



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

"EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ONDAS DE CHOQUE SOBRE LA
VIABILIDAD DE UNA CEPA ÁCIDO-RESISTENTE DE *Escherichia coli* O157:H7
EN SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA Y JUGO DE NARANJA"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

TERESITA CLAUDIA HERRERA MEDINA

DIRIGIDA POR

M. en C. ULISES MORA ÁLVAREZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2004.

BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

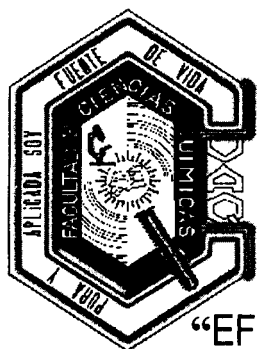
No. Adq. H68894

No. Título _____

Clas TS

532.0593

H565e



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ONDAS DE CHOQUE SOBRE LA
VIABILIDAD DE UNA CEPA ÁCIDO-RESISTENTE DE *Escherichia coli* O157:H7
EN SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA Y JUGO DE NARANJA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

TERESITA CLAUDIA HERRERA MEDINA

DIRIGIDA POR

M. en C. ULISES MORA ÁLVAREZ




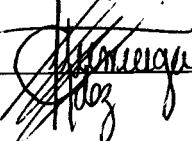
SINODALES

M. en C. ULISES MORA ÁLVAREZ
DIRECTOR

Dr. ACHIM LOSKE MEHLING
SINODAL

M. en C. MA. DE LOS ÁNGELES MUÑOZ URQUIZA
SINODAL

Dra. MONTSERRAT HERNÁNDEZ ITURRIAGA
SINODAL

RESUMEN

En esta tesis se estudió el potencial de las ondas de choque, generadas electrohidráulicamente, como método no térmico de conservación de alimentos. El objetivo del trabajo consistió en evaluar el efecto de la aplicación de ondas de choque sobre la viabilidad de una cepa nativa y ácido-resistente de *Escherichia coli* O157:H7 suspendida en solución salina isotónica y jugo de naranja. Para evaluar los efectos de los tratamientos sobre la viabilidad del microorganismo se usó la técnica de vaciado en placa en agar soya tripticasa con extracto de levadura al 0.6% (ASTEL). Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza. Se utilizó la mitad de un diseño factorial 2^4 , para evaluar el efecto del número de ondas de choque aplicadas, la cavitación, la luz producida por la descarga eléctrica y la fase de crecimiento sobre la viabilidad de una cepa nativa de *Escherichia coli* O157:H7 suspendida en solución salina isotónica (SSI). La mayor inactivación lograda aquí fue de $0.58 \log_{10}$ UFC/ml. Según el ANOVA dicha inactivación se debió a la interacción luz – fase de crecimiento. Se obtuvieron células ácido tolerantes en fase estacionaria y resistente a rifampicina (R^+), para evaluar el efecto del número de ondas de choque aplicadas, la cavitación y la luz producida por la descarga eléctrica sobre la viabilidad de suspensiones de células en fase estacionaria de la cepa R^+ de *Escherichia coli* O157:H7 en SSI. En este experimento se utilizó un diseño factorial 2^4 . Se logró una inactivación de $2.34 \log_{10}$ UFC/ml. La interacción estadísticamente significativa fue el número de ondas de choque aplicada con el tipo de reflector. Se utilizó un diseño factorial 2^3 para evaluar el efecto del número de ondas de choque aplicadas, la luz producida por la descarga eléctrica y el nivel de inóculo de células en fase estacionaria de la cepa ácido-tolerante de *Escherichia coli* O157:H7 inoculadas en jugo de naranja fresco. Se logró inactivar de la cepa ácido-tolerante en jugo de naranja un máximo de $1.11 \log_{10}$ UFC/ml. El ANOVA reveló que ningún factor es estadísticamente significativo incluyendo las interacciones. Al no lograr reducir en $5 \log_{10}$ la viabilidad microbiana, las ondas de choque todavía no pueden ser consideradas como un método alternativo de conservación de alimentos. Se recomienda continuar con la búsqueda de parámetros más agresivos.

Para mi gran amor Hugo

Y con responsabilidad y cuidado
para nuestro pedazo de carne Juan Pablo.

Con profunda admiración, respeto
y con todo mi corazón a mis padres Ma. Luisa y Ponciano.

Con mucho cariño para mis hermanas Alis, Luisa,
Y mis cuñados Omar y Gus.

Agradezco a Dios por haberme dado el don de la vida, por regalarme la salud e inteligencia, para llegar hasta donde hoy estoy.

Agradezco de todo corazón a Hugo, porque él me enseñó a confiar en mi misma y a levantarme y seguir, sin importar cuantas veces haya caído. Y porque con su amor me ayuda a crecer día con día, construyendo todos nuestros sueños juntos. Te amo. Agradezco a mi bebé Juan Pablo y a la familia que hoy estoy formando, porque es lo que me impulsa a seguir y a ser cada día mejor.

Les agradezco a mis padres, por su ejemplo, su amor y ternura, pero sobre todo por su lucha incansable por darnos lo mejor a mis hermanas y a mi. Los amo. A Alis y Luisa por su apoyo, amor y confianza en mi. Gracias por ser como son, las quiero y admiro. A mis cuñados: Omar y Gus por ser los hermanos que nunca tuve, mil Gracias.

Agradezco a mis tías y primos en especial a Pame porque con su ejemplo me ha enseñado a levantarme y seguir luchando.

Agradezco a las personitas que no están directamente involucradas en la realización de esta tesis pero que con sus sonrisas e inocencia me hicieron más agradables, ratos amargos: Nea, Lari, Max, Clarita, Pamela, Mariana, Pau, Dianis y Bruno. Están en mi corazón.

Agradezco a Diana por permitirme conocerla, a Alma por ser una amiga inseparable. A Maltie por su ayuda en esta etapa de mi vida. Agradezco a Diana Arce y a Kara, gracias por ser mis cuñadas. A los de San Isidro: Marce, Gerry, Verito, Angy y Oscar, gracias por sus oraciones.

Agradezco con profunda admiración a quien me albergó por más de 5 años la UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERÉTARO. A todos mis maestros por sus enseñanzas, experiencias y anécdotas.

Agradezco a Ulises y al Dr. Achim por haberme permitido crecer dándome la oportunidad de colaborar con ellos en este trabajo. A todos y cada uno de los que trabajamos juntos en el laboratorio de ondas de choque: Francisco Fernández y a Arturo Méndez, no solo por la ayuda sino por los consejos también.

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Ondas de Choque del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM, como una co-dirección entre el M. en C. Ulises Mora Álvarez y el Dr. Achim Loske, con apoyo financiero del proyecto de investigación UNAM-DGAPA IN-101202.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
Índice general	i
Índice de cuadros	iv
Índice de figuras	vi
Resumen	1
1. Introducción	3
2. Antecedentes	3
Métodos de preservación de alimentos	5
Temperatura	7
Radiaciones	8
Presión Hidrostática	13
Ultrasonido	14
Campos eléctricos pulsados	15
Microorganismos Emergentes	18
<i>Escherichia coli</i>	18
Características Generales	21
Reservorios	23
Vehículos	23
Patogenicidad	27
Brotos	31
Aislamiento e identificación	32
Jugo de naranja	32
Composición	33
Microflora más común	39
Modo de preparación	40
Beneficios nutricionales	42
Ondas de Choque	42
Antecedentes históricos	42
Ondas de choque	44

	Cavitación	50
	Mexilit II	51
	Investigación y aplicaciones novedosas	56
		58
3.	Justificación	
4.	Objetivos	59
	General	59
	Específicos	
5.	Materiales y métodos	
	Materiales	
	Material biológico	60
	Generador de ondas de choque	60
	Reflectores	60
	Metodología	
	Cinética de crecimiento	62
	Preparación de muestras	63
	Estudió del efecto del número de ondas de choque aplicadas, la cavitación, la luz producida por la descarga y la fase de crecimiento sobre la viabilidad de una cepa nativa de <i>E. coli</i> O157:H7 en SSI	63
	Determinación de la resistencia térmica de <i>E. coli</i> O157:H7	64
	Inducción de la ácido tolerancia	65
	Inducción de la resistencia a Rifampicina	65
	Estudió del efecto del número de ondas de choque aplicadas, la cavitación, la luz producida por la descarga y el tipo de reflector sobre la viabilidad de células en fase estacionaria de una cepa ácido tolerante de <i>E. coli</i> O157:H7 en SSI	66
	Estudió del efecto del número de ondas de choque aplicadas, la luz producida por la descarga y el nivel de inóculo sobre la viabilidad de células en fase estacionaria de una cepa ácido tolerante de <i>E. coli</i> O157:H7 en jugo fresco de naranja	67
6.	Resultados	
	Cinética de crecimiento	69

Evaluación del efecto del número ondas de choque aplicadas, la cavitación, la luz producida por la descarga eléctrica y la fase de crecimiento	71
Determinación de la resistencia térmica	77
Inducción a la ácido tolerancia	77
Evaluación del efecto del número de ondas de choque aplicadas, la cavitación, la luz producida por la descarga y el tipo de reflector	83
Análisis de calidad del jugo fresco	90
Evaluación del número de ondas de choque aplicadas, la cavitación, la luz producida por la descarga y el nivel de inóculo	90
7. Discusión	
Evaluación del efecto del número ondas de choque aplicadas, la cavitación, la luz producida por la descarga eléctrica y la fase de crecimiento	96
Evaluación del efecto del número de ondas de choque aplicadas, la cavitación, la luz producida por la descarga y el tipo de reflector	97
Evaluación del número de ondas de choque aplicadas, la cavitación, la luz producida por la descarga y el nivel de inóculo	99
8. Conclusiones	101
9. Bibliografía	102
10. Apéndice	
Glosario	114
Abreviaturas	114

INDICE DE CUADROS

Contenido	Página
1. Técnicas empleadas para preservar alimentos	4
2. Dosis máxima de radiación ionizante para mantener las propiedades sensoriales en alimentos de origen animal	9
3. Dosis requerida para disminuir patógenos en Carne a temperaturas de refrigeración	10
4. Efectos benéficos de varios tratamientos usados en combinación con las radiaciones	11
5. Algunas causas de enfermedades transmitidas por alimentos	16
6. Factores que aumentan el riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos	17
7. Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 a diferentes valores de pH con 6 diferentes ácidos y a diferentes temperaturas por 21 días	22
8. Número de brotes reportados y número de casos de infecciones de <i>E. coli</i> O157:H7 en EUA, 1982-1998	28
9. Resumen de algunos brotes de infección por <i>E. coli</i> O157:H7 transmitidos por alimentos	29
10. Alcoholes presentes en jugo de naranja	34
11. Ácidos presentes en jugo de naranja	35
12. Azúcares en el jugo de naranja	36
13. Compuestos volátiles identificados en jugo de naranja fresco	37
14. Cuentas viables de la inactivación de una cepa nativa de <i>E. coli</i> O157:H7 en SSI	72
15. Inactivación de <i>E. coli</i> O157:H7 en SSI por efecto del número de ondas de choque aplicadas, el nivel de cavitación, la luz producida por la descarga eléctrica y la fase de crecimiento	74
16. Análisis de varianza (ANOVA) de la inactivación de <i>E. coli</i> O157:H7 en SSI	76
17. Valores <i>D</i> estimados para células en fase estacionaria y exponencial de	

en SSI	79
18. Cuenta viable de células de <i>E. coli</i> O157:H7, después del reto ácido (pH 2.5) en función del pH y del tiempo de incubación	80
19. ANOVA de la inducción a la ácido-tolerancia de <i>E. coli</i> O157:H7 en SSI	81
20. Cuentas viables de la inactivación de una cepa ácido tolerante de <i>E. coli</i> O157:H7 en SSI	84
21. Inactivación de <i>E. coli</i> O157:H7 en SSI por efecto el efecto del número de ondas de choque aplicadas, el nivel de cavitación, la luz producida por la descarga eléctrica y el tipo de reflector	85
22. ANOVA de la inactivación de una cepa ácido tolerante de <i>E. coli</i> O157:H7 en SSI	86
23. Contenido microbiano del jugo fresco de naranja	91
24. Cuentas viables de la inactivación de <i>E. coli</i> O157:H7 en jugo fresco de naranja	92
25. Inactivación de <i>E. coli</i> O157:H7 en jugo fresco de naranja por efecto del número de ondas de choque aplicadas, la cavitación, la luz producida por la descarga eléctrica y el nivel de inóculo	93
26. ANOVA de la inactivación de células de <i>E. coli</i> O157:H7 en jugo fresco de naranja	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
	19
1. Fisiología de <i>E. coli</i>	45
2. Perfil de una onda de choque	46
3. Generación de una onda de choque	48
4. Reflector elipsoidal	49
5. Fotografía del reflector convencional	53
6. Fotografía de la bujía utilizada en el Mexilit II	54
7. Diagrama de bloques del circuito eléctrico	55
8. Fotografía del circuito de descarga	61
9. Esquema del generador de ondas de choque Mexilit II	70
10. Cinéticas de crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 en CSTEI a 35 °C, para la obtención de células en fase estacionaria y exponencial	75
11. Inactivación logarítmica estimada de <i>E. coli</i> O157:H7 en SSI en función de la luz producida por la descarga eléctrica y la fase de crecimiento	78
12. Inactivación de células en fase estacionaria y exponencial de <i>E. coli</i> O157:H7 suspendidas en SSI a 50, 55 y 60 °C	82
13. Disminución logarítmica de células en fase estacionaria de <i>E. coli</i> O157:H7, después del reto ácido (pH 2.5) en función del pH y del tiempo de incubación	87
14. Disminución logarítmica de células en fase estacionaria <i>E. coli</i> O157:H7 en SSI con o sin luz	88
15. Disminución logarítmica de células en fase estacionaria de <i>E. coli</i> O157:H7 en función del nivel de cavitación	89
16. Inactivación logarítmica estimada de <i>E. coli</i> O157:H7 en SSI en función del número de ondas de choque y el tipo de reflector	95
17. Inactivación logarítmica de células en fase estacionaria de <i>E. coli</i> O157:H7 debida a la interacción entre las ondas de choque y el nivel de inóculo utilizado, con y sin luz	

1. INTRODUCCIÓN

Los cambios en los estilos de vida, que son una de las consecuencias del desarrollo económico mundial, y las distintas prácticas de alimentación están obligando a las autoridades a asumir posiciones más rigurosas en cuanto al control de la calidad e inocuidad de los alimentos. Actualmente se considera que los alimentos son una de las principales fuentes de exposición a microorganismos patógenos.

El interés por evitar las enfermedades asociadas al consumo de los alimentos surge con la práctica misma de ingestión de alimentos. Dichas enfermedades son causadas por microorganismos o sus toxinas, tal es el caso de *Escherichia coli* O157:H7. Este es un patógeno que en las últimas décadas ha emergido con mucha fuerza. Su importancia no sólo radica en la gravedad de los padecimientos que produce, sino también en su resistencia a condiciones de acidez alta y a que sus fuentes son los alimentos de consumo inmediato, como la carne y la leche.

La industria alimentaria y la misma población demandan alimentos sanos y seguros. Es por eso que surge interés en desarrollar nuevos métodos no térmicos de conservación de alimentos. Un detallado conocimiento de los mecanismos de inactivación de microorganismos mediante ondas de choque puede tener muchas aplicaciones prácticas en la industria alimentaria.

Las ondas de choque, del tipo usado en este trabajo, son pulsos de presión de hasta 150 atm. Se utilizan en campos tan diversos como la urología y ortopedia. La aplicación médica de las ondas de choque a la desintegración de cálculos sin cirugía, o litotripsia extracorporal por ondas de choque, se ha desarrollado durante los últimos veinte años principalmente en Europa y en los Estados Unidos. El generador de ondas de choque electrohidráulico experimental, denominado Mexilit II, es un equipo que se ha utilizado para desarrollar mejoras a los equipos clínicos, estudiar el daño producido por estas ondas en tejidos, así como para el estudio de aplicaciones

en oncología y ortopedia. También se ha utilizado en transformación de células cancerígenas y en la destrucción de microorganismos patógenos que se transmiten por alimentos.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de la aplicación de ondas de choque, generadas electrohidráulicamente sobre la viabilidad de una cepa ácido-resistente *E. coli* O157:H7 suspendida en solución salina isotónica y jugo de naranja. Este trabajo forma parte de un proyecto más amplio que evaluará el efecto de las ondas de choque en microorganismos de interés sanitario.

2. ANTECEDENTES

Con excepción de pocos alimentos, la mayoría de ellos pierden su calidad con el paso del tiempo. La calidad comienza a perderse desde la cosecha, durante el sacrificio o manufactura o bien en cualquiera de las etapas entre la adquisición del producto fresco y el consumo del mismo. Etapas como el procesamiento, empaclado, distribución, venta, transporte, exhibición, almacenamiento y uso por el consumidor están íntimamente relacionadas con la calidad de los productos (Gould, 1996).

A principios del siglo XX, toma mayor interés la seguridad de los alimentos, para la prevención de enfermedades asociados al consumo de ellos. Debido a esto fueron desarrollados e introducidos el enlatado y la pasteurización (Tauxe, 2001).

Métodos de preservación de alimentos

El deterioro en los alimentos es producido por reacciones físicas, químicas, enzimáticas y microbiológicas. El aseguramiento de la calidad y la vida de anaquel de los alimentos depende de la reducción del nivel inicial de contaminación microbiana (McMeekin y *col.*, 1997) y de la inactivación de enzimas de los mismos. El deterioro microbiológico se puede evitar en gran medida por medio de técnicas de preservación, las cuales actúan inactivando o inhibiendo el crecimiento microbiano (Cuadro 1). Estas técnicas actúan en un rango limitado de microorganismos, ya que algunos de estos resisten dichos tratamientos (Gould, 1996).

Los métodos de conservación que inactivan a los microorganismos son la pasteurización, la esterilización, la radiación, la aplicación de alta presión hidrostática, el ultrasonido y los pulsos eléctricos (Cuadro 1). Las técnicas de preservación de alimentos juegan un papel decisivo para controlar y minimizar el crecimiento de microorganismos. El control de la inocuidad de los alimentos se facilita cuando se conocen los mecanismos de contaminación (Tauxe, 2001).

