como resultado mayores tasas de generación de energía dentro de las partículas, y en consecuencia, una mayor tasa relativa de calentamiento de partículas. Es por esto que durante la aplicación se mantuvo constante la conductividad eléctrica y se eligió como tamaño una rebanada de piña mantener constante la resistencia de las partículas a partir de la concentración de partículas en el fluido.

Esta misma corriente eléctrica que pasa por el alimento es la responsable de la inactivación de los microorganismos; hasta el momento no se han reportado cepas con resistencia al calentamiento óhmico. Esta inactivación es atribuida principalmente al fenómeno de la electroporación, que se define como la formación de poros en la membrana celular por consecuencia de la exposición al campo eléctrico lo cual lleva a una permeabilidad de la membrana y la difusión del material intracelular (Knirsch *et al.*, 2010). Como ya se mencionó, la principal aplicación del calentamiento óhmico es en líquidos como en salsa de tomate en donde se han obtenido reducciones de 2.82 ± 0.09 UFC g⁻¹ de *E. coli*, 3.64 ± 0.25 UFC g⁻¹ de *S. Typhimurium* y 3.41 ± 0.93 Log UFC g⁻¹ de *L. monocytogenes* (Kim *et al.*, 2016). En jugo de manzana se reportaron reducciones de 5.30, 6.85 y 3.06 Log UFC mL⁻¹ de *E. coli*, *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*, respectivamente (Park *et al.*, 2013).

Al igual que con el calentamiento convencional, se cuantificó el cambio en las variables físicas y químicas ocasionado para el calentamiento óhmico. Adicionalmente se realizó un análisis de perfil de textura a las piñas tratadas (Tabla 15).

Tabla 15. Cambio en la actividad de agua, pH y acidez total titulable en piña mínimamente procesada tratada con calentamiento óhmico.

Tratamientos	Aa	pH	Acidez titulable (mg g ⁻¹ ácido cítrico)
Control	0.983 ± 0.012 ^a	3.73 ± 0.03 ^a	0.377 ± 0.069 ^a
15 V cm ⁻¹ – 1 min	0.984 ± 0.009 ^a	3.76 ± 0.09 ^a	0.413 ± 0.060 ^a
15 V cm ⁻¹ – 2 min	0.956 ± 0.020 ^a	3.80 ± 0.10 ^a	0.361 ± 0.027 ^a
20 V cm ⁻¹ – 1 min	0.940 ± 0.018 ^a	3.64 ± 0.05 ^a	0.411 ± 0.057 ^a
300 V – 2 min	0.953 ± 0.012 ^a	3.82 ± 0.08 ^a	0.435 ± 0.069 ^b

Dentro de las columnas letras diferentes indican que no existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) según la prueba de Tukey

La aplicación del calentamiento óhmico no modificó los valores de Aa y pH, y la acidez total titulable aumentó conforme aumentó el voltaje y el tiempo de tratamiento. El incremento en la acidez es acorde al aumento en los valores de sólidos solubles que se mostraron previamente (Tabla 12); conforme disminuye los sólidos solubles totales aumenta la acidez total titulable y ligeramente el pH.

Sin embargo, el calentamiento óhmico presenta algunas limitaciones, una de ellas, como se menciona es el tamaño de la muestra prefiriéndose tamaños mayores a 3 cm para mejorar la transferencia de calor entre el sólido y el líquido. Sin embargo, una de las principales desventajas es el alto voltaje requerido que dificulta su escalamiento a nivel industrial.

Siendo que el tratamiento de 20 V cm⁻¹, 65°C por 1 min no presenta diferencias significativas ($p \geq 0.05$) con su análogo a 2 min en la reducción de subrogados, hongos y levaduras, y tampoco afecta las propiedades físicas y químicas, se eligió como el mejor tratamiento para evaluar la vida de anaquel de la piña mínimamente procesada.

VII.6 Vida de anaquel

La evaluación de la vida de anaquel de la piña mínimamente procesada se realizó a dos temperaturas de refrigeración 4 y 10°C. Durante el almacenamiento se observaron los cambios en la dureza, sólidos solubles y diferencia total de color como variables de calidad; y bacterias mesófilas aerobias, enterobacterias, bacterias ácido lácticas, hongos y levaduras como indicadores de deterioro y de calidad microbiana.

Durante el almacenamiento por 21 días de la piña tratada o no con calentamiento óhmico (20 V cm^{-1} , 65°C y 1 min) la textura disminuyó independientemente de la temperatura de almacenamiento (Figura 24). Sin embargo, la piña tratada con calentamiento óhmico y almacenada a 4°C fue estadísticamente diferente ($p \leq 0.05$) a los demás tratamientos llegando al final de la evaluación a $73.99 \pm 0.32 \text{ N}$ a diferencia de la piña almacenada sin tratar y almacenada a 10°C que disminuyó hasta $62.80 \pm 0.22 \text{ N}$.

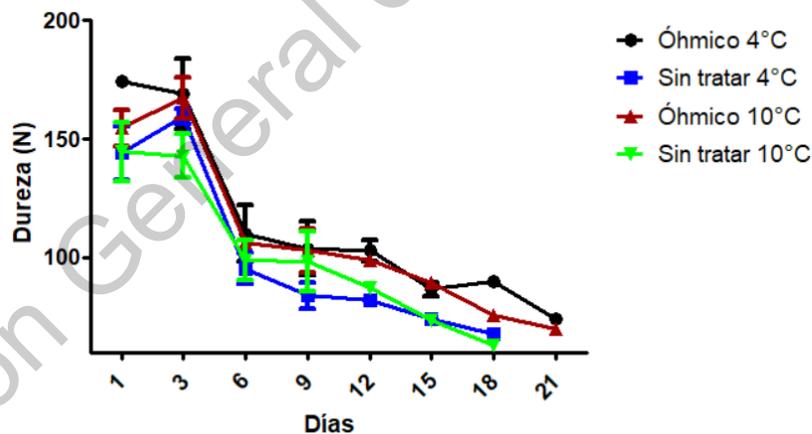


Figura 24. Efecto del calentamiento óhmico sobre la textura de la piña mínimamente procesada almacenada a 4 y 10°C.