Cuadro 1. Técnicas empleadas para preservar alimentos.

Objetivo	Factores de preservación	Método de realización
Reducción o inhibición de microorganismos	Baja temperatura	Almacenamiento en frío y congelamiento
	Baja actividad de agua	Curado, desecado y conservas
	Restricción de disponibilidad de nutrientes	Emulsiones
	Bajo contenido de oxígeno	Envases al vacío, con nitrógeno y envasado con atmósferas modificadas
	Acidificación	Adición de ácidos, Fermentación
	Fermentación alcohólica	Vinificación, fortificación
	Uso de conservadores	Adición de conservadores: orgánicos, inorgánicos
Inactivación de microorganismos	Calentamiento	Pasteurización y Esterilización
	Irradiación	Radiaciones ionizantes y luz UV
	Presurización	Aplicación de alta presión hidrostática
	Electroporación	Descargas de alto voltaje
	Manotermosonificación	Aplicación de ultrasonido con altas temperaturas y presión hidrostática
	Lisis celular	Adición de enzimas bacteriolíticas

(Gould, 1996)

En la actualidad hay una tendencia a desarrollar nuevas técnicas de preservación de alimentos que proporcionen productos de buena calidad, más naturales, libres de aditivos y balanceados (Gould,1996). Estos cambios demandan la aplicación de sistemas de preservación no térmicos que no afecten las características del alimento.

Temperatura

La elevación de temperatura en períodos cortos de tiempo utilizando ya sea agua, vapor, aire caliente o microondas para lograrlo, sigue siendo la forma más común de preservación. La eficacia de los tratamientos térmicos aplicados en alimentos se basa en asumir que la mortalidad de células microbianas y la inactivación de esporas es gobernada por una cinética de primer orden (Madigan y *col.*, 1999).

Las altas temperaturas a las cuales son expuestas las células microbianas no afectan a un blanco específico, ya que la energía térmica en cualquier célula es una parte integral de un sistema complejo. Esta energía no solamente afectará la célula, sino que afectará cada constituyente individual, la estructura, las moléculas y las reacciones en la célula. Por ejemplo los ribosomas pueden perder su estructura secundaria y terciaria, mientras que las proteínas se llegan a coagular (Earnshaw y *col.*, 1995).

Una adaptación exitosa de los microorganismos a resistir la exposición al calentamiento es su habilidad de producir formas resistentes al calor, como las esporas. Gerhardt y Marquis (1989) sugirieron que la termorresistencia de las esporas se ve afectada por el contenido de agua en el protoplasma, el contenido total y específico de minerales y el tamaño de la corteza (Gerhardt y Marquis, 1989).

La reducción de temperatura es otro de los métodos más usados en nuestros días. Nosotros mismos recurrimos a él en nuestros hogares, usando el refrigerador y

el congelador para almacenar alimentos. Para explicar esto con más detalle es conveniente diferenciar los microorganismos psicrótrofos y psicrófilos. Los microorganismos psicrótrofos presentan un crecimiento óptimo entre 25 y 30°C, pero llegan a desarrollar a temperaturas cercanas a los 0°C; en contraste, los microorganismos psicrófilos, desarrollan activamente a 12-15 °C (Madigan y col., 1999).

Los mecanismos que permiten el crecimiento de organismos a bajas temperaturas envuelven básicamente modificaciones que mantienen la membrana fluidificada y la integridad estructural de macromoléculas tales como las proteínas y los ribosomas. Una de las consecuencias más importantes de los cambios que sufren la membrana lipídica es la modulación de la actividad de proteínas intrínsecas que ejecutan funciones como el transporte de iones y de nutrientes. También sufren cambios en la composición de los lípidos, aumentando la proporción de lípidos insaturados. Por ejemplo *Escherichia coli* aumenta la proporción del ácido oleico (C18:1) a costa del ácido palmítico (C16:1) (Abee y Wouters, 1999).

De igual manera, diferentes enzimas evolucionaron para lograr actividad en el frío. Mecanismos tales como una reducción de puentes de hidrógeno, de interacciones electrostáticas, del contenido de prolina y arginina, interacciones aromáticas y grupos hidrofóbicos. A bajas temperaturas el número de interacciones entre las cadenas laterales de aminoácidos disminuyen, dando como resultado una proteína mucho más flexible a bajas temperaturas (Russell, 2002).

Como ya se mencionó, están siendo exploradas y desarrolladas técnicas alternativas a los métodos térmicos, en donde se minimiza las pérdidas de nutrientes y cambios sensoriales en el producto terminado (Qin y col., 1995). A continuación se describen algunas de las características de los métodos no térmicos más estudiados hasta el momento.

Radiaciones

El uso de la energía de las radiaciones para inactivar microorganismos en alimentos fue evaluado desde 1921. Las microondas, la radiación ultravioleta (UV), los rayos X, los rayos gamma (rayos γ) y los electrones, es decir las formas de radiación electromagnética, pueden controlar el crecimiento microbiano (Potter, 1978).

Las radiaciones ionizantes penetran en un grado que varía de acuerdo con la naturaleza del alimento y las características de las radiaciones. La efectividad de las radiaciones depende de su capacidad de alterar moléculas y de su potencialidad de producir ionización, es decir, de desprender electrones de los átomos de los materiales que atraviesan (Potter, 1978).

Por ejemplo, la luz ultravioleta tiene una longitud de onda de 200 a 300 nm. Se utiliza para inactivar los microorganismos en la superficie de los alimentos. El factor que limita seriamente su aplicación en este caso es el bajo grado de penetración en los alimentos, lo cual restringe su uso a tratamientos de superficies o de alimentos líquidos que pueden exponerse a ella en capas delgadas. En cambio los rayos γ , con niveles de energía más altos penetran más profundamente, haciendo posible tratar un volumen grande de alimento (Potter, 1978).

Los rayos de alta energía dañan directamente el DNA de los organismos vivos, produciendo cambios que evitan el crecimiento y reproducción de estos microorganismos. Adicionalmente, cuando estos rayos interactúan con las moléculas de agua en un organismo, generan radicales libres que pueden causar daño, degradando y alterando el DNA y las proteínas del organismo vivo. La dosis requerida para tratar alimentos varía con el microorganismo, con el tipo de alimento, la temperatura, el oxígeno presente y el contenido de agua (Farkas, 1998).

Estas dosis no llegan a ser dañinas para los humanos y la vida de anaquel se prolonga (Cuadros 2 y 3). Las radiaciones se han utilizado con éxito en carnes, aves de corral y sus derivados, pescados, especies y productos deshidratados. Los cambios nutricionales y químicos provocados por esta técnica son limitados. Se puede mencionar que degradan las vitaminas, específicamente la tiamina (vitamina B1) y la producción de radicales libres oxidantes. También se pueden tener malos olores debido a la formación de compuestos volátiles. Esto se debe a la reacción que hay entre los lípidos y proteínas con otras especies reactivas como son átomos de hidrógeno, radicales hidroxilo y electrones.

Para lograr un alimento de calidad usando una dosis permisible de radiación y evitando cambios en las propiedades de los alimentos se han combinado las radiaciones y otros tratamientos (Cuadro 4). Esto reduce el nivel de radiación requerida y los cambios sensoriales en los alimentos.

La seguridad de consumir alimentos radiados ha sido evaluada en animales en los cuales no se observó ningún mal, y en particular, no existe teratogenicidad en ratones, hámster, ratas o conejos. Extensas pruebas nutricionales y estudios de toxicidad sobre estos animales no indican un riesgo, por lo tanto muchas agencias reguladoras alrededor del mundo han aprobado dicho proceso para la preservación de algunos alimentos (Tauxe, 2001).

Presión Hidrostática

Hite (1899) demostró que las altas presiones hidrostáticas eran capaces de destruir los microorganismos en los alimentos. La imposibilidad técnica de trabajar a nivel industrial restó interés en ese momento (Hite, 1899). En 1990 dicha técnica fue introducida en el mercado japonés por la compañía Meidi-Ya, la cual procesa alimentos con acidez elevada (Earnshaw y *col.*, 1995).

Cuadro 2. Dosis máxima de radiación ionizante para mantener las propiedades sensoriales en alimentos de origen animal.

Alimento	KGray^a
Pavo	1.50
Puerco	1.75
Res	2.5
Pollo	2.5
Camarón	2.5
Cordero	6.25

(Farkas, 1998)

^a1Gray = 100 Rad

1Rad = 100 erg/g

Cuadro 3. Dosis requerida para disminuir patógenos en Carne a temperaturas de refrigeración.

Patógeno	Valor <i>D</i> en kGray	Dosis para reducir 5-log (kGray)
<i>Campylobacter</i>	0.20	1.00
<i>Taxoplasma cysts</i>	0.25	1.25
<i>E. coli</i> O157:H7	0.30	1.50
<i>Listeria</i>	0.45	2.25
<i>Salmonella</i>	0.70	2.80
<i>Cl. botulinum</i> esporas	3.60	18.00

(Tauxe, 2001)

Cuadro 4. Efectos benéficos de varios tratamientos usados en combinación con las radiaciones.

Tratamiento	Efecto benéfico
Congelación	Previene el daño a tejidos por inmovilización de radicales libres y iones formados por las radiaciones.
Calentamiento	Inactiva enzimas, remueve el aire, incrementa la sensibilidad de la bacteria a las radiaciones ionizantes.
Exclusión del oxígeno	Detención de cambios oxidativos ocurridos en los alimentos durante las radiaciones y el almacenamiento.
Empaques con carbón	Adsorbe malos olores.
Aditivos	Actúa como inhibidor competitivo de radicales libres y iones que reaccionan con diferentes componentes de los alimentos.

(Modificado de Thakur y Singh, 1995)

La presión es una importante variable termodinámica que puede perturbar muchas estructuras biológicas y alterar procesos (Earnshaw y col., 1995). Los tratamientos consisten en aplicar sobre el alimento compresiones entre 100 y 800 MPa (megapascales), afectando diversos componentes y sistemas biológicos (Cuyás y col., 1994).

Las altas presiones pueden afectar la morfología celular, pero el efecto es muy variable entre diferentes tipos de microorganismos. Los estragos que causa dentro de la célula van desde el colapso de las vacuolas hasta la separación de la pared celular de la membrana citoplasmática (Earnshaw y col., 1995).

Es muy sencillo entender qué es lo que causa la presión en las células. Supóngase que la bacteria es como un globo con agua y que este globo es sometido a una compresión muy fuerte. Al descomprimir rápidamente, las células bacterianas sufren una expansión del material citoplasmáticos. Esto puede causar la destrucción de la pared celular y por lo tanto la muerte de la célula (Mussa y col., 1999).

Las bacterias, las levaduras y los hongos son relativamente sensibles a la presurización por debajo de 700 Mpa, pero esporas bacterianas, en especial de las especies *Clostridium*, son relativamente resistentes, al igual que las especies de *Bacillus*.

Otra de las características es que las bacterias Gram negativas y las células en fase exponencial son más sensibles que las bacterias Gram positivas y células en fase estacionaria. Las células bacterianas son más sensibles a temperaturas cercanas a los 35 °C, debido a la transición de fase de la membrana lipídica (Alpas y col., 2000). Las presiones elevadas también pueden inactivar enzimas de alimentos y alterar la textura, el color y las propiedades fisicoquímicas, especialmente en aquellos ricos en proteínas y almidón, pero esto sólo pasa cuando se excede de 345 MPa por 15 min. (Kalchayanand y col., 1998).

La eficacia de este método se ve afectada por variables como la magnitud de la presión, el tiempo y la temperatura de presurización, el tipo de microorganismo, la fase de crecimiento celular y la presencia de sustancias antimicrobianas (Alpas y col., 2000).

Cuando se aplican tratamientos insuficientes surgen células dañadas subletalmente y puede haber una posible recuperación de las misma. Esto significa un problema en la industria en términos de seguridad, si sólo se usa la presión como método de preservación (Earnshaw y col., 1995).

Se ha observado que la combinación de las altas presiones con calentamientos ligeros, influyen de manera eficaz (Abee y col., 1999). Un ejemplo de esto lo demostraron Patterson y Kilpatrick (1998) al inactivar *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* en carne de cerdo y leche a altas presiones (400-500 MPa) y con ligeros tratamientos térmicos (50°C) (Patterson y Kilpatrick, 1998).

Ultrasonido

El ultrasonido tiene la facultad de producir muerte celular. Esta propiedad se descubrió durante la guerra, cuando el sonar estaba siendo investigado como una posible herramienta de los submarinos. En los 60's la investigación se concentró en la interacción del ultrasonido con las células microbianas. Esto incluye estudios del fenómeno de cavitación, el cual esta asociado a ruptura de la membrana, incrementos localizados de temperatura y la formación de radicales libres (Earnshaw y col., 1995).

Al paso de las ondas de ultrasonido a través de un liquido, éste sufre compresiones y refracciones alternadas. Cuando el ultrasonido pasa através del líquido, las burbujas contenidas en él, vibran causando fuertes remolinos en el líquido. Estas fuerzas cortantes, actúan sobre la membrana celular causando su destrucción (Earnshaw y col., 1995).

Algunos microorganismos son más susceptibles al ultrasonido. Por ejemplo, las células Gram positivas muestran mayor resistencia, debido a que la pared celular de las bacterias Gram positivas es más ancha y contiene una capa de peptidoglicanos (Earnshaw y *col.*, 1995).

La cavitación es influenciada por varios parámetros. La frecuencia del ultrasonido es también un parámetro importante, y determina el tamaño de las burbujas. Un factor importante que disminuye la efectividad de la cavitación es la viscosidad del líquido. En productos con alta viscosidad, se reduce la cavitación (Earnshaw y *col.*, 1995).

La aplicación conjunta de energía ultrasónica con calor y presión hidrostática (Cuadro 1), ha demostrado ser una combinación efectiva para destruir células vegetativas y esporas (Gould, 1996).

Campos eléctricos pulsados

Otro método de preservación en investigación han sido los campos eléctricos pulsados. Los campos eléctricos pulsados son una modificación del proceso denominado "Proceso Electropuro", desarrollado en 1920 (Vega y *col.*, 1997). Halmilton y Sale (1967) reportaron que la inactivación microbiana puede ser debida a los campos eléctricos, por causar una pérdida irreversible de la función de la membrana. Castro y *col.* (1993) sugieren que los campos eléctricos pulsados de alta intensidad serán uno de los métodos no térmicos con mayor potencial para la pasteurización en frío.

Su modo de acción es aparentemente exponencial y actúa de manera irreversible, formando poros en la membrana celular, la cual se hincha hasta el grado en que produce lisis celular (Qin y *col.*, 1995). La formación de estos poros en la membrana depende de la intensidad de los campos eléctricos, del número de pulsos y de la duración de los mismos. Los factores extrínsecos que favorecen la eficacia de

los pulsos eléctricos son la temperatura el tratamiento, el pH, la fuerza iónica y la conductividad del medio donde serán aplicados los pulsos (Vega y col., 1997).

Hülshager y col. (1983) reportaron que las bacterias Gram positivas y las levaduras son más sensibles a los pulsos de campos eléctricos. Los investigadores recomiendan este tratamiento para alimentos líquidos (Qin y col., 1995).

Microorganismos emergentes

Un completo entendimiento de la ecología microbiana y su fisiología ofrece la mejor oportunidad para controlar a los microorganismos en alimentos (McMeekin y col. 1997). Se debe tener en cuenta que la naturaleza de los alimentos y las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's) han cambiado dramáticamente (Cuadro 5). Los avances tecnológicos tales como la pasteurización y el propio enlatado son suficientes, pero no mantienen características deseables por el consumidor, es por eso la necesidad de seguir creando nuevas tecnologías que conserve agradable al consumidor (Mead y col., 1999).

Las razones por las que aumenta el número de ETA's es probablemente el resultado de una combinación de factores (Cuadro 6; Rowan, 1999).

- a) la demografía y el comportamiento humano,
- b) la tecnología y la industria;
- c) cambios en prácticas de agricultura y el desarrollo económico;
- d) cambios en el mercadeo de alimentos y hábitos alimenticios;
- e) viajes internacionales y comerciales;
- f) incumplimiento de las medidas sanitarias;
- g) y la identificación de nuevas bacterias patógenas.

Cuadro 5. Algunas causas de enfermedades transmitidas por alimentos en EUA.

Agente causal	Ejemplos	Frecuencia
Infección bacteriana	<i>Campylobacter jejuni</i>	Común
Infección viral	Virus tipo Norwalk	Muy común
Infección parásita	<i>Toxoplasma gondii</i>	Relativamente común
Toxina de bacteria	<i>Clostridium perfringens</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Relativamente común
Toxina de alga	Ciguatera	Poco común
Micotoxina	Aflatoxinas	Poco común
Priones	BSE	Ninguno
Contaminantes inorgánicos	Metales pesados	Poco común
Contaminantes orgánicos	Residuos de pesticidas	Poco común

(Modificado de Arthur, M. H., 2002)

Cuadro 6. Factores que aumentan el riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos.

Factores generales	Factores específicos	Razones
Estilo de vida	Estrés	Cambios en el metabolismo del cuerpo, permitiendo el establecimiento del patógeno o una dosis baja de toxinas para provocar enfermedad.
	Deficiencia en higiene	Aumenta la probabilidad de ingesta de patógenos.
	Locación geográfica	Probabilidad de estar expuesto a cepas endémicas; limitado suministro de agua y alimentos, distribución variable de organismos en agua y suelo.
Dieta	Deficiencia nutricional	Consumo de alimentos de pobre calidad que pueden contener patógenos.
	Consumo de antiácidos	Disminuyen la acidez de estómago, aumentando el pH.
	Consumo de un gran volumen de líquidos incluyendo agua	Dilución de ácidos en el estómago y un rápido tránsito a través del estómago.
	Ingestión de alimentos grasos	Protección de patógenos contra el estómago conteniendo patógenos.

(Modificado de Arthur, M. H., 2002)

La vigilancia de estas ETA's es complicada debido a muchos factores, el principal es que no se reportan. Además, muchos patógenos transmitidos a través de los alimentos son también propagados por medio del agua o de persona a persona. Finalmente porque no se tiene un adecuado seguimiento de los brotes, ya que muchas veces ni siquiera se toman muestras para ser analizadas (Mead y col., 1999).

La prevención de las ETA's depende de una cuidadosa producción, manipulación del producto fresco y preparación del producto terminado. Procurando de esta manera el bienestar de la gente al cumplir con una necesidad básica (Altekruse y col., 1997).

Escherichia coli

La bacteria intestinal *E. coli* es el organismo procarionte mejor conocido. Se aisló por primera vez del tracto intestinal en 1885, por el bacteriólogo alemán Theodor Escherich. La llamó *Bacterium coli*, debido a su forma bacilar ya que *Bacterium* significa forma de barra y *coli* indicando su hábitat intestinal, el colon. En honor a su descubridor, el género *Bacterium* se cambió por *Escherichia* (Madigan y col., 1999).

Características Generales

Escherichia coli forma parte común de la microflora del tracto intestinal de los humanos y animales de sangre caliente. Es un bacilo no esporulado, Gram negativo, anaerobio facultativo, generalmente móvil y la mayoría de las cepas son fermentadoras de lactosa (Doyle y col., 2001).

Las cepas de *E. coli* son diferenciadas serológicamente ya que en su superficie puede haber tres diferentes antígenos, conduciendo así a la formación de serogrupos y serovares. Pueden encontrarse antígenos somáticos O, flagelares H (sólo para cepas móviles), y capsulares K (Fernández, 2000; Doyle y col., 2001).

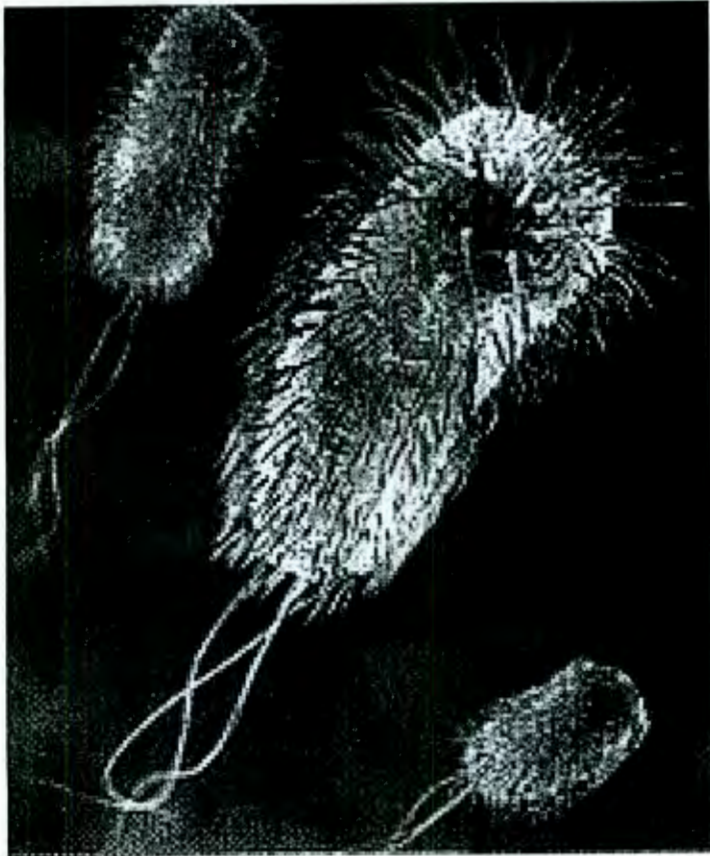


Figura 1. Fisiología de *E. coli*.

La mayoría de las cepas no son patógenas. Sin embargo, algunas cepas pueden causar enfermedad. La enfermedad puede variar desde una diarrea pasajera hasta la muerte. Se reconocen 6 categorías de *E. coli* con características propias específicas, como su virulencia, su patogenicidad, sus síndromes clínicos y su estructura antigénica (Doyle y col., 2001). Estas categorías incluyen Enteropatógena (ECEP), Enterotoxigénica (ECET), Enteroinvasiva (ECEI), Enterohemorrágica (ECEH), Enteroadherente (ECEA) y Enteroagregativa (ECEG) (Fernández, 2000). De estos grupos se distingue *E. coli* enterohemorrágica por la severidad de los padecimientos que produce.

Dentro de la clasificación de ECEH están involucrados serotipos tales como O26, O111 y la fermentadora de D-sorbitol: O157:NM, que también están asociados con casos de colitis hemorrágica, pero el principal es el O157:H7 (Doyle y col., 2001). En 1982, *E. coli* O157:H7 causó dos brotes de colitis hemorrágica. A partir de ese momento, fue reconocida como patógeno humano.

Según Whittam (1996), *E. coli* O157:H7 se originó de un ancestro O55:H7 a través de una recombinación y transferencia horizontal. El ancestro O55:H7 fue probablemente una *E. coli* enteropatógena, la cual presenta factores de adherencia provocando lesiones en las vellosidades intestinales. Al igual adquirió genes citotóxicos de *Shigella dysenteriae* tipo 1 como resultado de una infección con toxina Shiga (Sheridan y McDowell, 1998).

E. coli O157:H7 posee algunas características que no se dan en la *E. coli* típica; como por ejemplo, la incapacidad para crecer arriba de los 44.5 °C, de fermentar el sorbitol dentro de 24 horas, de no producir β -glucuronidasa, base para la reacción de MUG (Glosario), reacción muy utilizada para identificar *E. coli* (Doyle y col., 2001).

Se cree que los alimentos con pH's bajos son seguros contra microorganismos patógenos y deterioradores; este no es el caso con *E. coli* O157:H7. Se ha observado que puede sobrevivir en algunos alimentos ácidos como la sidra, la

mostaza y la mayonesa. Su pH óptimo está alrededor de 7 y puede crecer en un rango entre 4.5 y 9 (Hsin-Yi y Chou, 2001). El pH mínimo de crecimiento se encuentra entre 4.0 y 4.5, pero es dependiente de otros factores de crecimiento, como es el del tipo de acidulante y la temperatura (Cuadro 7). Estudios con ácidos orgánicos revelaron que una concentración de 1.5% de ácido láctico, cítrico, acético sobre carne, no afecta apreciablemente las poblaciones de este microorganismo (Doyle y *col.*, 2001).

Las células inducidas a la ácido tolerancia tienen una mayor resistencia a ambientes estresantes. Tsai y Ingham (1997) reportaron que la adaptación ácida y las bajas temperaturas aumentan la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* en salsa catsup (Hsin-Yi y Chou, 2001).

E. coli O157:H7 muestra un activo desarrollo a temperaturas entre los 30 y 41 °C, con escaso crecimiento a 44-45°C (Fernández, 2000). La pasteurización es suficiente para matar a este microorganismo. Por seguridad, en las carnes se requiere de un calentamiento de al menos 68.3 °C en la parte interna del alimento por algunos segundos. Las dos características anteriores indican que no es un organismo termodúrico (Doyle y *col.*, 2001). La temperatura mínima de crecimiento en condiciones óptimas es entre los 8 y 10°C (Fernández, 2000).

Reservorios

Los animales de granjas, especialmente los rumiantes son el principal reservorio de *E. coli* enterohemorrágica (Dingman, 2000). *E. coli* O157:H7 se ha aislado de ovejas, cabras, vacas, perros, cerdo, gato, gaviotas y ratas. Donde más se ha aislado este microorganismo es del agua que consumen estos animales y del suelo. Las frutas y vegetales crudas que estén en contacto con el suelo y con el estiércol (Strachan y *col.*, 2001; Uljas y Ingham, 1999).

Cuadro 7. Crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 a diferentes pH con 6 diferentes ácidos y a diferentes temperaturas por 21 días.

Temp (°C)	pH	Control	Málico	Tartárico	Cítrico	Láctico	Acético	Mandélico
4	4.0		-	-	-	-	-	-
	4.5		-	-	-	-	-	-
	5.0		-	-	-	-	-	-
	5.5		-	-	-	-	-	-
	7.0	-						
10	4.0		-	-	-	-	-	-
	4.5		-	-	-	-	-	-
	5.0		-	-	-	-	-	-
	5.5		+	+	+	+	-	+
	7.0	+++						
25	4.0		-	+	-	-	-	-
	4.5		+++	+++	-	+	-	-
	5.0		+++	+++	+++	+++	+	+
	5.5		+++	+++	+++	+++	+++	+++
	7.0	+++						
37	4.0		-	++	-	-	-	-
	4.5		+++	+++	+++	+	-	-
	5.0		+++	+++	+++	+++	+	-
	5.5		+++	+++	+++	+++	+++	+++
	7.0	+++						

(Modificada de Conner y Kotrola, 1995)

- No creció
- + Poco crecimiento
- ++ Buen crecimiento
- +++ Excelente crecimiento

Los factores ambientales, tales como el agua, las fuentes de alimentos, o las mismas prácticas de manejo dentro de las granjas y ranchos, juegan un importante papel importante para la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7 (Doyle y col., 2001).

Vehículos

El principal vehículo implicado con *E. coli* O157:H7 es la carne cruda o mal cocida. Un segundo vehículo, que está directamente relacionado con el ganado vacuno, es la leche cruda. Últimamente se ha visto que el agua mal saneada es un vehículo de este microorganismo (Linton y col., 1999).

Alimentos ácidos tales como los jugos de frutas y la sidra, ambos sin pasteurizar, también son vehículos de este patógeno. Mayonesa y yogur de igual manera se han visto implicados como vehículos de algunos brotes (Hsin-Yi y Choun, 2001). Varios estudios confirmaron que *E. coli* O157:H7 no se multiplica en mayonesa, pero sobrevive a 5°C durante 55 días (Feng, 1995).

Las formas en como se ha dado la contaminación de estos alimentos son principalmente por el contacto del alimento con la materia fecal del ganado. Un ejemplo de esto son las manzanas recogidas del suelo que posteriormente son utilizadas para la elaboración de sidra o jugo de manzana. Otra manera en la que se dá la transmisión, es persona a persona, y por último, al ingerir agua (Doyle y col., 2001).

Patogenicidad

La patogenicidad de ECEH está asociada con algunos factores de virulencia; principalmente, la producción de dos citotoxinas, su capacidad para adherirse a las células epiteliales del intestino grueso, de formar lesiones, así como la producción de hemolisina (Heuvelink y col., 1999).

Las toxinas de ECEH tienen un efecto citotóxico sobre las células Vero, por lo que se abrevian VT1 y VT2 (Coia, 1998). Debido a que la VT1 es estructural y bioquímicamente similar con la clásica toxina producida por *S. dysenteriae*, de la cual nada más difiere en un sólo aminoácido, también se nombran toxinas Shiga (Stx), (Kimmitt y col., 2000).

Las toxinas Shiga están constituidas por la unión de 5 subunidades B de 8 kDa, cada una, dispuesta en forma de un pentámero, en asociación con una subunidad A activa de 32 kDa, que interactúa con receptores específicos en la superficie de la célula afectada (Coia, 1998.). La subunidad A se puede dividir en dos fragmentos. El fragmento A1 de 28 kDa es enzimático y el péptido A2 de 4 kDa sirve para unir la subunidad A al pentámero B. Las subunidades A permanecen unidas por un enlace disulfuro (Doyle y col., 2001).

La toxina es introducida vía endocitosis, por medio del pentámero B, ya que tienen afinidad por un receptor glicolípido (Gb₃), el cual está presente en la superficie de las células eucarióticas. Una vez adentro del citoplasma, donde es transportado a el aparato de Golgi y posteriormente al retículo endoplásmico, la función de la subunidad A es la inactivación enzimática del ARN 28S dentro de la subunidad ribosomal 60S (Coia, 1998.). Específicamente, la subunidad A1 es un N-glicósido el cual remueve a un solo residuo de adenina del 28 rARN del ribosoma. La eliminación de un sólo nucleótido trunca la cadena peptídica, resultando así la supresión de la síntesis de proteínas y, por último, la muerte celular (Doyle y col., 2001; Nataro y Kaper, 1998).

En estudios recientes se ha demostrado que la inducción de la respuesta SOS provocada por agentes antimicrobianos, particularmente los quinolonas, el trimetoprima y la furazolidona, induce el gene de expresión de la toxina. La cual tiene un efecto contrario al de sanar, aumentando la producción de toxina (Kimmitt y col., 2000).

Las lesiones de unión y destrucción son caracterizadas por una íntima unión de la bacteria con las células intestinales, produciendo así la eliminación de las microvellocidades y la acumulación de actina filamentosa (Doyle y col., 2001). Se requiere de un número de factores para producir estas lesiones. El más importante es el llamado sitio de destrucción. Este sitio consiste de tres segmentos: el gen *eae*, el cual codifica para una proteína llamada *intimina*, que es necesaria para la unión íntima entre la bacteria y la célula huésped. Segundo, la secreción de proteínas *EspA*, *EspD* y *EspB*, las cuales conducen a la formación de la lesión. También interviene el gen *tir*, el cual interactúa como receptor de la proteína *intimina*, y, por último, un sistema de secreción tipo III, el cual es esencial para la translocación de todas las proteínas envueltas, las cuales se requieren para la formación de la lesión (Beltrametti y col., 2000).

Escherichia coli O157:H7 posee un plásmido (pO157) de 93.6 a 104 kb, contienen secuencias de ADN común a los plásmidos presentes en otros serotipos de ECEH aislada de los pacientes con colitis hemorrágica. Debido a las similitudes de los diferentes serotipos de ECEH, el plásmido ha sido asociado con la patogénesis del microorganismo. Posiblemente sea requerido para la adhesión a las células epiteliales, pero aún no está comprobado (Doyle y col., 2001).

La hemolisina de ECEH pertenece a un grupo de exoproteínas. Su toxicidad es debida a la inserción de la hemolisina dentro de la membrana citoplasmática, afectando la permeabilidad de la célula. Otros han reportado que producen lisis de eritrocitos, para liberar hierro del grupo hemo y hemoglobina. El sistema perox-catalasa de esta bacteria, cuyo producto es una enzima que protege a la bacteria contra el estrés oxidativo, también juega un papel importante dentro de los factores de virulencia. (Doyle y col., 2001; Nataro y Kaper; 1998).

Las enfermedades que produce *E. coli* O157:H7, presentan diferentes manifestaciones clínicas, que van desde una simple diarrea, hasta el síndrome

urémico hemolítico (SUH) y la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), siendo estos últimos dos, los padecimientos más severos (Doyle y col., 2001).

El período de incubación de este organismo tiene un rango de 2 a 12 días. Los primeros síntomas son una diarrea con dolores abdominales, posteriormente se desencadenan evacuaciones acompañadas de sangre. Los síntomas usualmente desaparecen después de una semana, pero alrededor del 6% de los pacientes desarrollan el SUH (Doyle y col., 2001).

El SUH es la complicación más importante. El síndrome es caracterizado por el daño en las células endoepiteliales del riñón, una hipertrofia de las células de los capilares glomerulares y por último la formación de un trombo, obstruyendo la microcirculación capilar y glomerular, provocando una necrosis glomerular y tubular (Doyle y col., 2001). Por esta razón, la mitad de los enfermos necesitan diálisis y el 75% requiere de transfusiones. Aproximadamente el 5% de los pacientes con SUH mueren. Esta enfermedad principalmente afecta a los niños entre 2 y 10 años de edad, los ancianos y las personas inmunodeprimidas (Coia, 1998).

La PTT afecta principalmente a adultos y se acompaña de distintas anomalías neurológicas, provocando un coagulo en el cerebro (Doyle y col., 2001). El SUH y la PTT pueden dañar otros órganos, como son: el cerebro, el miocardio y el páncreas; desarrollando encefalopatía, cardiomiopatía y diabetes mellitus (Coia, 1998).

Análisis realizados a diversos alimentos infectados con *Escherichia coli* O157:H7 revelan una dosis muy baja para producir enfermedad. Por ejemplo, en 1993, en un brote ocurrido en el oeste de Estados Unidos se enumeraron entre 0.3 y 15 unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) del patógeno en lotes de carne. De igual manera, en paquetes de salami se detectó una población de 0.3 a 0.4 UFC/g de *E. coli* O157:H7. Estos datos sugieren que la dosis infectante de *E. coli* O157:H7 es menor a 100 células (Doyle y col., 2001).

Brotos

Datos publicados por agencias de salud estadounidenses reportan que aproximadamente 10,000 a 20,000 casos de enfermedades anuales son ocasionados por *E. coli* O157:H7, con un promedio de muerte de 200 a 500 (Fratamico y Strobaugh, 1998). Los daños producidos tienen un costo de 250 a 500 millones de dólares anuales. El número de brotes ha ido en aumento de un promedio de 2 por año de 1982 a 1992 (Cuadro 8) hasta 29 anualmente entre 1993 y 1998 (Doyle y col., 2001).

El primer brote causado por ECEH fue en 1982. Se debió al consumo de hamburguesas mal cocidas de una cadena de restaurantes de comida rápida. Un segundo brote ocurrió después de tres meses, en la ciudad de Michigan, igualmente el vehículo fue la carne contaminada y consumida en la misma cadena de restaurantes (Doyle y col., 2001). Durante los siguientes 10 años aproximadamente 30 brotes fueron reportados en los Estados Unidos y Europa (Cuadro 9). A principios de 1993, *E. coli* O157:H7 provocó un gran brote, en donde se vieron afectadas más de 700 personas a lo largo de 4 estados de la Unión Americana (Feng, 1995).

En 1994, se implicó al salami en un brote ocurrido en el estado de Washington. Estudios previos dieron a conocer que *E. coli* O157:H7, sobrevivía a todas las condiciones que sufría el embutido durante su fermentación y almacenamiento en frío (Feng, 1995).

Los vegetales crudos, particularmente la lechuga y el germen de alfalfa, han sido implicados en algunos brotes de *E. coli* O157:H7 en Estados Unidos, Europa y Japón. En mayo de 1996, en los estados de Illinois y Connecticut se identificaron 47 casos con *E. coli* O157:H7, este brote fue asociado con lechuga contaminada (Doyle y col., 2001).

Cuadro 8. Número de brotes reportados y número de casos de infecciones de *E. coli* O157:H7 en EUA, 1982-1998.