Los sólidos solubles también tuvieron un decremento durante el almacenamiento mostrando una reducción considerable de aproximadamente 6 °Brix de sólidos solubles (Figura 25). Los sólidos solubles en la piña tratada con

calentamiento óhmico no se modificaron durante los primeros tres primeros días de almacenamiento, y posteriormente disminuyeron. La piña sometida al tratamiento con calentamiento óhmico y almacenado a 4°C fue la que mostró las menores pérdidas en los sólidos solubles ($p \leq 0.05$).

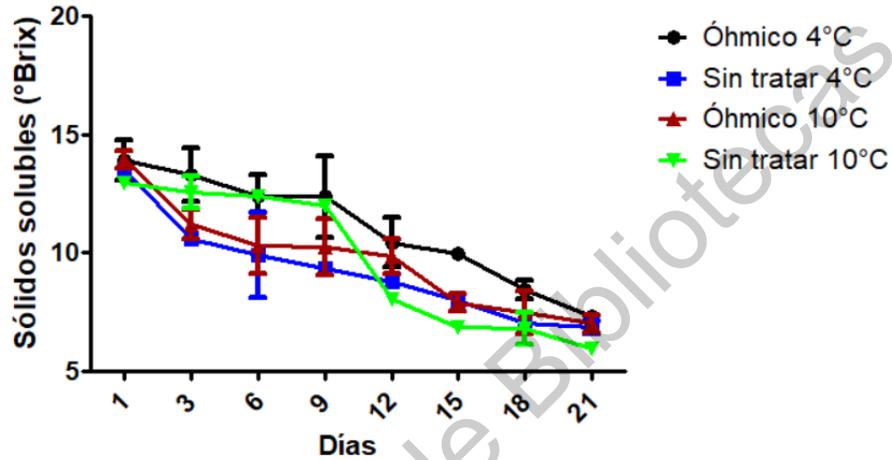


Figura 25. Efecto del calentamiento óhmico sobre el contenido de sólidos solubles de la piña mínimamente procesada almacenada a 4 y 10°C.

La diferencia de color fue especialmente grande en todos los tratamientos después de 18 días alcanzando valores de 10; sin embargo, la diferencia de color en las piñas tratadas con calentamiento óhmico fue 2 puntos menos que el control sin tratar (Figura 26)

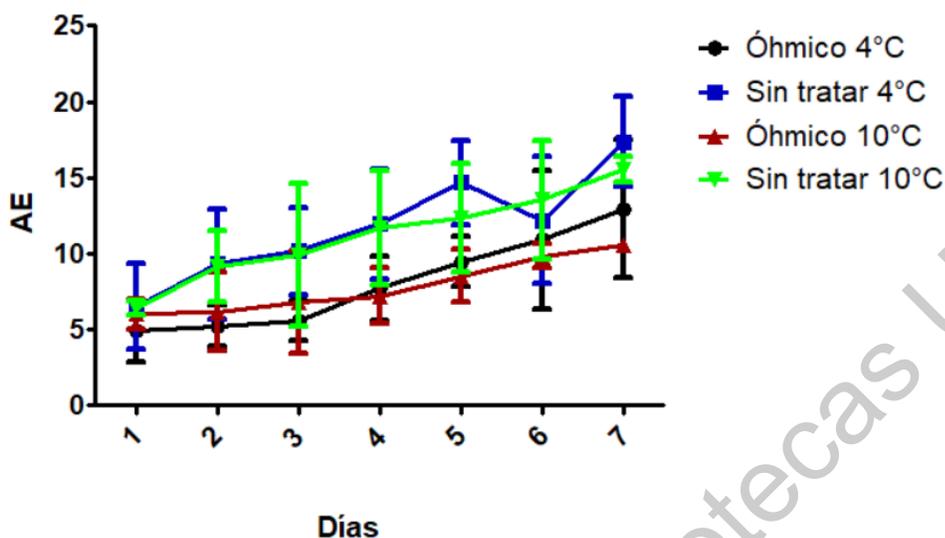


Figura 26. Efecto del calentamiento óhmico sobre la diferencia total de color (ΔE) de la piña mínimamente procesada almacenada a 4 y 10°C.

Las poblaciones de BMA, enterobacterias y bacterias ácido lácticas se incrementaron durante el almacenamiento a 4°C (Tabla 16) y 10 °C (A 4°C los tratamientos con calentamiento óhmico fueron estadísticamente diferentes a los controles (sin tratamiento) (Tabla 16). A los 18 días el contenido de las bacterias ácido láctica fue de casi 8 Log UFC g⁻¹. Los hongos y las levaduras también incrementaron durante los 18 días de almacenamiento 18 (Tabla 17). Desde el primer día de almacenamiento el contenido de hongos en las muestras sometidas al calentamiento óhmico fue mayor y el de levaduras a partir del tercer día ($p \leq 0.05$).

Tabla 17; sin embargo, el aumento fue mayor a la temperatura más elevada. Las diferencias significativas entre el calentamiento óhmico y las muestras sin tratar se presentaron, en este caso, a partir de del día 12.