Año	No. de brotes	No. de casos
1982	2	47
1984	2	70
1986	2	52
1987	1	52
1988	3	153
1989	2	246
1990	2	75
1991	4	54
1992	4	75
1993	17	1000
1994	32	543
1995	32	455
1996	29	488
1997	22	298
1998	42	477

(Modificado de Doyle y col., 2001)

Cuadro 9. Resumen de algunos brotes de infección por *E. coli* O157:H7 transmitidos por alimentos.

País	Año	Alimento	No. de casos	No. de muertes
EUA	1982	Carne molida	26	0
EUA	1982	Carne molida	21	0
EUA	1984	Carne molida	34	4
Can	1985	?	5	0
Can	1985	Sandwich	73	19
GB	1985	Papas crudas	24	0
EUA	1986	Carne molida	37	2
Can	1986	Leche cruda	46	0
EUA	1987	Carne molida	51	4
GB	1987	Rollo de pavo	26	0
EUA	1988	Rosbif	61	0
EUA	1989	Agua	243	4
EUA	1990	Rosbif	70	0
EUA	1990	Lunch escolar	10	0
EUA	1991	Sidra	23	0
EUA	1991	Agua de alberca	21	0
EUA	1993	Hamburguesa	732	4
GB	1993	Yogur	16	0
EUA	1994	Salami	26	0
JAP	1996	Germen de rábano	7966	3
EUA	1996	Jugo de manzana	71	1
GB	1996	Carne cocida	<501	21
EUA	1997	Helado	3	0
EUA	1998	Ensalada de col	142	0
EUA	1999	Pozo de agua	900	2

(Modificado de Fernández, 2000)

Can=Canada, EUA= Estados Unidos de América, GB=Gran Bretaña, JAP= Japón.

De mayo a agosto de 1996, en Japón se reportaron aproximadamente 10,000 casos de *E. coli* O157:H7. La mayoría de los casos ocurrieron en un *jardín de niños*, por supuesto afectando a niños pequeños. Un poco más tarde, en una fábrica ubicada a 50 km de donde ocurrió el brote en el *jardín de niños*, ocurrió otro brote afectando a trabajadores de alrededor de 24 años. Investigaciones de las autoridades sanitarias japonesas indicaron que la causa más probable fue el germen de rábano contenido en una ensalada, el cual estaba contaminado desde la cosecha (Watanabe y col., 1999).

En 1991, por primera vez se implicó como vehículo de este patógeno a la sidra y al jugo de manzana sin pasteurizar. Ocurrió en Massachusetts, involucrados 23 casos con *E. coli* O157:H7 (Dingman, 2000). En 1996, tres brotes fueron reportados a lo largo de tres estados del oeste de EU y Canadá con 71 casos confirmados y una muerte, donde se implicó tanto jugo de manzana sin pasteurizar como sidra (Doyle y col., 2001). Estudios recientes han demostrado la sobrevivencia en sidra de este patógeno a temperaturas de 8 °C por 10 a 31 días (Feng, 1995).

Los brotes donde está implicada el agua han aumentado en los últimos años, involucrando agua de alberca, agua para beber, pozos de agua y hielo (Doyle y col., 2001). En Estados Unidos, el primer brote provocado por beber agua fue en 1989 en Missouri (Olsen y col., 2002). En un brote en Nueva York en 1999, más de 900 personas estaban infectadas, 65 de las cuales fueron hospitalizadas y 2 murieron. El agua para beber, no fue debidamente clorada (Doyle y col., 2001).

Los brotes causados por esta bacteria suceden con más frecuencia en los meses cálidos del año, de mayo a octubre (Doyle y col., 2001). En invierno, la tasa de enfermedades provocadas por este patógeno disminuye drásticamente (Hancock y col., 2001).

Aislamiento e identificación

Para el aislamiento y la identificación del serotipo O157:H7 deben mencionarse las características propias de este patógeno. *E. coli* O157:H7 fermenta rápidamente la lactosa. Fermenta lentamente D-sorbitol, por lo cual se usa el agar MacConkey-sorbitol (MCS), como un medio selectivo. Este microorganismo produce colonias de color pálido sobre agar MCS.

Se han hecho modificaciones al agar MCS agregando cefixime para inhibir *Proteus* y ramnosa ya que *E. coli* O157:H7 no la fermenta. En Inglaterra, laboratorios clínicos emplean agar MCS con cefixime y telurio para inhibir *Plesiomonas*, *Aeromonas*, *Morganella* y *Providencia*.

También se ha utilizado agar MCS con MUG (Glosario) o con bromo-cloro-indolil (BCIG), ambas pruebas explotan la incapacidad de *E. coli* O157:H7 de producir β -glucoronidasa (Coia, 1998).

La aglutinación de anticuerpos es un ensayo muy específico, dando una confirmación serológica los microorganismos. En el laboratorio el suero anti-O157 es usado para identificar el serotipo O157:H7. El ensayo PCR identifica también el serotipo O157:H7 y el tipo de Stx de la muestra (Feng, 1995).

Una completa caracterización de este patógeno debe incluir la detección y tipificación de toxinas, ya sea con células Vero, por hibridación de sondas de ADN específico, o por métodos de reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Coia, 1998).

Jugo de naranja

Las bebidas naturales, como es el caso de los jugos de frutas, son consumidas regularmente en todo el mundo. Los jugos son un componente importante de la dieta diaria de los humanos, ya que traen beneficios a la salud. Por ejemplo, los polifenoles y flavonoides contenidos en las frutas tienen efectos positivos para prevenir el cáncer (Ekmekcioglu y *col.*, 1999).

El jugo de fruta fresco es aquel líquido obtenido del fruto maduro y que no ha sufrido ningún tratamiento para su conservación después de su extracción. La mayoría de los consumidores valoran más un jugo fresco por su sabor natural (Pao y Davis, 2001).

El jugo de naranja es uno de los jugos de frutas más consumido en todo el mundo gracias a su agradable sabor, a su contenido en vitamina C, y por los beneficios que ofrece a la salud. Sin embargo, el jugo va sufriendo cambios no deseables desde el primer instante en que es extraído de la fruta, ya sea por microorganismos, enzimas presentes en el fruto, el oxígeno o la luz y el calor (Jia y *col.*, 1999).

Composición

La naranja es un fruto de árboles cítricos, proveniente del viejo mundo, pertenecientes a la especie *Citrus sinensis*. La anatomía de la naranja es una consideración importante, ya que las diferentes partes contienen compuestos saborizantes volátiles, azúcares, enzimas, ácidos, proteínas, grasas, pigmentos y vitaminas que le van a dar al jugo fresco características únicas de sabor, color, estabilidad y, por su puesto, de valor nutritivo (Potter, 1978). Por ejemplo, la cáscara o flavedo contiene aceites que son deseables en el jugo en cantidades limitadas. Al mismo tiempo, éstos y las semillas contiene componentes amargos que están presentes en el jugo si se exprime demasiado.

El jugo de naranja contiene principalmente agua (82 a 90%), además 11.8% de sólidos, 0.38% de cenizas, 0.06% de extracto etéreo (Cuadro 10 y 11), 0.65% de proteínas, 0.05% de fibra cruda y 10.7% de carbohidratos (Cuadro 12). Nos aporta 41 cal por cada 100 ml. de jugo. Tiene un alto contenido de vitamina C y ácido fólico, así como pectina y flavonoides, dichos compuestos dan un aporte extra a la salud aparte de nutrir, como tener efectos protectores contra enfermedades cardiovasculares (Desrosier, 1992).

El aroma y sabor (Cuadro 13) característico de los jugos es un atributo importante, resultado de muchos constituyentes volátiles presentes en proporciones apropiadas (Shaw y Moshonas, 1997; Jordan y *col.*, 2001). El sabor de la naranja consiste de más de 200 constituyentes, tales como carbohidratos, aldehídos, ésteres, cetonas y alcoholes. Según diferentes autores, los principales compuestos que contribuyen al sabor son: acetaldehído, citral, butirato de etilo, limoneno, linalol, octanal y el α -pipeno (Moshomas y Shaw, 1994; Fennema, 1996; Jia y *col.*, 1999).

Microflora más común

Los jugos de frutas son considerados como alimentos con mínimo riesgo a la salud, debido a su bajo pH y a su alto contenido de ácidos orgánicos. Sin embargo, los jugos sin pasteurizar han provocado brotes en donde se han visto involucrados *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 y *Cryptosporidium parvum*. Al presentarse estos brotes, la FDA en 1998, introdujo la regulación para jugos de frutas sin pasteurizar, la cual requiere en la etiqueta una advertencia “jugo sin pasteurizar”, o demostrar que el tratamiento que recibió el jugo es capaz de reducir al menos 5 log₁₀ UFC/ml (Yamamoto y Harris, 2001).

Las frutas y verduras están expuestas a los microorganismos antes, durante y después de su cosecha, aunque estén protegidos en su superficie por una cubierta cerosa que impide el paso al interior. Cuando una fruta es golpeada o sufre presiones debido al mal manejo, aparentemente no muestra daño; sin embargo, las

Cuadro 10. Alcoholes presentes en jugo de naranja.

Alcohol	Características	Referencia
Etanol	Indica la madurez de la fruta. El etanol es un producto de fermentación microbiana. El valor límite es de 3 g/l en jugos.	IFU52 ^a , MEBACK ^b
Glicerol	Puede ser producido tanto por <i>botrytis</i> como por levaduras. El valor límite recomendado de glicerol es < 1 g/l.	OIV ^c , MEBAK, IFU77

^a Federación Internacional de Productores de Jugos de Frutas (IFU por sus siglas en inglés).

^b Comité Centro Europeo Cerveceros, por sus siglas en inglés.

^c Oficina Internacional del Vino.

Cuadro 11. Ácidos presentes en jugo de naranja.

Ácido	Características	Referencias
Ácido L-málico	Su concentración depende de la variedad y la madurez de la fruta. Para jugo de naranja debe ser de 0.8-3.0 g/l.	AOAC ^a , IFU21 ^b ,EN1138 ^c
Ácido D-/L-láctico	Indica fermentación microbiológica. En jugos de naranja el valor límite es de 0.5 g/l.	IFU53,ISO 8069 ^d , EN12631
Ácido acético	Es utilizado como aditivo en jugos de frutas, también indica actividad microbiana. El valor máximo de este ácido en jugo de naranja es de 0.4 g/l.	EN12632, ISO 11213, IFU66
Ácido fórmico	Puede estar presente por actividad microbiana y se puede utilizar como conservador.	MEBAK ^e
Ácido cítrico	Las concentraciones características de cada fruta dependen de la variedad y del grado de madurez; la concentración típica para jugo de naranja es de 6.3-17.0 g/l. Este ácido es también un aditivo por lo que el valor límite para ser agregado es de 3 g/l.	IFU22, EN1137, AOAC, ISO 2963
Ácido L-ascórbico	El contenido natural de este ácido en jugo de naranja fresco es entre 400 y 500 mg/L. La concentración mínima debe ser de 200 mg/l.	IFU54, EN 1139

^a Asociación Americana de Químicos Analíticos, por sus siglas en inglés.

^b Federación Internacional de Productores de Jugos de Frutas (IFU por sus siglas en inglés).

^c Norma Europea, por sus siglas en inglés.

^d Organización Internacional de Estandarización, por sus siglas en inglés.

^e Comité Centro Europeo Cervecerero, por sus siglas en inglés.

Cuadro 12. Azúcares en el jugo de naranja.

Azúcar	Características	Referencia
D-glucosa/D-fructosa	La concentración de fructosa en jugo de naranja debe de ser 20-50 g/l. Esta relación es prácticamente constante en jugo de naranja, una relación menor a 0.85 significa descomposición de la glucosa por fermentación.	IFU55, EN1140, AOAC
Sacarosa	La concentración de sacarosa en jugo de naranja debe ser 10-50 g/l.	IFU56,EN12146
Sacarosa/D-glucosa/D-fructosa	Los azúcares más comunes en el jugo de naranja son glucosa, fructosa y sacarosa. El 50% de los azúcares totales debe ser glucosa, proporcione fuera de esto parámetros indica adición de edulcorantes en jugo de naranja.	IFU55/86IOCCC ^e , D, AU, F

^a Federación Internacional de Productores de Jugos de Frutas (IFU por sus siglas en inglés).

^b Organización Internacional de Estandarización, por sus siglas en inglés.

^c Norma Europea, por sus siglas en inglés.

^d Asociación Americana de Químicos Analíticos, por sus siglas en inglés.

^e Oficina Internacional para Cacao, Chocolate y Confitura, por sus siglas en inglés.

Cuadro 13. Compuestos volátiles identificados en jugo fresco de naranja.

Compuesto	mg/l ^a
Acetato de etilo	0.09±0.13
2-butanona	16.71±0.07
α-pineno	0.45±0.04
Butanoato de etilo	0.03±0.72
2-metil-3-buten-2-ol	0.13±0.07
Hexanal	0.07±0.71
β-pineno	0.21±0.03
3-careno	0.14±0.02
β-mirceno	1.78±0.03
Limoneno	88.9±0.01
Octanal	2.31±0.03
Nonanal	0.42±0.1
Ácido acético	0.38±0.06
Furfural	0.21±0.78
Linalol	0.58±0.0
1-octanol	0.05±0.07
5-metil-2-furfural	0.05±0.73
4-terpineol	0.37±0.04
Ácido butanóico	0.07±0.76
β-terpineol	0.07±0.18
α-terpineol	0.33±0.02

(Modificado de Tonder y *col.*, 1998)

^a ± la razón de la desviación estándar entre la media

células afectadas inician una serie de mecanismos que se traducen en el ablandamiento, pérdida de humedad, cambios de color, sabor y aroma, originando que los microorganismos ingresen fácilmente al interior del fruto (Fernández, 2000).

En la precosecha hay que vigilar el agua de riego, la presencia de materia fecal humana o animal, el abono utilizado, el aire y capacitar a las personas que cuidan los cultivos. Después de la cosecha hay que mantener el equipo, la maquinaria y los recipientes limpios; los hábitos de los trabajadores y libre de polvo los alrededores así como el vehículo de transporte (Fernández, 2000).

La principal fuente de contaminación de este jugo son las poblaciones acumuladas en la superficie de este cítrico y el equipo mal saneado (Weagant y Feng, 2002). La superficie de las frutas cítricas aproximadamente contiene cerca de 10^4 UFC/cm² de microorganismos aeróbicos. Una pequeña porción de la microflora natural de la superficie del jugo es introducida al momento de extraer el jugo. Al cortar el fruto se dan dos efectos indeseables: la liberación enzimática provocando cambios en el color y una intensa actividad microbiana (Fernández, 2000; Pao y Davis, 2001).

Los niveles iniciales de microorganismos en las frutas pueden reducirse al lavarse, pero incrementará cuando se extraiga el jugo, ya que al mismo tiempo se liberan compuestos que agilizan la reproducción de los microorganismos. Los niveles iniciales microbiológicos en jugo fresco varían de 1.3 a 5.3 log UFC/ml (Pao y Davis, 2001).

El pH ácido tiene un efecto seleccionador sobre el tipo de microorganismos que crecerán. Podemos encontrar tres clases de microorganismos en el jugo: levaduras, hongos y bacterias ácido tolerantes (Winniczuk y Parish, 1997; Fernández, 2000).

Las levaduras más comunes en el jugo son las del género *Saccharomyces*. Se pueden encontrar hongos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, entre otros. Las bacterias ácido tolerantes incluyen las especies *Lactobaccillus* y *Leuconostoc*, las cuales son bacterias ácido lácticas. De bacterias ácido acéticas tenemos especies como *Acetobacter* y *Gluconobacter* (Winniczuk y Parish, 1997).

Modo de preparación

Los jugos de frutas en general se extraen manualmente o con exprimidores para su consumo inmediato en el hogar y restaurantes, o bien, en la industria se procesan para disminuir la carga microbiana, inactivar enzimas y de esta manera alargar su vida de anaquel (Fernández, 2000; Farnworth y col., 2001). Por ejemplo, el jugo de naranja fresco sin pasteurizar tiene una duración de aproximadamente 12 días manteniéndolo a 4.4 °C. Esto puede variar de acuerdo a la concentración inicial de microorganismos y al pH del jugo (Linton y col., 1999; Farnworth y col., 2001).

Las altas temperaturas utilizadas en los procesos térmicos como en la pasteurización, desafortunadamente hacen que se reduzca la calidad nutricional, así como el sabor y el aroma (Jia y col., 1999). Un tratamiento efectivo para el jugo de naranja debe ofrecer frescura y calidad. Proponer tratamientos no térmicos para la sanitización del jugo incluye técnicas de exposición a la luz ultravioleta, alta presión, pulsos eléctricos, radiación, congelación o la combinación de estos métodos (Yamamoto y Harris, 2001).

Cuando la naranja llega a una planta o al hogar para ser procesada, lo primero que se debe de hacer es lavarla. Posteriormente se clasifica de acuerdo a su tamaño y calidad, rechazando la fruta deteriorada. Luego la naranja pasará a los extractores, dicha maquinaria primero rasga la cáscara; esto con efecto de obtener aceites que amargan el jugo. Después se corta un tapón en la parte inferior de la fruta. El jugo es exprimido a través del hoyo que deja este tapón, la cáscara y el tapón son desperdicios. El jugo obtenido pasa a través de unos coladores para eliminar semillas

y un poco de pulpa. Aquí ya está listo el jugo para pasar a los pasteurizadores e inactivar enzimas y microorganismos o es refrigerado o congelado para alargar su vida de anaquel (Potter, 1978).

Hay otras formas para mantener el jugo de naranja fresco y libre de deterioro como la aplicación de altas presiones. Parish (1998) obtuvo jugo de naranja sin alterar su frescura, sabor y aroma después de tratarlo con 400 MPa. Lo que no modificó este tratamiento fue la actividad de la enzima pectinmetilesterasa (Parish, 1998). Otro tratamiento que está siendo investigado para tratar el jugo de naranja, con el cual no hay pérdida de compuestos volátiles son los campos eléctricos pulsados (Jia y col., 1999).

Beneficios nutricionales

El jugo de naranja no solo aporta vitamina C, sino también posee sales minerales benéficas para nuestro equilibrio físico y emocional, como el hierro, el potasio, el magnesio, el fósforo y el calcio, entre otros. Una dieta en la que se incluya un vaso diario de jugo de naranja puede ayudarnos en tratamientos como por ejemplo: catarros, mala digestión, inflamaciones intestinales, flatulencias, trastornos urinarios, cicatrizaciones, obesidad y hasta efectos benéficos contra el cáncer.