Tabla 16. Contenido de BMA, enterobacterias y bacterias ácido lácticas en piña tratada con calentamiento óhmico almacenada a 4°C.

Día	BMA		Enterobacterias		Bacterias ácido lácticas	
	Log UFC g ⁻¹					
	Tratamiento Óhmico	Control sin tratar	Tratamiento Óhmico	Control sin tratar	Tratamiento Óhmico	Control sin tratar
1	3.26 ± 0.47 ^a	3.76 ± 0.12 ^a	2.32 ± 0.47 ^a	2.03 ± 0.63 ^a	3.85 ± 0.59 ^a	4.57 ± 0.24 ^b
3	4.06 ± 0.73 ^a	4.40 ± 0.41 ^a	3.41 ± 0.43 ^a	3.16 ± 0.17 ^a	3.90 ± 0.06 ^a	4.59 ± 0.24 ^b
6	4.08 ± 0.25 ^a	4.57 ± 0.29 ^a	3.49 ± 0.45 ^a	3.32 ± 0.10 ^a	4.31 ± 0.52 ^a	4.68 ± 0.17 ^a
9	4.11 ± 0.39 ^a	4.75 ± 0.05 ^a	3.87 ± 0.37 ^a	3.84 ± 0.06 ^a	4.43 ± 0.32 ^a	4.96 ± 0.03 ^a
12	4.12 ± 0.43 ^a	4.82 ± 0.12 ^a	3.98 ± 0.82 ^a	3.94 ± 0.82 ^a	4.96 ± 0.28 ^a	5.94 ± 0.04 ^b
15	4.79 ± 0.80 ^a	5.72 ± 0.37 ^b	4.00 ± 0.76 ^a	3.99 ± 0.21 ^a	5.15 ± 0.66 ^a	5.78 ± 0.03 ^a
18	4.90 ± 0.38 ^a	6.04 ± 0.56 ^b	4.38 ± 0.20 ^a	4.65 ± 0.25 ^a	5.57 ± 0.07 ^a	6.70 ± 0.05 ^b
21	5.43 ± 0.04 ^a	5.52 ± 0.41 ^b	4.55 ± 0.05 ^a	5.38 ± 0.05 ^b	6.38 ± 0.06 ^a	7.81 ± 0.05 ^b

Dentro de las filas letras diferentes indican que no existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) según la prueba de Tukey

A 4°C los tratamientos con calentamiento óhmico fueron estadísticamente diferentes a los controles (sin tratamiento) (Tabla 16). A los 18 días el contenido de las bacterias ácido láctica fue de casi 8 Log UFC g⁻¹. Los hongos y las levaduras también incrementaron durante los 18 días de almacenamiento 18 (Tabla 17). Desde el primer día de almacenamiento el contenido de hongos en las muestras sometidas al calentamiento óhmico fue mayor y el de levaduras a partir del tercer día ($p \leq 0.05$).

Tabla 17. Hongos y levaduras en piña mínimamente procesada almacenada a 4°C.

Día	Hongos		Levaduras	
	Log UFC g ⁻¹			
	Tratamiento Óhmico	Control sin tratar	Tratamiento Óhmico	Control sin tratar
1	3.02 ± 0.42 ^a	3.64 ± 0.30 ^b	3.53 ± 0.26 ^a	4.09 ± 0.32 ^a
3	-	-	3.87 ± 0.33 ^a	4.78 ± 0.12 ^b
6	4.29 ± 0.83 ^a	5.65 ± 0.21 ^b	3.96 ± 0.50 ^a	5.35 ± 0.05 ^b
9	-	-	4.64 ± 0.26 ^a	5.63 ± 0.09 ^b
12	4.28 ± 0.05 ^a	5.68 ± 0.29 ^b	4.46 ± 0.40 ^a	5.66 ± 0.28 ^b
15	-	-	5.46 ± 0.78 ^a	5.71 ± 0.18 ^b
18	-	-	5.49 ± 0.13 ^a	6.62 ± 0.05 ^b
21	4.91 ± 0.25 ^a	7.15 ± 0.53 ^b	6.41 ± 0.36 ^a	7.51 ± 0.05 ^b

Dentro de las filas letras diferentes indican que no existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) según la prueba de Tukey.

-Sin datos

Las muestras de piña almacenadas a 10 °C tuvieron un comportamiento similar, pero en este caso los incrementos en las poblaciones de los microorganismos indicadores independientemente del tratamiento fueron mayores (Tabla 18 y Tabla 19).

Tabla 18. Contenido de BMA, enterobacterias y bacterias ácido lácticas en piña tratada con calentamiento óhmico almacenada a 10°C.

Día	BMA		Enterobacterias		Bacterias ácido lácticas	
	Log UFC g ⁻¹					
	Tratamiento Óhmico	Control sin tratar	Tratamiento Óhmico	Control sin tratar	Tratamiento Óhmico	Control sin tratar
1	3.85 ± 0.62 ^a	4.28 ± 0.42 ^b	2.09 ± 0.45 ^a	2.56 ± 0.29 ^a	3.91 ± 0.58 ^a	4.39 ± 0.42 ^b
3	4.17 ± 0.47 ^a	4.37 ± 0.32 ^a	3.99 ± 0.65 ^a	3.99 ± 0.63 ^a	4.61 ± 0.35 ^a	5.98 ± 0.01 ^b
6	4.27 ± 0.26 ^a	5.19 ± 0.11 ^b	4.11 ± 0.53 ^a	4.11 ± 0.53 ^a	5.51 ± 0.88 ^a	6.85 ± 0.17 ^b
9	5.59 ± 0.45 ^a	5.29 ± 0.04 ^a	4.62 ± 0.42 ^a	5.70 ± 0.05 ^b	6.34 ± 0.53 ^a	7.02 ± 0.32 ^b

12	5.83 ± 0.43 ^a	6.26 ± 0.06 ^b	4.96 ± 0.36 ^a	6.04 ± 0.6 ^b	7.23 ± 0.36 ^a	7.37 ± 0.04 ^a
15	6.13 ± 0.53 ^a	6.68 ± 0.18 ^b	5.49 ± 0.38 ^a	6.70 ± 0.03 ^b	7.87 ± 0.50 ^a	7.54 ± 0.06 ^a
18	7.36 ± 0.82 ^a	6.85 ± 0.87 ^b	5.93 ± 0.64 ^a	6.89 ± 0.09 ^b	7.93 ± 0.80 ^a	9.23 ± 0.07 ^b
21	7.77 ± 0.39 ^a	8.26 ± 0.13 ^b	6.20 ± 0.51 ^a	7.65 ± 0.07 ^b	7.95 ± 0.48 ^a	8.20 ± 0.13 ^b

Dentro de las filas letras diferentes indican que no existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) según la prueba de Tukey

Tabla 19. Hongos y levaduras en la piña mínimamente procesada almacenada a 10°C.

Día	Hongos		Levaduras	
	Tratamiento Óhmico	Control sin tratar	Tratamiento Óhmico	Control sin tratar
1	4.22 ± 0.04 ^a	3.98 ± 0.09 ^a	4.53 ± 0.32 ^a	5.70 ± 0.24 ^b
3	-	-	5.18 ± 0.73 ^a	6.43 ± 0.15 ^b
6	-	-	5.87 ± 0.27 ^a	6.56 ± 0.05 ^b
9	4.53 ± 0.08 ^a	5.32 ± 0.05 ^b	6.45 ± 0.43 ^a	6.96 ± 0.05 ^a
12	-	-	7.09 ± 0.32 ^a	7.11 ± 0.28 ^a
15	-	-	7.32 ± 0.36 ^a	7.39 ± 0.53 ^a
18	-	-	7.41 ± 0.13 ^a	7.68 ± 0.10 ^a
21	4.92 ± 0.18 ^a	6.99 ± 0.31 ^b	7.71 ± 0.01 ^a	8.14 ± 0.24 ^b

Letras iguales entre filas del mismo microorganismo indican que no hay diferencias significativas ($p \geq 0.05$) según la prueba de Tukey

-Si datos

A 4 °C los tratamientos con calentamiento óhmico fueron estadísticamente diferentes a los controles (sin tratamiento) (Tabla 16). A los 18 días el contenido de las bacterias ácido láctica fue de casi 8 Log UFC g⁻¹. Los hongos y las levaduras también incrementaron durante los 18 días de almacenamiento 18 (Tabla 17). Desde el primer día de almacenamiento el contenido de hongos en las muestras sometidas al calentamiento óhmico fue mayor y el de levaduras a partir del tercer día ($p \leq 0.05$).

La vida de anaquel de la piña no sometida al tratamiento óhmico (control) almacenada a 10°C es de seis días basada en su vida útil de consumo, por lo que con el tratamiento óhmico se alarga 6 días. La vida de anaquel reportada para un

almacenamiento a 4 °C es de 9 días (Yalcin *et al.*, 2017) logrando con el calentamiento óhmico 3 días más. Comparando los parámetros físicos y químicos no hubo mejora de las propiedades monitoreadas, pero sí se logró mantenerlas por más tiempo con respecto a la muestra sin tratar. Siendo el factor microbiológico importante para la vida de anaquel y considerando que los parámetros físicos y químicos se mantienen, la vida de anaquel a 4 °C se incrementó a 15 días y a 10 °C a 12 días.

VII. CONCLUSIONES

La realización del estudio permitió conocer el perfil microbiológico de la piña mínimamente procesada que se comercializa en mercados, supermercados y puestos ambulantes de la ciudad de Querétaro. La información generada es una contribución importante ya que no existen normas oficiales en México sobre la calidad microbiológica de estos productos, por lo que se espera que los resultados generados acerca del contenido de BMA, hongos y levaduras, coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli* tengan una contribución en esta área.

La elevada incidencia de *Salmonella* spp. (18 %) y *Listeria monocytogenes* evidencia a las deficientes prácticas de manejo, sin éxito, que se llevan a cabo en los sitios de venta. Este hecho, aunado a la capacidad de desarrollo de estos microorganismos en las primeras horas de almacenamiento de la piña mínimamente procesada, es evidencia del riesgo al que los consumidores están expuestos.

La desinfección química no es eficiente para reducir significativamente las poblaciones de *S. enterica*, *L. monocytogenes* y sus respectivos subrogados. En contraste, el calentamiento óhmico, específicamente el tratamiento a 20 V cm⁻¹ 65°C por 1 min logró reducciones significativas desde el punto de vista de la inocuidad microbiana en las poblaciones de *E. faecium* y *L. innocua* sin generar cambios

drásticos en las variables físicas y químicas de la piña mínimamente procesada. Se logró alargar la vida de anaquel de la piña durante el almacenamiento a 4 y 10 °C.

El tratamiento óhmico es una buena alternativa para la descontaminación efectiva de la piña mínimamente procesada de acuerdo a los criterios establecidos por la FDA de los EE.UU. La información generada en este trabajo es una aportación importante para los productores de alimentos mínimamente procesados, ya que se demostró que las tecnologías emergentes son efectivas para la eliminación de microorganismos patógenos y que además, genera menos cambios en las variables físicas y químicas de la fruta.