La vitamina C es una gran aliada para evitar y enfrentar una gripe, por su función como estimulante de las defensas naturales del organismo. Ayuda también en la formación y conservación de huesos y dientes y en la cicatrización de heridas. Esta vitamina fácilmente se degrada a condiciones ambientales, por lo que debemos consumirla de alimentos frescos.

La fibra que contiene las naranjas puede ayudar al tratamiento y prevención de muchas enfermedades como cáncer de colon, enfermedades del corazón, obesidad, diabetes y desordenes gastrointestinales. Por ejemplo, se ha visto que la pectina que forma parte de la fibra dietaria disminuye los niveles de colesterol en la

sangre, específicamente disminuyendo las lipoproteínas de baja densidad. Los residuos que resultan de la extracción del jugo de la fruta son una excelente fuente de fibra. Desafortunadamente no se consumen habitualmente (Grigelmo y Martín, 1999).

Otro constituyente importante del jugo de naranja son los compuesto fenólicos ya que estos en sus diferentes formas como por ejemplo los flavonoides han reportado tener efectos antitrombóticos y contra el cáncer, al igual que presentan propiedades antioxidantes. El limoneno es un monoterpeno presente en el jugo de naranja que también ha demostrado ser eficaz contra la prevención y tratamiento del cáncer (Kris y *col.*, 2002).

Ondas de choque

En esta parte se tratará brevemente la litotripsia extracorporal por ondas de choque, es decir, la fragmentación de cálculos renales. Esta es una de las principales aplicaciones médicas de las ondas de choque.

La presencia de cálculos en las vías urinarias se conoce desde la Antigüedad. En la segunda mitad del siglo XIX las únicas opciones terapéuticas para el tratamiento de la litiasis (Glosario) eran la cirugía abierta y la endoscopia. Esto cambió radicalmente en la década de los 80's, gracias al desarrollo de la litotripsia extracorporal. La idea es emitir ondas de choque a través del cuerpo humano y concentrar la energía sobre el cálculo, fragmentándolo sin lesionar tejidos (Loske y Prieto, 1999).

Desde el primer tratamiento realizado a un humano por Chaussy (1982) en Alemania, miles de pacientes se han beneficiado con esta técnica en todo el mundo. En la actualidad se siguen investigando otras aplicaciones médicas como la destrucción de tumores malignos, el tratamiento de la pseudoartrosis y casos de cicatrización lenta en fracturas óseas, además del estudio de los efectos de las ondas de choque sobre células bacterianas (Loske y col., 2000), objeto de esta tesis.

Antecedentes históricos

En 1951, Riber propuso por primera vez la generación de ondas de choque por descargas eléctricas en agua y su concentración por medio de un reflector elipsoidal y sugirió su uso para la destrucción de tumores, sin embargo, el primero en usar el método electrohidráulico fue Goldberg en 1959 (Loske y Prieto, 1999).

Los avances más relevantes en litotripsia extracorporal por ondas de choque se dieron en los años 70, en Alemania. E. Häusler, en colaboración con el urólogo M.

Ziegler, realizó las primeras pruebas *in vitro* de desintegración de cálculos renales (Ziegler y *col.*, 1986; Loske y Prieto, 1999).

Entre 1974 y 1978 Ch. Chaussy y colaboradores efectuaron estudios con tejidos, para analizar la posible aparición de lesiones en tejidos circundantes (Ruiz y Ibarz, 2002). Dentro de este período la Universidad de Munich en colaboración con la compañía Dornier Systems y el Instituto de Investigaciones Quirúrgicas de dicha universidad, desarrollan el primer litotriptor funcionando con el principio de descargas eléctricas en agua. En 1980 se realizó el primer tratamiento con éxito (Loske y Prieto, 1999).

A finales de 1984 la Food and Drug Administration (FDA) aprobó la utilización del equipo Dornier HM3, lo cual propició una rápida difusión del método en todo el mundo (Ruiz y Ibarz, 2002).

Aún en nuestros días, continúan las investigaciones de aplicaciones médicas de las ondas de choque alrededor del mundo y nuestro país no es la excepción. En la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con el objeto de desarrollar mejoras en litotripsia extracorporal, se fundó en 1987 el Laboratorio de Choques Débiles del Instituto de Física (Loske y *col.*, 1998).

Este laboratorio se creó con el objetivo de encontrar nuevas aplicaciones de ondas de choque en medicina; construir un generador de ondas de choque experimental y sugerir mejoras a los equipos clínicos. A través de los años se han logrado estos objetivos. El generador de ondas de choque Mexilit II no solamente ha servido para investigar algunos parámetros físicos de las ondas de choque, sino también para realizar investigación sobre daños a tejidos, a tumores malignos y células bacterianas (Loske y *col.*, 1998).

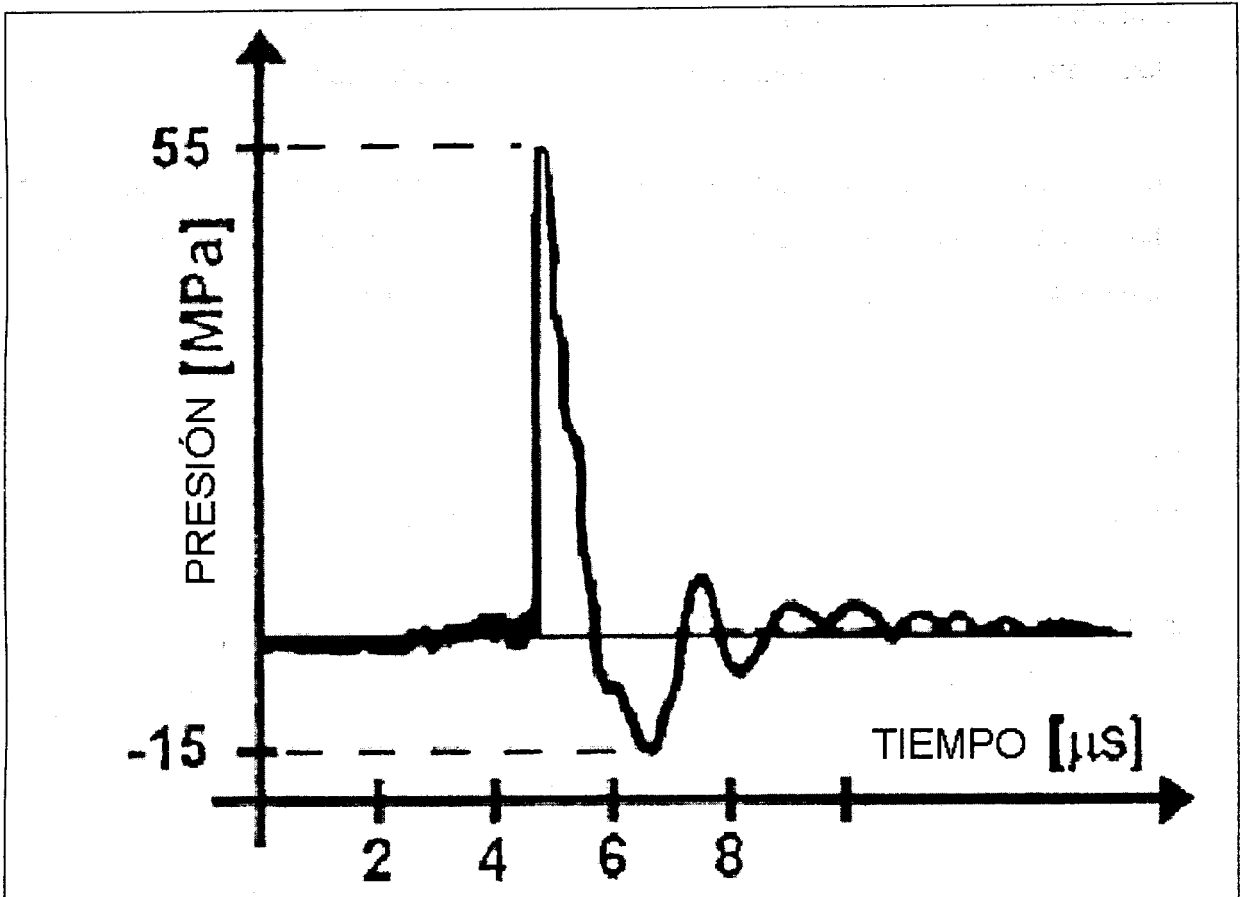
Ondas de choque

El término onda de choque se refiere a compresiones muy fuertes que avanzan a través de un medio. Estas ondas transportan energía, más no materia. Pueden mover las partículas de los alrededores, pero sin un transporte neto de materia (Loske y Prieto, 1999).

Cuando una onda de choque se hace incidir en un sitio, la presión aumenta súbitamente. Posteriormente disminuye hasta alcanzar su valor original, no sin antes pasar por una etapa de presión negativa o de dilatación (Figura 2). La presión positiva aumenta hasta 150 MPa. La fase negativa llega a tener valores de hasta -30 MPa, es decir, 30MPa debajo de la presión de equilibrio (Loske y *col.*, 2000; Loske y Prieto, 1999).

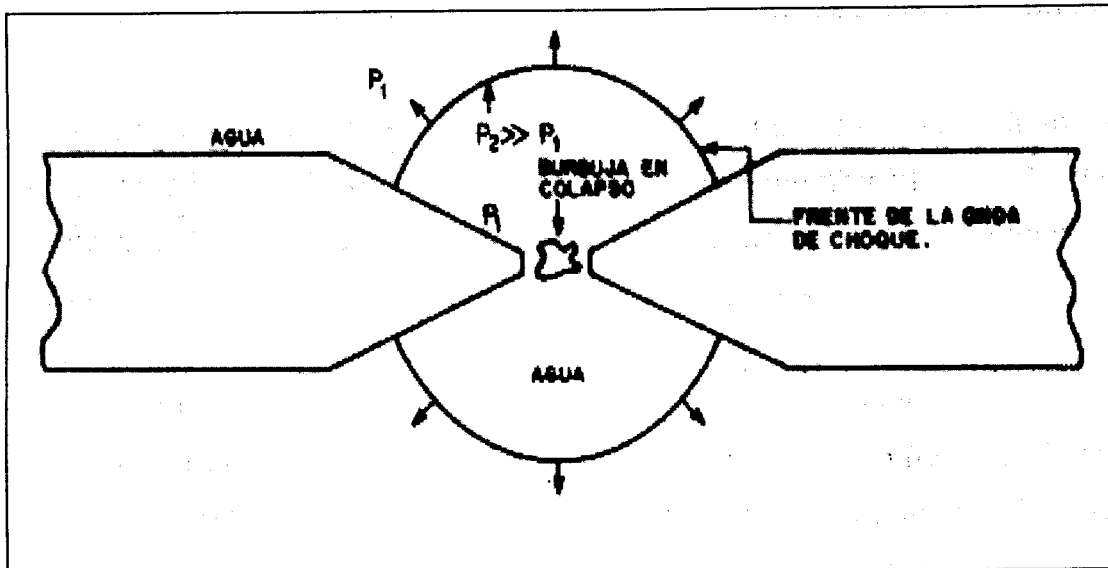
Las ondas de choque se pueden generar por cuatro métodos: el electrohidráulico (que es el más utilizado), el electromagnético, el piezoeléctrico y el microexplosivo, este último no muy utilizado. Cada uno de estos métodos de generación tiene ventajas y desventajas. Aquí únicamente se describirá el sistema electrohidráulico.

Para generar una onda de choque por el método electrohidráulico se genera una descarga de alto voltaje (entre 18 y 30 kV) a través de dos electrodos (Figura 3). Inicialmente hay una resistencia eléctrica entre los electrodos, por lo que en un principio sólo fluye una corriente muy pequeña, la cual forma un canal de plasma muy estrecho. Cuando desciende la resistencia eléctrica entre los electrodos, fluye una corriente muy grande y se forma un canal de plasma, a una presión y temperatura muy elevadas, que se expande súbitamente. El plasma comprime el medio circundante y se propaga, alejándose del punto de descarga (Loske y Prieto, 1999).



(Loske y col., 2002)

Figura 2. Perfil de una onda de choque generada electrohidráulicamente.



(Loske, 1990)

Figura 3. Generación de una onda de choque en agua.

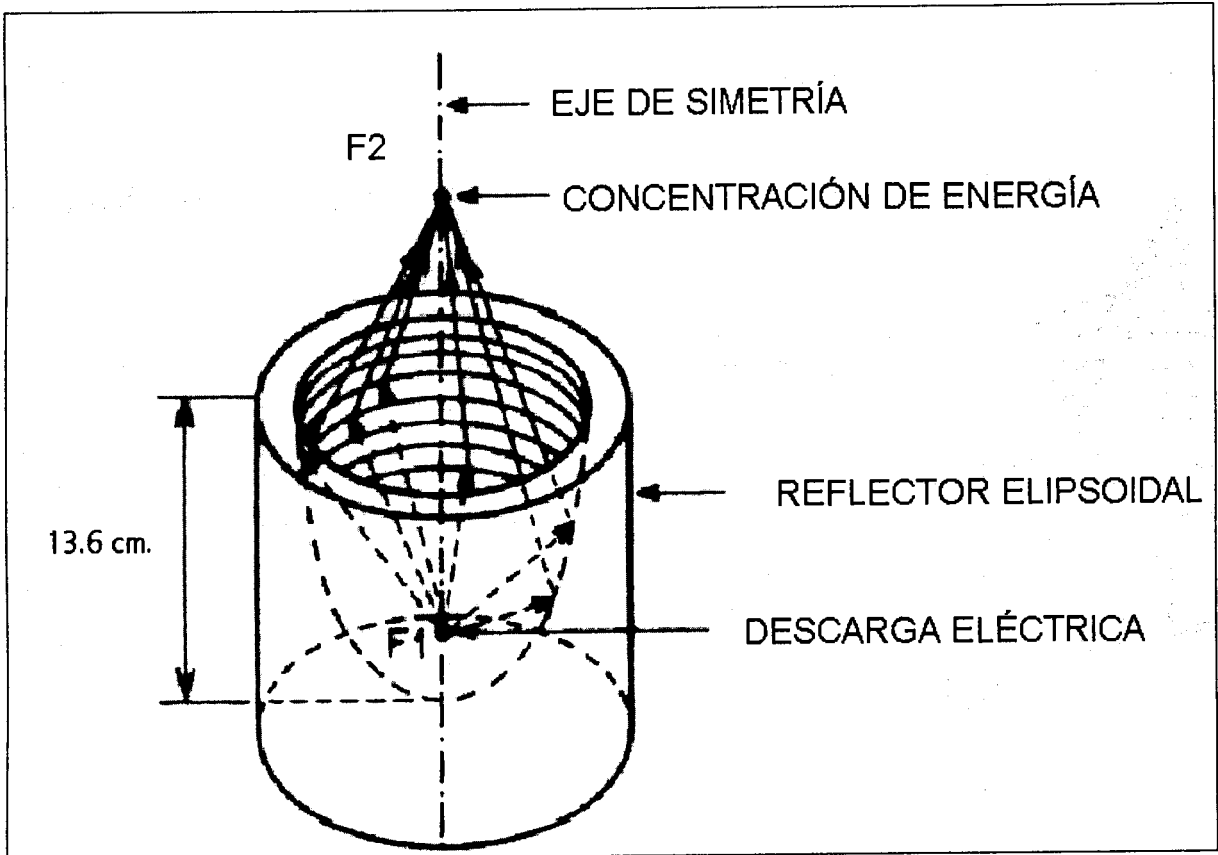
La velocidad de expansión de la onda puede ser mayor a la velocidad del sonido. Las partículas que pueden encontrarse en el plasma son: moléculas de agua, de oxígeno, de hidrógeno y de ozono, átomos de oxígeno, de hidrógeno, átomos de los metales que conforman a los electrodos, grupos OH^- e iones de hidrógeno negativos (Loske, 1990).

Los electrodos se encuentran situados en un foco de un elipsoide de revolución, denominado F1 (Figura 4). Dicho elipsoide sirve para concentrar la energía emitida por las bujías en el segundo foco (F2) o foco terapéutico, sitio donde se debe colocar el objeto a tratar con las ondas de choque (Bräuner y *col.*, 1989; Loske y Prieto, 1999).

Existen tres mecanismos por los cuales se pierde la energía del plasma: el trabajo mecánico para producir la onda de choque, la pérdida de energía por radiación y la conducción térmica, ya que fluye calor hacia el agua que rodea el plasma (Loske y Prieto, 1999; Loske, 1990).

Las ondas de choque se generan en agua por tres razones: primero, las propiedades acústicas del agua son similares a las de los tejidos y órganos del cuerpo humano, lo que permite que la onda de choque penetre el cuerpo con pérdidas menores. Segundo, para una misma energía se generan presiones mucho más elevadas en agua que en aire u otro gas. Por último, el agua es un líquido económico, fácil de manejar y obtener (Loske y Prieto, 1999).

El agua debe tener características específicas. Lo principal que hay que cuidar es la conductividad (Glosario) del agua. Generalmente los equipos deben tener acoplada una planta de tratamiento de agua para desmineralizarla y desionizarla (Loske y Prieto, 1999). Cuando el agua no es tratada se observa que las ondas de choque se distribuyen más ampliamente en vez de concentrarse en un sólo punto. La conductividad del baño se ajusta a un valor adecuado agregando una solución de cloruro de sodio (Brümmer y *col.*, 1989).



(Loske y col., 2002)

Figura 4. Reflector elipsoidal.