IX. REFERENCIAS

Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., & Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1–2), 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013>

Abadias, Maribel, Alegre, I., Oliveira, M., Altisent, R., & Viñas, I. (2012). Growth potential of *Escherichia coli* O157: H7 on fresh-cut fruits (melon and pineapple) and vegetables (carrot and escarole) stored under different conditions. *Food Control*, 27(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.02.032>

Abadias, Maribel, Alegre, I., Usall, J., Torres, R., & Viñas, I. (2011). Evaluation of alternative sanitizers to chlorine disinfection for reducing foodborne pathogens in fresh-cut apple. *Postharvest Biology and Technology*, 59(3), 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.09.014>

Ahvenainen, R. (1996). New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 7(6), 179–187. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(96\)10022-4](https://doi.org/10.1016/0924-2244(96)10022-4)

AOAC. (1990). AOAC Official Methods of Analysis. *Association of Official Agricultural Chemists. Washington, D.C., 15th*(Volume 1), 136–138.

- Aznar, R., & Alarcón, B. (2002). On the specificity of PCR detection of *Listeria monocytogenes* in food: A comparison of published primers. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(1), 109–119. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00079>
- Barba, F. J., Ahrné, L., Xanthakis, E., Landerslev, M. G., & Orlie, V. (2018). Innovative Technologies for Food Preservation. *Innovative Technologies for Food Preservation*, 2(3), 25–51. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811031-7.00002-9>
- Barba, F. J., Mariutti, L. R. B., Bragagnolo, N., Mercadante, A. Z., Barbosa-Cánovas, G. V., & Orlie, V. (2017). Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing. *Trends in Food Science and Technology*, 67, 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.006>
- Barrón, Y. (2017). *Heat stability on enzyme activity of tyrosinase from Agaricus bisporus during ohmic heating*. Instituto Politécnico Nacional. CICATA-IPN Unidad Querétaro.
- Beteseb Yigeremu, Mulugeta Bogale, M. A. (2001). Fate of *Salmonella* species and *E. coli* in Fresh-Prepared Orange, Avocado, Papaya and Pine Apple Juices. *Ethiop J Health Sci*, 11(2), 89–95.
- Beuchat, L. R. (1996). Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection*, 59(2), 204–216. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.2.204>
- Brilhante São José, J. F., & Dantas Vanetti, M. C. (2012). Effect of ultrasound and commercial sanitizers in removing natural contaminants and *Salmonella enterica* Typhimurium on cherry tomatoes. *Food Control*, 24(1–2), 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.008>
- Busta, F. F., Suslow, T. V., Parish, M. E., Beuchat, L. R., Farber, J. N., Garrett, E. H., & Harris, L. J. (2003). The Use of Indicators and Surrogate Microorganisms for the Evaluation of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce.

Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2(s1), 179–185.
<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00035.x>

Butz, P., & Tauscher, B. (2002). Emerging technologies: Chemical aspects. *Food Research International*, 35(2–3), 279–284. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00197-1)

CDC. (2012). *Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2012*. 62(2), 1998–2008. Retrieved from <http://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/foodborne-disease-outbreaks-annual-report-2012-508c.pdf>

CDC. (2017). Surveillance for foodborne disease outbreaks United States, 2015: Annual Report. In CDC. Retrieved from https://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/2015FoodBorneOutbreaks_508.pdf

Chen, C. (2016). *Market Trends and Product Development of Tray-Sealed Single Serving Ready Meals in Sweden , Taiwan and China* (C. Chen, Ed.). Sweden: Lund University.

Chen, L., Wei, X., Irmak, S., Chaves, B. D., & Subbiah, J. (2019). Inactivation of *Salmonella enterica* and *Enterococcus faecium* NRRL B-2354 in cumin seeds by radiofrequency heating. *Food Control*, 103(April), 59–69.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.04.004>

Cosby, D. E., Cox, N. A., Harrison, M. A., Wilson, J. L., Buhr, R. J., & Fedorka-Cray, P. J. (2015). *Salmonella* and antimicrobial resistance in broilers: A review: Table 1. *The Journal of Applied Poultry Research*, 24(3), 408–426.
<https://doi.org/10.3382/japr/pfv038>

Cotter, P. D., O'Reilly, K., & Hill, C. (2001). Role of the glutamate decarboxylase acid resistance system in the survival of *Listeria monocytogenes* LO28 in low pH foods. *Journal of Food Protection*, 64(9), 1362–1368.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.9.1362>

- Davis, M. J., Coote, P. J., & O'Byrne, C. P. (1996). Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: The adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. *Microbiology*, *142*(10), 2975–2982. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-10-2975>
- De Corato, U. (2019). Improving the shelf-life and quality of fresh and minimally-processed fruits and vegetables for a modern food industry: A comprehensive critical review from the traditional technologies into the most promising advancements. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *0*(0), 1–36. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1553025>
- de São José, J. F. B., & Vanetti, M. C. D. (2015). Application of ultrasound and chemical sanitizers to watercress, parsley and strawberry: Microbiological and physicochemical quality. *LWT - Food Science and Technology*, *63*(2), 946–952. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.029>
- Deen, B., & Diez-Gonzalez, F. (2019). Assessment of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 as potential *Salmonella* surrogate for thermal treatments of toasted oats cereal and peanut butter. *Food Microbiology*, *83*(March), 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.015>
- Delaquis, P., & Austin, J. W. (2007). The effect of heat treatments on the fate of foodborne pathogens in horticultural produce. *Stewart Postharvest Review*, *3*(3), 1–5. <https://doi.org/10.2212/spr.2007.3.9>
- Dermesonlouoglou, E. K. (2018). *Minimally Processed Fresh-Cut Peach and Apricot Snacks of Extended Shelf-Life by Combined Osmotic and High Pressure Processing*. 2016.
- Di, R., Cardinali, G., Minervini, G., Antonielli, L., Giuseppe, C., Ricciuti, P., & Gobbetti, M. (2010). Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. *Food Microbiology*, *27*(3), 381–389. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.012>

- Driscoll, B. O., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (1996). Adaptive Acid Tolerance Response in *Listeria monocytogenes* : Isolation of an Acid-Tolerant Mutant Which Demonstrates Increased Virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5), 1693–1698.
- Eng, S. K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N. S., Ser, H. L., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284–293.
<https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- Escartín, F. E. (2008). Microbiología e inocuidad de los alimentos. In *Universidad Autónoma de Querétaro* (Segunda Ed, p. 967). <https://doi.org/10.1016/B978-84-458-1870-1.50001-6>
- FAO. (1997). Surface decontamination of fruit and vegetables eaten raw: a review. *Food Safety Unit World Health Organization*, 22(1903), 1–49.
<https://doi.org/doi.org/entity/mediacentre/factsheets/fs399/en/index.html>
- Fasnz. (2001). Guidelines for the microbiological examination of ready - to - eat foods. *Food Standard Australia New Zealand*, (December), 1–7. Retrieved from <http://foodstandards.gov.au>
- FDA. (2014a). *BAM : Detection and Enumeration of Listeria monocytogenes in Foods Attachment*.
- FDA. (2014b). *BAM : Salmonella*. (February 2011).
- Feng, K., Hu, W., Jiang, A., Xu, Y., Sarengaowa, Li, X., & Bai, X. (2015). Growth Potential of *Listeria Monocytogenes* and *Staphylococcus Aureus* on Fresh-Cut Tropical Fruits. *Journal of Food Science*, 80(11), M2548–M2554.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.13089>
- Foster, J. W., & Hall, H. K. (1991). Inducible pH Homeostasis and the Acid Tolerance Response of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 173(16), 5129–5135.

- Gavahian, M., Tiwari, B. K., Chu, Y. H., Ting, Y., & Farahnaky, A. (2019). Food texture as affected by ohmic heating: Mechanisms involved, recent findings, benefits, and limitations. *Trends in Food Science and Technology*, 86, 328–339. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.022>
- Graça, A., Esteves, E., Nunes, C., Abadias, M., & Quintas, C. (2017). Microbiological quality and safety of minimally processed fruits in the marketplace of southern Portugal. *Food Control*, 73, 775–783. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.046>
- Guida, V., Ferrari, G., Pataro, G., Chambery, A., Maro, A. Di, & Parente, A. (2013). LWT - Food Science and Technology The effects of ohmic and conventional blanching on the nutritional , bioactive compounds and quality parameters of artichoke heads. *LWT - Food Science and Technology*, 53(2), 569–579. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.04.006>
- Har, K. K., & Perera, C. O. (2013). Efficacy of Sanitizers on Three Types of Tropical Fruits Having Different Skin Characteristics. *J Food Processing & Beverages*, 1(1), 1–4. <https://doi.org/10.13188/2332-4104.1000003>
- Hylton, R. K., Sanchez-maldonado, A. F., Peyvandi, P., Rahmany, F., Dagher, F., Leon-velarde, C. G., ... Hamidi, A. M. (2019). *Decontamination of Chia and Flax Seed Inoculated with Salmonella and Surrogate , Enterococcus faecium NRRL B-2354 , Using a Peracetic Acid Sanitizing Solution : Antimicrobial Efficacy and Impact on Seed Functionality*. 82(3), 486–493. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-381>
- Ita, P. S., & Hutkins, R. W. (1991). Intracellular pH and survival of *Listeria monocytogenes* scott a in tryptic soy broth containing acetic, lactic, citric, and hydrochloric acids. *Journal of Food Protection*, 54(1), 15–19. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-54.1.15>
- Jaeger, H., Roth, A., Toepfl, S., Holzhauser, T., Engel, K. H., Knorr, D., ... Steinberg, P. (2016). Opinion on the use of ohmic heating for the treatment of

foods. *Trends in Food Science and Technology*, 55, 84–97.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.007>

Jarvis, N. A., O'Bryan, C. A., Dawoud, T. M., Park, S. H., Kwon, Y. M., Crandall, P. G., & Ricke, S. C. (2016). An overview of Salmonella thermal destruction during food processing and preparation. *Food Control*, 68, 280–290.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.006>

Jin, T. Z., Huang, M., Niemira, B. A., & Cheng, L. (2017). Microbial Reduction and Sensory Quality Preservation of Fresh Ginseng Roots Using Nonthermal Processing and Antimicrobial Packaging. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12871>

Joy, P. ., & Divya, B. (2016). Multiple uses of pineapple in food industries. *Technical Report*, (January), 0–6.

Juneja, V. K., Foglia, T. A., & Marmer, B. S. (1998). Heat resistance and fatty acid composition of *Listeria monocytogenes*: Effect of pH, acidulant, and growth temperature. *Journal of Food Protection*, 61(6), 683–687.

<https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.6.683>

Kim, C., Wilkins, K., Bowers, M., Wynn, C., & Ndegwa, E. (2018). Influence of PH and Temperature on Growth Characteristics of Leading Foodborne Pathogens in a Laboratory Medium and Select Food Beverages. *Austin Food Sci*, 3(1), 1–8.