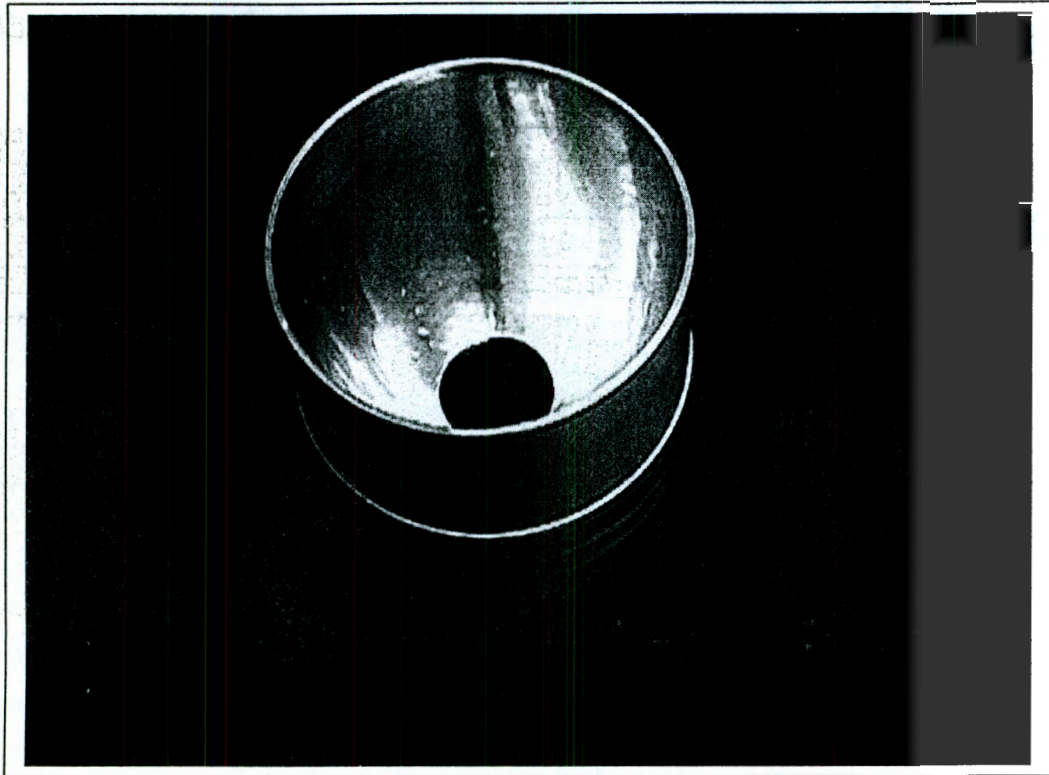


Figura 5. Fotografía del reflector elipsoidal convencional de acero inoxidable.

La destrucción de un cálculo se debe a esfuerzos de tracción y de compresión. Cuando una onda de choque penetra un objeto cuya impedancia acústica es mayor a la del agua, la onda es parcialmente reflejada. Al llegar a la interfase posterior, nuevamente se refleja la onda, sufriendo un cambio de signo, esto es, se transforma en una onda de dilatación que se superpone con la onda incidente (Loske y Prieto, 1999).

El efecto Hopkinson, la compresión y la cavitación acústica son los tres fenómenos que, hasta ahora se cree, están involucrados en la interacción de las ondas de choque con un cuerpo, cuya impedancia acústica difiere de la del medio de propagación (Loske, 1990).

En esta tesis únicamente se tratará la cavitación, ya que es uno de los fenómenos más importantes en la interacción de las ondas de choque con los microorganismos.

Cavitación

Se denomina cavitación a la formación de burbujas en un líquido y su colapso violento (Suhr y col., 1991). Se produce al aplicar presiones negativas tan grandes a los líquidos que son incapaces de soportarlas, originando una gran cantidad de energía acústica en un volumen muy pequeño. Este fenómeno causa pequeñas fisuras y huecos en la superficie donde incide la onda (Loske y Prieto, 1999).

Cuando estas burbujas se colapsan, generan temperaturas localizadas de miles de grados y presiones muy elevadas. Esto puede conducir a la emisión de luz y al rompimiento de la molécula de agua para formar radicales libres $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{H}$ y peróxido. Estos radicales tienen importantes propiedades bactericidas, donde se afecta principalmente el DNA (Segebarth y col., 2002).

La cavitación depende de la presión del medio, de la existencia de microburbujas en el líquido y de la existencia de una interfase aire – líquido, aumentando dicho fenómeno al haber mayor número de burbujas y aire. La temperatura del medio influye en la existencia de burbujas. Si el medio de propagación es altamente viscoso no podrá ocurrir cavitación (Earnshaw y *col.*, 1995).

Es importante mencionar que la cavitación puede formarse dentro del tejido biológico, causando lesiones irreversibles, por lo que no se pueden aplicar las ondas de choque a cualquier órgano. Se cree que la cavitación es la principal responsable de la disminución de infecciones en el tracto urinario, después de una litotripsia extracorporeal. Esto es, tiene un efecto destructivo sobre células bacterianas (Loske y *col.*, 2000).

Mexilit II

El generador de ondas de choque Mexilit II (pág. 61), consiste en una tina de pruebas montada sobre una base de acero y tiene dos grúas móviles de precisión, las cuales corren a lo largo de la parte superior de la tina. Debajo de la tina se encuentra el circuito de descarga. Consta también de objetos intercambiables como son las bujías y los reflectores (Loske y *col.*, 1998; Loske y Prieto, 1999).

La tina de pruebas es un contenedor de fibra de vidrio (120 x 80 x 60 cm) con cuatro ventanas de vidrio situadas a los costados. En uno de sus extremos en la parte inferior de la tina se encuentra la entrada de agua y del lado opuesto en el fondo está ubicado el desagüe. El sistema hidráulico está acoplado a una planta de tratamiento de agua. En el piso del contenedor, hay una perforación que atraviesa la tina y permite sujetar y conectar la bujía (Loske, 1990).

Las grúas móviles tienen como fin principal sujetar al objeto que se desea exponer a las ondas, así como situarlo en cualquier punto cercano al foco terapéutico F2. Es un sistema manual con tres grados de libertad. Consiste de dos carros que

se desplazan horizontalmente sobre rieles. Uno de los carros va a lo largo de la tina y el otro carro va a lo ancho, sobre el primer carro. Una de las grúas tiene una barra vertical, que en su extremo tiene una pinza portaobjetos de tres brazos. Esta pinza es la que sostiene los objetos (Loske, 1990).

En este aparato las ondas de choque se generan por rompimiento eléctrico del agua. Las descargas eléctricas se dan entre dos electrodos de tungsteno, separados 1 mm, que forman parte de una bujía intercambiable (Figura 6) que, como ya se mencionó, se instala en el fondo de la tina (Loske y *col.*, 1998). Cuando los electrodos se usan, se desgastan debido a las fuerzas y altas temperaturas que se dan entre ellos, provocando su separación y afectando la presión y la concentración de la onda de choque. La vida útil de estas bujías está aproximadamente entre la descarga 200 y la 2400, esto es, lo recomendable para mantener la presión constante y después se debe remplazar (Loske y *col.*, 1999).

Los principales componentes del circuito son (Figura 7): dos fuentes de alto voltaje, un oscilador, un disparador y varios condensadores. Este circuito consta de dos partes, una de ellas destinada a cargar los condensadores y la otra a controlar la frecuencia y el instante en que se generan las descargas.

Una fuente de alto voltaje carga los condensadores. Cuando se han cargado los condensadores al voltaje deseado, se acciona el oscilador, el cual emite un impulso óptico que se transmite por una fibra óptica hasta llegar a un convertidor optoelectrónico, en donde la señal óptica se transforma en un impulso de alto voltaje que llega al disparador y lo acciona, provocando la descarga de energía contenida en los condensadores a través de los electrodos de la bujía. Después de haber generado la descarga, el proceso se repite (Loske y Prieto, 1999).

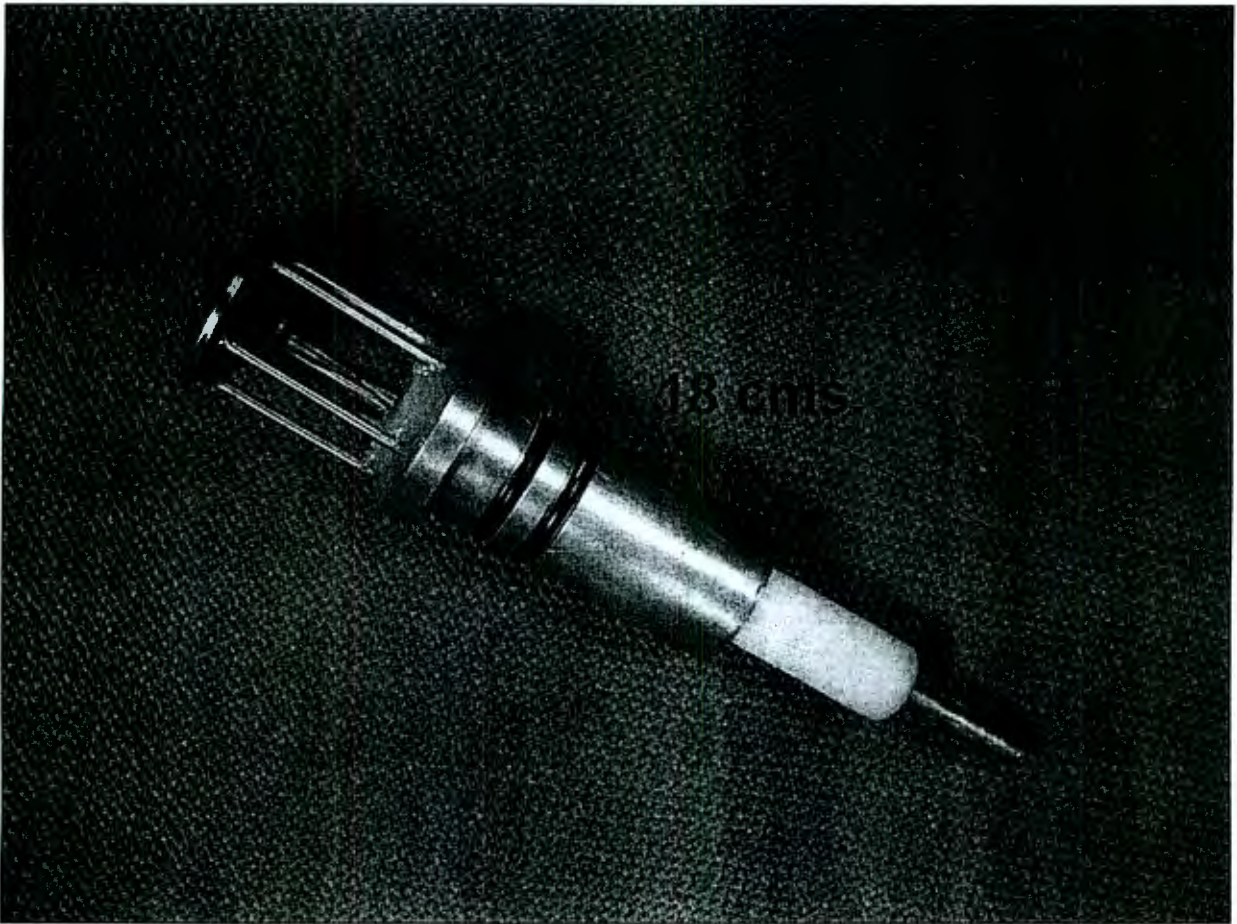
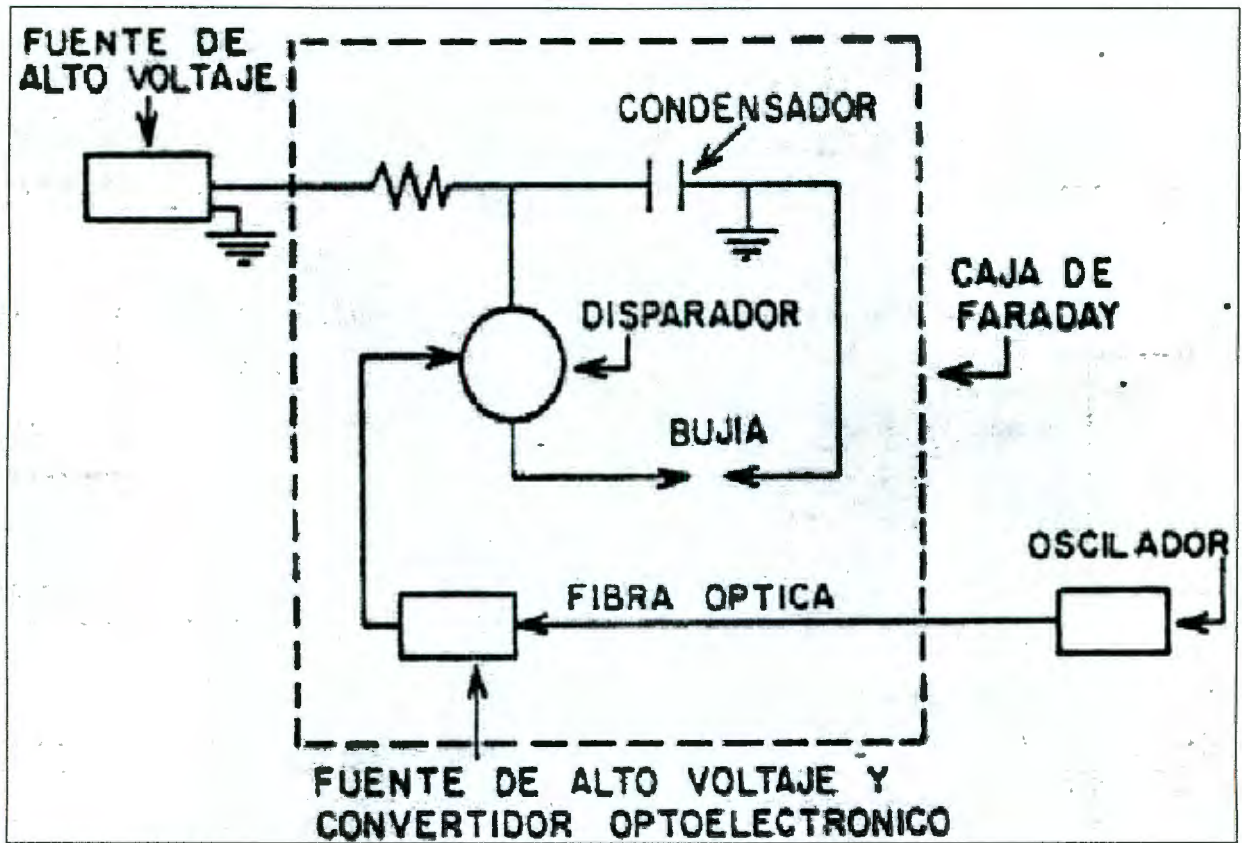


Figura 6. Fotografía de la bujía utilizada en el Mexilit II.



(Loske y col., 1998)

Figura 7. Diagrama de bloques del circuito eléctrico.

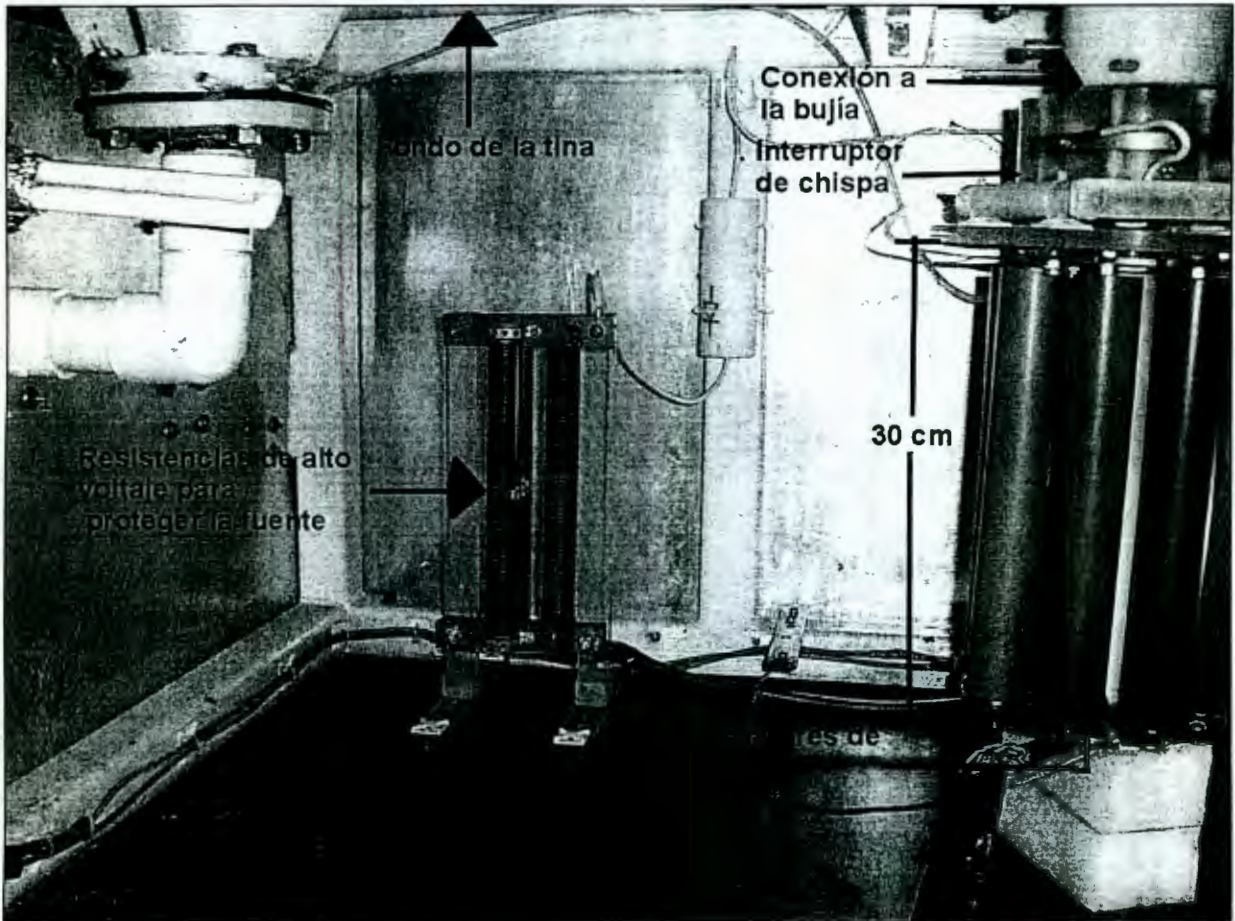


Figura 8. Fotografía del circuito de descarga.

Investigación y aplicaciones novedosas

La aceptación y el éxito de la litotripsia extracorporal por ondas de choque motivó la búsqueda exhaustiva de nuevas aplicaciones. De esta manera se han utilizado las ondas de choque no solo para desintegrar cálculos en las vías urinarias, sino concreciones ubicadas en otros órganos (von Eiff y *col.*, 2000).