Koutsoumanis, K. P., & Sofos, J. N. (2004). Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium after habituation at different pH conditions. *Letters in Applied Microbiology*, 38(4), 321–326. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01491.x>

KROLL, R. G., & T, R. A. P. A. T. C. T. (1992). Induced acid tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Applied Microbiology*, 14, 224–227.

- Lagunes-Martínez, G., & Bojnec, S. (2017). *Novel Food Consumption* (M. Novak, Ed.). <https://doi.org/doi.org/10.26493/978-961-7023-09-1>
- Lee, I. N. S. O. O., Slonczewski, J. L., & Foster, J. W. (1994). A Low-pH-Inducible , Stationary-Phase Acid Tolerance Response in Salmonella typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 176(5), 1422–1426.
- Lee, S.-Y., Ryu, S., & Kang, D.-H. (2013). Effect of Frequency and Waveform on Inactivation of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella enterica Serovar Typhimurium in Salsa by Ohmic Heating. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 10–17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01802-12>
- Low, J. C., & Donachie, W. (1997). A review of Listeria monocytogenes and listeriosis. *Veterinary Journal*, 153(1), 9–29. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(97\)80005-6](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(97)80005-6)
- Lviv National Medical University. (2015). *Iodometry. Titration with Sodium Thiosulfate*. 3.
- McLauchlin, J., Mitchell, R. T., Smerdon, W. J., & Jewell, K. (2004). Listeria monocytogenes and listeriosis: A review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, 92(1), 15–33. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00326-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00326-X)
- Ministerio de la Presidencia. (2000). Real Decreto 3484/2000, de 29 de diciembre, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas. *Boletín Oficial Del Estado*, 11, 1435–1441. Retrieved from <https://www.boe.es/buscar/pdf/2001/BOE-A-2001-809-consolidado.pdf>
- Montero-Calderón, M., Rojas-Graü, M. A., & Martín-Belloso, O. (2008). Effect of packaging conditions on quality and shelf-life of fresh-cut pineapple (Ananas comosus). *Postharvest Biology and Technology*, 50(2–3), 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.03.014>

- Moubarac, J.-C. (2017). *Ultra-processed foods in Canada: consumption, impact on diet quality and policy implications*. Retrieved from https://mma.prnewswire.com/media/615078/Fondation_des_maladies_du_c_ur_et_de_l_AVC_Les_aliments_ultra_tr.pdf
- Neetoo, H., Ramasawmy, B., Ruggoo, A., Hardowar, S., Rungasamy, I., Jaumdally, W., & Reega, K. (2019). *Current Research in Nutrition and Food Science A Comparative Assessment of the Quality of Minimally Processed Pineapples Sold in Wet Markets and Supermarkets of Mauritius*. 07(1).
- Pasha, I., Saeed, F., Sultan, M. T., Khan, M. R., & Rohi, M. (2014). Recent Developments in Minimal Processing: A Tool to Retain Nutritional Quality of Food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(3), 340–351. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.585254>
- Peleg, M. (2019). The instrumental texture profile analysis revisited. *Journal of Texture Studies*. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12392>
- Perricone, M., Gallo, M., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2017). Yeasts. In *The Microbiological Quality of Food*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00008-X>
- Phan-thanh, L., & Alige, S. (2000). Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 121–126.
- Pinela, J., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Nonthermal physical technologies to decontaminate and extend the shelf-life of fruits and vegetables: Trends aiming at quality and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(10), 2095–2111. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1046547>
- Priyadarshi, R., Singh, A. K., Koradi, P., Khandekar, D., Jayaramulu, K., Shanti, M. L., ... Barthwal, M. (2014). *Agriculture & Horticulture*. 2(4), 9881. <https://doi.org/10.4172/2168-9881.S1.011>
- Profeco. (2013). *Habitos de comida fuera de casa* (p. 103). p. 103.

- Radoshevich, L., & Cossart, P. (2018). *Listeria monocytogenes*: Towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 32–46. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.126>
- Ramos, B., Miller, F. A., Brandão, T. R. S., Teixeira, P., & Silva, C. L. M. (2013). Fresh fruits and vegetables - An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.07.002>
- Ruiz-Cruz, S., Acedo-Félix, E., Díaz-Cinco, M., Islas-Osuna, M. A., & González-Aguilar, G. A. (2007). Efficacy of sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* populations on fresh-cut carrots. *Food Control*, 18(11), 1383–1390. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.09.008>
- SAGARPA. (2013). PC-029-2005 Pliego de condiciones para el uso de la marca oficial México. Calidad suprema en piña. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- SAGARPA. (2017). *Agrícola Nacional*. I, 28.
- Sagong, H.-G., Park, S.-H., Choi, Y.-J., Ryu, S., & Kang, D.-H. (2011). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* in orange and tomato juice using ohmic heating. *Journal of Food Protection*, 74(6), 899–904. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-552>
- Salazar, J. K., Carstens, C. K., Bathija, V. M., Narula, S. S., Parish, M., & Tortorello, M. Lou. (2016). Fate of *Listeria monocytogenes* in fresh apples and caramel apples. *Journal of Food Protection*, 79(5), 696–702. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-442>
- Silva-Angulo, A. B., Zanini, S. F., Rosenthal, A., Rodrigo, D., Klein, G., & Martínez, A. (2015). Comparative study of the effects of citral on the growth and injury of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* cells. *PLoS ONE*, 10(2), 1–13.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114026>