Hacia finales de la década de los años 80 se publicaron los primeros reportes del uso de ondas de choque sobre huesos. Las aplicaciones en ortopedia son principalmente cuatro: tratamiento de pseudoartrosis y cicatrización lenta, aplicada a tejidos blandos cercanos al sistema óseo, endopatías y tendopatías (Loske y Prieto, 1999).

La utilización de las ondas de choque también ha dado resultados positivos respecto al control del dolor, a la mejoría de la movilidad y la disminución de la crepitación (Glosario). Se especula que las ondas de choque destruyen parcial o totalmente la membrana celular de los receptores del dolor inhibiendo el dolor. Otra posibilidad es la producción de sustancias que inhiben el dolor (Loske y Prieto, 1999).

Los efectos causados por las ondas de choque sobre células malignas o tumores *in vivo* e *in vitro* fueron estudiados desde mediados de los 80's. Se demostró que estas células malignas pueden reducir su velocidad de crecimiento al aplicarles ondas de choque (Loske y Prieto, 1999). Las células *in vitro* no afectadas siguen proliferándose o simplemente sufren un retraso en las fases del ciclo celular (Delius, 1994). La temperatura, el tamaño de las células, así como los tratamientos previos afectan el efecto citotóxico. Berens y *col.* (1989) comprobaron que las ondas de choque intensifican la acción de los agentes quimioterapéuticos (Berens y *col.*, 1989; Delius, 1994).

Al tratar tumores *in vitro* ocurren alteraciones como la formación de protuberancias en las mitocondrias, cambios a nivel superficie y defectos en la permeabilidad de la membrana celular (Delius, 1994)

Los resultados no son iguales en células *in vivo*. Las ondas de choque pueden provocar sangrado en el tumor y sus alrededores. Esto posiblemente se debe a un fuerte efecto sobre la microcirculación del tumor, así como la destrucción de las paredes vasculares (Delius, 1994). Aún teniendo un efecto citotóxico provocado por las ondas de choque, la capacidad de expansión de los tumores y el daño temporal no permanente que sufren las células, dificultan dicha aplicación (Loske y Prieto, 1999).

Si las ondas de choque provocan poros en la membrana celular, se pueden introducir sustancias al núcleo de las células. También existe la posibilidad de incorporar material genético ajeno a la célula (Delius, 1994; Loske y Prieto, 1999).

Últimamente ha despertado interés el efecto de las ondas de choque sobre células bacterianas, para determinar si causan la muerte de microorganismos indeseables (Kerfoot y col., 1992). Esto, con el objetivo de utilizarse como posible método de conservación de alimentos. Se han desarrollado algunas investigaciones en diferentes microorganismos. Los resultados muestran diferencias. Un ejemplo de esto son los experimentos desarrollados por Ohshima y col. (1991), que reportan que las ondas de choque no afectan la viabilidad de *E. coli* y *Bacillus badius*, en contraste con los experimentos realizados por Loske y col. (1999), quienes demuestran la inactivación parcial de suspensiones de *E. coli* (Loske y col., 2000). Esto muestra la necesidad de seguir investigando los diferentes mecanismos por los cuales los microorganismos son afectados por las ondas de choque.

3. JUSTIFICACIÓN

Para la población es importante consumir alimentos seguros, pero los métodos de conservación actuales afectan las propiedades sensoriales y nutricias de los alimentos. Esto ha propiciado la búsqueda de nuevos métodos de conservación como lo son: la presión hidrostática y los campos eléctricos pulsados, entre otros. Sin embargo, estos métodos alternativos tienen aplicaciones limitadas y algunos aún están en desarrollo (Gould, 1996).

Se ha observado que la aplicación de ondas de choque inactiva algunos microorganismos indicadores y patógenos suspendidos en solución salina isotónica. Este trabajo busca ampliar dichas observaciones, estudiando la inactivación de *E. coli* O157:H7 suspendida en solución salina isotónica y en jugo de naranja.

La importancia sanitaria de *E. coli* O157:H7 radica en su baja dosis infectante, la severidad del padecimiento que origina, la tolerancia a condiciones de acidez, poco común entre los patógenos, y su asociación con rumiantes que aportan alimentos de amplio consumo humano (Fernández, 2000).

Se propone trabajar en solución salina isotónica para poder comparar los resultados obtenidos con los reportados por otros autores. El jugo de naranja se eligió porque sus propiedades sensoriales se alteran fácilmente con los tratamientos térmicos.

Los resultados obtenidos servirán para establecer el potencial de la aplicación de las ondas de choque como un nuevo método de conservación de alimentos. Como los tratamientos con ondas de choque podrían aplicarse a temperatura ambiente, se espera que la técnica permita conservar las propiedades nutricias y sensoriales de los alimentos tratados.

4. OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto de la aplicación de ondas de choque sobre la viabilidad de una cepa ácido resistente de *E. coli* O157:H7 suspendida en SSI y en jugo de naranja.

Específicos

- Estudiar el efecto del número de ondas de choque aplicadas, la cavitación, la luz producida por la descarga y la fase de crecimiento sobre la viabilidad de una cepa nativa de *E. coli* O157:H7 en SSI.
- Estudiar el efecto del número de ondas de choque aplicadas, la cavitación, la luz producida por la descarga y el tipo de reflector sobre la viabilidad de células en fase estacionaria de una cepa ácido tolerante de *E. coli* O157:H7 en SSI.
- Estudiar el efecto del número de ondas de choque aplicadas, la luz producida por la descarga y el nivel de inóculo sobre la viabilidad de células en fase estacionaria de una cepa ácido tolerante de *E. coli* O157:H7 en jugo fresco de naranja.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Material biológico

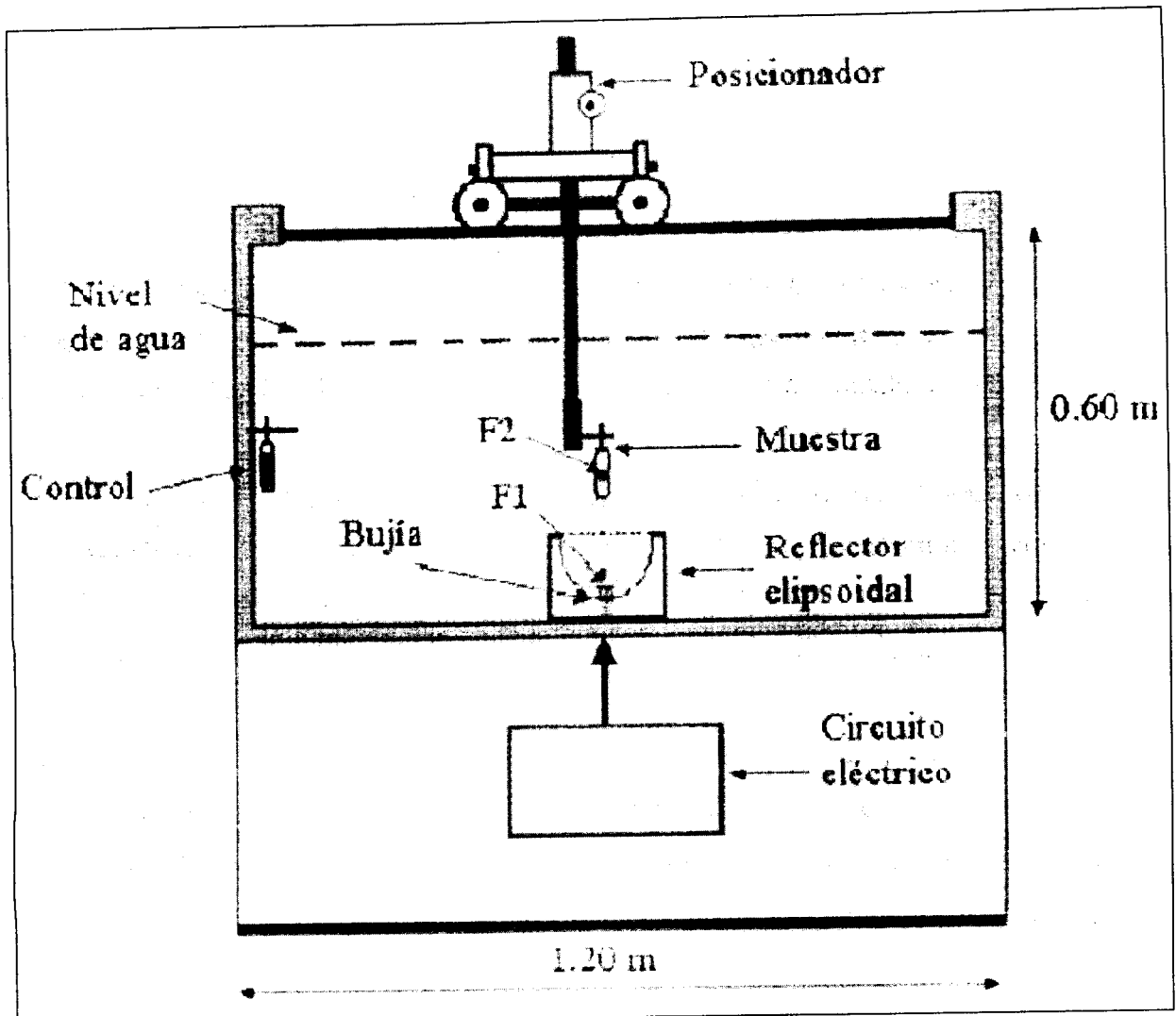
Se utilizó *Escherichia coli* serovar O157:H7, cepa H1750PG, donada por el Dr. E. Fernández Escartín de la Facultad de Química de la UAQ. La cepa se mantuvo en tubos inclinados de agar nutritivo (Merk, Alemania) entre 4 y 7 °C y fueron transferidos mensualmente. La marca de los medios de cultivo utilizados fue Bioxon (Becton Dickinson, México).

Generador de ondas de choque

Se utilizó el generador Mexilit II (Figura 9), diseñado y construido en el Instituto de Física de la UNAM (Loske y *col.*, 1998). Este generador está formado por una tina de fibra de vidrio de 120 x 80 x 60 cm. La capacitancia se fijó en 80 nF y la separación de los electrodos en 1 mm. Se utilizaron electrodos con forma de cono truncado (Loske y Prieto, 1993), los cuales se precalentaron antes de aplicar los tratamientos con 100 descargas a 18 ± 0.1 kV DC. La muestra se colocó por medio de las grúas móviles en el segundo foco (F2) del reflector elipsoidal.

Reflectores

Se utilizaron dos reflectores elípticos de acero inoxidable: E4 y E3. El reflector E4 tiene un eje mayor de 13.91 cm, un eje menor de 7.8 cm y una altura de 13.6 cm, mientras el reflector E3 tiene un eje mayor de 12.0 cm, un eje menor de 8.6 cm y una altura de 21.7 cm.



(Loske y col., 2002)

Figura 9. Esquema del generador de ondas de choque Mexilit II.

Metodología

Cinética de crecimiento

Fase estacionaria: La cepa se activó pasando una asada a un tubo con 10 ml caldo soya tripticasa con extracto de levadura al 0.6% (p/v) (CSTEL), el cual se incubó a 35 °C por 24 h. Después, se inoculó una asada del cultivo en un matraz con 39 ml de CSTEL. El matraz se homogeneizó y en ese momento se hizo un muestreo tomando 1 ml del cultivo (tiempo cero). Posteriormente el matraz se incubó en un baño de agua a 35 °C y se tomó una alícuota (1 ml) cada hora durante las primeras 4 horas. Posteriormente se hizo un muestreo cada 2 horas hasta completar 22 horas. Se determinó la viabilidad celular por vaciado en placa en Agar Soya Tripticasa enriquecido con extracto de levadura al 0.6% (ASTEL) a 35 °C por 24 h.

Fase exponencial: La cepa se activó pasando una asada a un tubo con 10 ml CSTEL, el cual se incubó a 35 °C por 24 h. Posteriormente, el cultivo activado se inoculó en un matraz con 32 ml de CSTEL en una proporción 1:4 (v/v), se homogeneizó e inmediatamente se empezó a muestrear 1 ml de este matraz .

Los matraces se incubaron en un baño maría a 35 °C y cada 30 min se tomaron alícuotas (1 ml) hasta las 5 h. A las 3 h de esta suspensión se hizo un segundo pase a un matraz con 30 ml de CSTEL con la misma relación, 1:4, e igualmente se empezó a tomar una alícuota de 1 ml cada 30 min, hasta alcanzar la fase exponencial. Se determinó la viabilidad celular por vaciado en placa en ASTEL a 35 °C por 24 h para todas las alícuotas tomadas. En todos los casos la temperatura se controló con un circulador Precision Scientific, con una precisión de 0.1 °C.

Preparación de muestras

La cepa se activó de acuerdo a la cinética de crecimiento descrita anteriormente. Las células en fase estacionaria se obtuvieron inoculando 2 asadas del cultivo activado a 40 ml de CSTEEL; este se incubó 20 h a 35 °C. Las células en fase exponencial se obtuvieron inoculando 1:4 partes (v/v) del cultivo activado en CSTEEL e incubando 3 h a 35 °C. De este subcultivo se inocularon nuevamente 1:4 partes (v/v) en CSTEEL y se incubó 1.5 h a 35 °C. Los tiempos para alcanzar las fases estacionaria y exponencial se determinaron a partir de la cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en CSTEEL a las condiciones mencionadas previamente.

Tanto las células en fase estacionaria como las células en fase exponencial se centrifugaron a 1100 *g* por 10 min. a temperatura ambiente, en una centrifuga marca Hamilton Bell modelo Van Guard V6000. Se desechó el medio de cultivo y las células se resuspendieron en SSI. Con las suspensiones bacterianas se llenaron viales de polipropileno (Elkay Products Inc.), de 4 ml de capacidad, al 75 y 100% de su capacidad. Los viales se sellaron con calor y por último se desinfectaron con una solución de alcohol al 70%.

Estudió del efecto del número de ondas de choque aplicadas, la cavitación, la luz producida por la descarga y la fase de crecimiento sobre la viabilidad de una cepa nativa de *E. coli* O157:H7 en SSI

Se utilizó el reflector E4. Los viales se colocaron dentro del Mexilit II en el segundo foco para recibir el tratamiento correspondiente (pág. 74). Los viales control (N_0) se colocaron en la periferia del generador, lejos de la luz producida y de las ondas de choque, a la misma altura de los viales tratados (N). Los tratamientos se aplicaron a temperatura ambiente (22-24 °C). Antes de recibir los tratamientos, ambos viales se dejaron 2 min en el agua de la tina para alcanzar la temperatura del

tratamiento. Posteriormente, se inició la aplicación de los tratamientos con un voltaje de 20 kV DC.

Se utilizó la mitad de un diseño factorial 2^4 (Box y *col.*, 1978) para evaluar el efecto del número de ondas de choque aplicadas, la cavitación, la luz producida por la descarga eléctrica y la fase de crecimiento (exponencial o estacionaria) sobre la viabilidad de una cepa nativa de *E. coli* O157:H7, suspendida en SSI.

De acuerdo al diseño experimental, en la mitad de los viales se creó una interfase aire-líquido, con el objeto de exacerbar la cavitación, llenando los viales al 75% de su capacidad (Morgan y *col.*, 1988). La otra mitad de los viales se llenaron al 100%, cuidando no dejar ninguna burbuja de aire. La mitad de los viales fueron cubiertos con una bolsa de polipropileno negro para bloquear la luz producida por la descarga eléctrica y la otra mitad de los viales fueron cubiertos con una bolsa de polipropileno transparente para permitir el paso de la luz producida por la descarga. A la mitad de los viales se aplicaron 150 ondas de choque y a la otra mitad se le aplicaron 350 ondas de choque. La mitad de los viales eran células en fase estacionaria y la otra mitad eran células en fase exponencial.

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la viabilidad del microorganismo, se utilizó la técnica de vaciado en placa en ASTEL. Las placas se incubaron a 35 °C por 24 h. Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa R (Ihaka y Gentleman, 1996).

Determinación de la resistencia térmica de E. coli O157:H7

Los valores *D*, a 50, 55 y 60 °C, se determinaron utilizando el método de Bradshaw y *col.* (1987) con las siguientes modificaciones: se colocaron 2 ml de las suspensiones bacterianas (fase estacionaria y exponencial) en tubos de vidrio de 10X100 mm. Los tratamientos se aplicaron en un baño de agua. La temperatura se

controló utilizando un circulador (Precision Scientific, E.U.A.). Para el ensayo a 50 °C los tubos se retiraron a los 0, 5, 10, 15 y 20 min.; a 55 °C los tubos se retiraron a los 0, 2, 4, 6 y 8 min.; a 60 °C los tubos se retiraron a 0, 1, 2, 3 y 4 min. Inmediatamente después se mantuvieron los tubos en un baño de hielo por 5 min. Después se realizó cuenta viable por vaciado en placa con ASTEL incubando por 24 h a 35 °C. Los tratamientos se hicieron por triplicado. Los valores *D* se obtuvieron mediante una regresión lineal con el programa R (Ihaka y Gentleman, 1996).

Inducción de la ácido tolerancia

El objetivo de obtener células resistentes a la acidez fue: que no sufrieran estrés por el ácido al ser inoculadas en el jugo de naranja, y poder diferenciar entre la inactivación debida a los tratamientos aplicados sobre células y la debida a la acidez del jugo de naranja.

La ácido tolerancia se indujo suspendiendo células en fase estacionaria en soluciones de CSTEEL acidificado con ácido cítrico a un pH de 5 y 5.8, por 1.5 y 2.0 h a 35 °C. Como control se inoculó CSTEEL a pH 7.0. Después de pasar este tiempo se centrifugó, se retiró el sobrenadante y enseguida, se evaluó la ácido-tolerancia incubando una alícuota del cultivo por 1 h a 35 °C en SSI acidificada con ácido cítrico a pH 2.5. Después del reto, se tomó una alícuota del CSTEEL acidificado y se diluyó en una solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.0, 0.25 M). La viabilidad celular se determinó por vaciado en placa en ASTEL.