- Sivakumar, D., & Fallik, E. (2013). Influence of Heat Treatments on Quality Retention of Fresh and Fresh-Cut Produce. *Food Reviews International*, 29(3), 294–320. <https://doi.org/10.1080/87559129.2013.790048>
- SIVAPALASINGAM, S., FRIEDMAN, C. R., COHEN, L., & TAUXE, R. V. (2004). Fresh Produce: A Growing Cause of Outbreaks of Foodborne Illness in the United States, 1973 through 1997. *Journal of Food Protection*, 67(10), 2342–2353. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.10.2342>
- Sodha, S. V., Lynch, M., Wannemuehler, K., Leeper, M., Malavet, M., Schaffzin, J., ... Braden, C. (2011). Multistate outbreak of Escherichia coli O157:H7 infections associated with a national fast-food chain, 2006: A study incorporating epidemiological and food source traceback results. *Epidemiology and Infection*, 139(2), 309–316. <https://doi.org/10.1017/S0950268810000920>
- Stewart, C. Dimitrov, S. (2018). Tropical Fruits. From Cultivation to Consumption and Health Benefits: Pineapple. In *Tropical Fruits. From Cultivation to Consumption and Health Benefits: Pineapple* (p. 249). New York: Nova Sscience Publishers.
- Strawn, L. K., & Danyluk, M. D. (2010). Fate of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella on Fresh and Frozen Cut Pineapples. *Journal of Food Protection*, 73(3), 418–424. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.3.418>
- Strawn, L. K., Schneider, K. R., & Danyluk, M. D. (2011). Critical Reviews in Food Science and Nutrition Microbial Safety of Tropical Fruits Microbial Safety of Tropical Fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(November 2014), 132–145. <https://doi.org/10.1080/10408390903502864>
- Taylor, P., Nguyen-the, C., & Carlin, F. (2009). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition and vegetables The Microbiology of Minimally Processed Fresh Fruits and Vegetables*. <https://doi.org/10.1080/10408399409527668>

Trkov, M., & Avguštin, G. (2003). An improved 16S rRNA based PCR method for the specific detection of *Salmonella enterica*. *International Journal of Food Microbiology*, 80(1), 67–75. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00138-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00138-1)

Türkmen, F. U., & Takci, H. A. M. (2018). Ultraviolet-C and ultraviolet-B lights effect on black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus*) juice. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9719-2>

Yalcin, H., & Çapar, T. D. (2017). Chapter 21 Bioactive Compounds of Fruits and Vegetables. In *Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7018-6>

X. ANEXOS

X.1 Valoración de la concentración de los desinfectantes

Los desinfectantes fueron valorados para conocer su concentración mediante el método yodométrico (Lviv National Medical University, 2015).

× Ácido peracético

Se añadieron 20 mL de ácido sulfúrico (25%) a 50 mL de solución a testar. Se agregó permanganato de potasio (0.1 N), hasta color rosa permanente. Luego se añadió 5 mL de solución de yoduro potásico (10%) y 2 mL de indicador de almidón (1%) y se valoró con tiosulfato sódico (0.1N) hasta la desaparición del color. Se calculó la concentración con la siguiente fórmula.

$$\text{ppm ácido peracético} = \text{valoración (mL)} \times 76$$

× Cloro

Se tomaron 3 mL de la solución a valorar en un matraz de 25 mL aforando con agua destilada. Se pipetearon 4 mL de esta solución en un matraz Erlenmeyer y se valoró con tiosulfato de sodio (0.1 N) hasta la aparición de un color amarillo pálido, se añadieron 20 mL de yoduro de potasio (10%) y 10 mL de ácido sulfúrico (20 mL). En

este punto se adicionaron 2 mL del indicador de almidón y se prosiguió con la valoración lentamente hasta la desaparición del color.

$$N_{CI} = \frac{(\text{Vol. de Tiosulfato})(N \text{ del tiosulfato})}{\text{Vol. CI}}$$

X.2 PCR *Salmonella* spp.



Figura 27. PCR de las cepas de *Salmonella* aisladas de la piña. Carriles: 1 marcador de peso molecular, 2-13 cepas confirmadas, 14 control negativo, 15-16 cepas confirmadas y 17 control positivo.

X.3 PCR *Listeria monocytogenes*

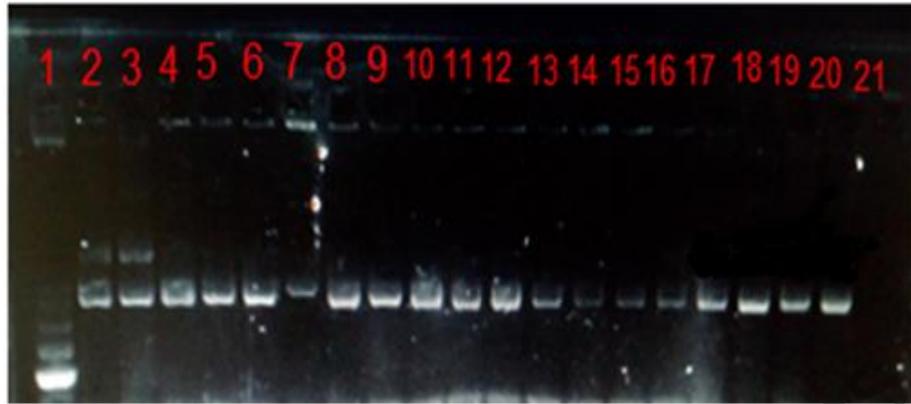


Figura 28. PCR de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de la piña. Carriles: 1 marcador de peso molecular, 2-19 cepas confirmadas, 20 control positivo y 21 control negativo.