Inducción de la resistencia a Rifampicina

Se obtuvieron células resistentes a Rifampicina (R⁺) para poder diferenciarlas de la flora nativa del jugo de naranja.

Se estrió una asada de la cepa nativa en ASTEL adicionado de Rifampicina (150 ppm) y se incubó a 35 °C por 24 h. Después se seleccionó una colonia y se

hicieron 10 pases más en el mismo medio, utilizando las mismas condiciones de incubación. Por último se pasó una colonia resistente a un tubo inclinado de ASTEL con 150 ppm de Rifampicina y se incubó a 35 °C por 24 h. Este tubo se mantuvo en refrigeración entre 4 y 7 °C y se transfirió mensualmente.

Estudió del efecto del número de ondas de choque aplicadas, la cavitación, la luz producida por la descarga y el tipo de reflector sobre la viabilidad de células en fase estacionaria de una cepa ácido tolerante de *E. coli* O157:H7 en SSI

Se utilizó la mitad de un diseño factorial 2^4 (Box y Hunter, 1978) para evaluar el efecto del número de ondas de choque aplicadas, la cavitación, la luz producida por la descarga eléctrica y el tipo de reflector sobre la viabilidad de suspensiones de células en fase estacionaria de una cepa ácido tolerante de *E. coli* O157:H7 en SSI.

La tolerancia a la acidez se indujo de acuerdo a lo descrito anteriormente, con la única variante de que se utilizaron células R^+ en fase estacionaria. Los viales se prepararon como se describió en la página 63. Se utilizaron los reflectores E4 y E3. Las condiciones del Mexilit II fueron las mismas descritas en la página 63.

En esta etapa se incrementó la dosis de ondas de choque aplicadas. La mitad de los viales recibieron 350 ondas de choque y la otra mitad 500. La mitad de los viales utilizó el reflector convencional (E4) y la otra mitad usó el reflector completo (E3). El efecto de la luz y la cavitación se estudió de acuerdo a lo descrito en el Objetivo anterior. Los tratamientos se aplicaron a temperatura ambiente (22-24 °C). La cuenta viable se determinó por vaciado en placa en ASTEL con 150 ppm de Rifampicina. El experimento se realizó por duplicado y los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa R (Ihaka y Gentleman, 1996).

Estudió del efecto del número de ondas de choque aplicadas, la luz producida por la descarga y el nivel de inóculo sobre la viabilidad de células en fase estacionaria de una cepa ácido tolerante de *E. coli* O157:H7 en jugo fresco de naranja

El jugo de naranja se obtuvo asépticamente en el laboratorio a partir de naranjas compradas en un supermercado de la localidad. Una vez obtenido, el jugo se filtró dos veces en un colador estéril. Se llevó a cabo el análisis de calidad sanitaria realizando pruebas para mesófilos aerobios, coliformes, hongos y levaduras del jugo fresco, así como la medición del pH. La finalidad de realizar estas pruebas al jugo de naranja fresco fue para conocer la carga microbiana del jugo al ser obtenido en el laboratorio.

Se utilizaron células ácido tolerantes, en fase estacionaria de crecimiento resistentes a Rifampicina, utilizando una relación *inóculo: jugo* de 1:100. Se prepararon 2 niveles de inóculo, aproximadamente 10^8 UFC/mL (inóculo alto) y 10^4 UFC/mL (inóculo bajo).

Se utilizó un diseño factorial 2^3 (Box y *col.*, 1978) para evaluar el efecto del número de ondas de choque aplicadas, la luz producida por la descarga eléctrica y el nivel de inóculo de células en fase estacionaria de la cepa ácido tolerante de *E. coli* O157:H7 inoculadas en jugo fresco de naranja.

Los viales se prepararon como se describió en la página 63, solo que con células ácido tolerantes, en fase estacionaria y resistentes a rifampicina. Todos los viales se llenaron al 75% de su capacidad y se utilizó el reflector E4. Las condiciones de operación del Mexilit II fueron las mismas descritas anteriormente. El efecto de la luz producida se evaluó de acuerdo con el Objetivo específico 1. La mitad de los viales recibieron 350 ondas de choque y la otra mitad 500. La temperatura durante los experimentos varió entre 22-24 °C.

Los recuentos se realizaron por vaciado en placa en ASTEL con 150 ppm de Rifampicina. Las diluciones se realizaron con buffer fosfatos (pH 7, 0.25 M). El experimento se realizó por duplicado y los resultados se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa R (Ihaka y Gentleman, 1996).

En todos los Objetivos específicos, la eficacia de los tratamientos se comprobó, determinando la diferencia entre la población viable de las muestras sometidas a los diferentes tratamientos (N) con sus respectivos controles (N_0), de acuerdo con la siguiente Ecuación 1:

$$\text{Eficiencia} = \log (N_0) - \log (N) = \log N_0/N$$

Ec. 1

6. RESULTADOS

Cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7

Las cinéticas de crecimiento, para la fase estacionaria y exponencial de *E. coli* O157:H7 en CSTEEL a 35 °C, se muestran en la Figura 10. La primera parte del gráfico muestra el desarrollo completo del microorganismo; aproximadamente a las 14 h comienza la fase estacionaria. Los tiempos seleccionados son consistentes con los descritos para la preparación de las muestras (sección 5), tomando las células a las 20 h de haber sido reactivadas en un tubo con CSTEEL a 35 °C.

La segunda parte de la Figura 10 muestra dos curvas: los puntos negros representan el primer pase. El seguimiento de dichos puntos indica que a partir de 1.5 h empieza la fase exponencial y se prolonga hasta las 3 h. Los triángulos representan un segundo pase en donde la fase exponencial comienza a partir de 1.5 h después de haber sido inoculado.

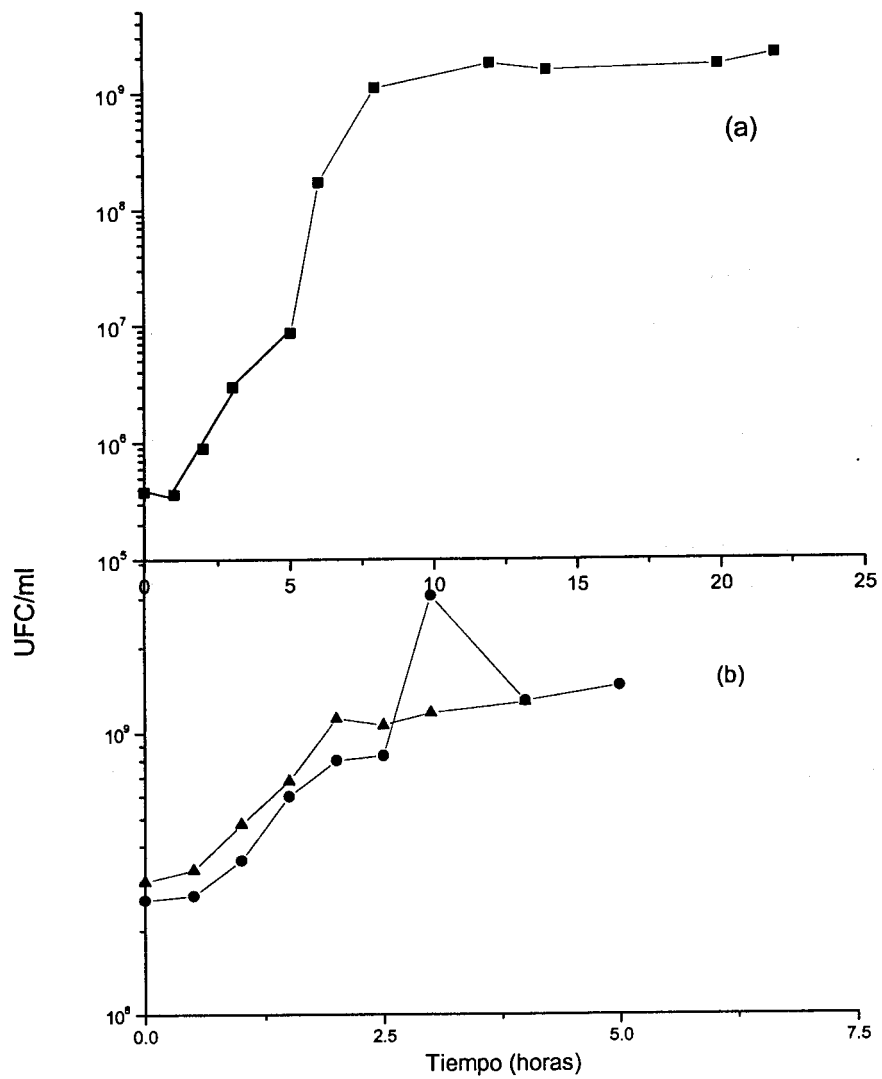


Figura 10. Cinéticas de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en CSTEEL a 35 °C, para la obtención de células en fase estacionaria y exponencial: a) (■) Cinética para la fase estacionaria; b) Cinéticas 1 (▲) y 2 (●) para la fase exponencial.

Evaluación del efecto del número ondas de choque aplicadas, la cavitación, la luz producida por la descarga eléctrica y la fase de crecimiento

Cuadro 14 muestra las cuentas viables de la inactivación de *E. coli* O157:H7 en SSI. El diseño experimental y la inactivación lograda con esta cepa nativa de *E. coli* O157:H7 se muestra en el Cuadro 15. Se observó una inactivación muy baja de estas suspensiones, con un máximo de inactivación de 0.58 log₁₀ UFC/ml, que se obtuvo sobre células en fase exponencial al aplicar 150 ondas de choque, evitando el paso de la luz y llenando los viales al 100% (sin cavitación aumentada). Con 350 ondas de choque aplicadas, dejando pasar la luz, con cavitación aumentada y sobre células en fase estacionaria se logra una inactivación similar de 0.56 log₁₀ UFC/ml.

Como se observa en la Figura 11, las células fueron más susceptibles a la luz producida por la descarga (aproximadamente de 0.5 log₁₀ UFC/ml). El análisis de varianza (Cuadro 16) reveló que esta interacción entre la luz y la fase de crecimiento es estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Cuadro 14. Cuentas viables de la inactivación de una cepa nativa de *E. coli* O157:H7 en SSI.

Tratamiento	log N₀ (UFC/ml)	log N (UFC/ml)	Réplica
1	9.2330	7.3711	1
1	9.3345	9.3243	2
1	9.2175	9.0492	3
1	9.2833	8.9085	4
2	9.3139	9.1875	1
2	9.5315	9.3747	2
2	9.2122	9.3284	3
2	9.2788	9.2945	4
3	9.2810	9.1139	1
3	9.3838	9.3284	2
3	9.2201	9.2430	3
3	9.3404	9.1173	4
4	8.8261	8.7993	1
4	9.0645	9.0000	2
4	9.0043	8.8513	3
4	8.9191	8.8921	4
5	8.7160	7.4082	1
5	8.9778	8.3522	2
5	8.9638	8.4300	3
5	9.0414	8.4771	4
6	9.9542	9.2041	1
6	9.3444	9.3579	2
6	9.2989	9.2833	3

Continuación...

Tratamiento	log N ₀ (UFC/ml)	log N (UFC/ml)	Réplica
6	9.2201	9.2625	4
7	8.8062	7.9345	1
7	9.0086	8.4771	2
7	9.0170	8.6812	3
7	9.0212	8.1987	4
8	8.8865	7.8976	1
8	9.0607	9.0170	2
8	9.0569	8.9243	3
8	9.0000	8.9243	4

Cuadro 15. Inactivación de *E. coli* 0157:H7 en SSI por efecto del número de ondas de choque aplicadas, el nivel de cavitación, la luz producida por la descarga eléctrica y la fase de crecimiento.

Experimento	Fase de crecimiento	Luz ^a	Cavitación aumentada ^b	No. de ondas de choque	Inactivación logarítmica lograda (UFC/ml) ^c
1	Estacionaria	Si	Si	350	0.56±0.25
2			No	150	-0.01±0.03
3		No	Si	150	0.01±0.14
4			No	350	0.08±0.07
5	Exponencial	Si	Si	150	0.09±0.13
6			No	350	0.18±0.18
7		No	Si	150	0.08±0.05
8			No	350	0.58±0.05

^a La luz generada por la descarga eléctrica se bloqueó utilizando una bolsa de polipropileno negro (No), o se permitió llegar a los viales (Si).

^b La cavitación se exacerbó llenando los viales solamente al 75% de su capacidad, dejando una interfase aire-suspensión en su interior.

^c Promedio de tres réplicas independientes ± desviación estándar. $\text{Log}_{10} (N_0/N)$, N_0 es la cuenta inicial en los viales control; N es la cuenta viable en los viales que recibieron los tratamientos.

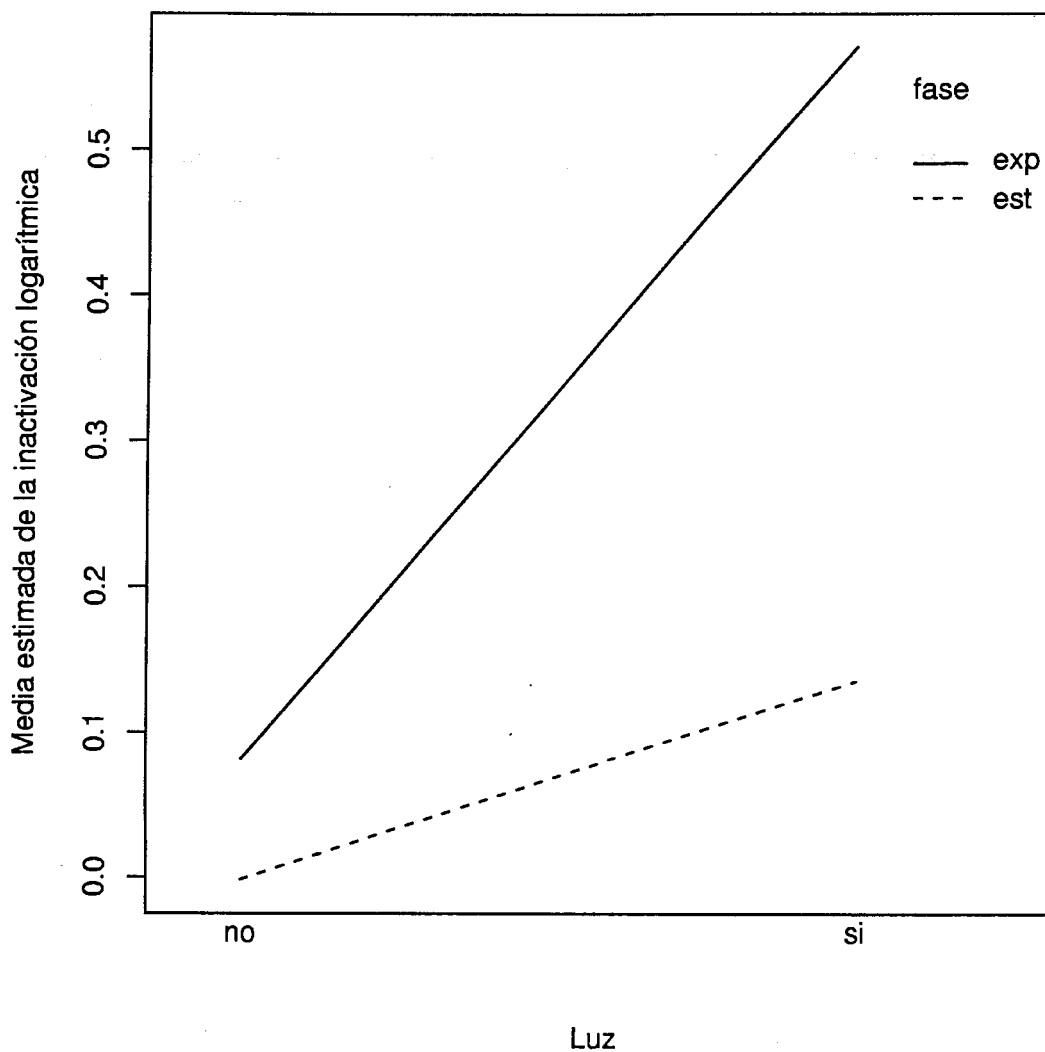


Figura 11. Inactivación logarítmica estimada de *E. coli* O157:H7 en SSI en función de la luz producida por la descarga eléctrica y la fase de crecimiento.

Cuadro 16. Análisis de varianza (ANOVA) de la inactivación de *E. coli* O157:H7 en SSI.

Factor	Suma de cuadrados	Valor p
Luz	0.5891	0.0005
Cavitación	0.0034	0.6304
Fase	0.4031	0.0015
Choques	0.0042	0.5956
Bloque	0.0436	0.2699
Luz: cavita	0.0066	0.5059
Luz: fase	0.1866	0.0095
Luz: choques	0.0012	0.7736
Residuales	0.0797	-----

Determinación de la resistencia térmica

Las cinéticas de inactivación a las tres temperaturas probadas se muestra en la Figura 12. El valor D es directamente proporcional a la pendiente de la recta. A 50 °C se observa que la pendiente casi es cero. Esto significa que casi no hay muerte en ambas fases de crecimiento. Conforme se incrementó la temperatura también aumentó la pendiente, lo cual indica una mayor inactivación. Tanto a 55 como a 60 °C vemos mayor inactivación de células en fase exponencial que en fase estacionaria.

Los valores D estimados se muestran en el Cuadro 17. Si comparamos los tiempos para reducir la fase estacionaria y la exponencial, observamos que la fase más susceptible es la fase exponencial, necesitando solo la mitad del tiempo para inactivarlas. Esto no se probó a 50 °C, pero como ya dijimos a esta temperatura la velocidad de inactivación tiende a cero.

Inducción a la ácido tolerancia

Se lograron células tolerantes a la acidez en fase estacionaria de *E. coli* O157:H7 a pH 5 a partir de la primera hora y media de haber sido inoculadas en CSTEEL acidificado con ácido cítrico. El Cuadro 18 muestra las cuentas viables después de la inducción a la ácido tolerancia. Si observamos la Figura 13, se ve que hay una mayor adaptación a pH 5 debido a que la inactivación logarítmica es mucho menor que a pH 5.8, todo esto comparado con el control (pH 7). Si se observa el ANOVA (Cuadro 19) de este experimento, podemos ver que la interacción entre el pH y el tiempo no fue estadísticamente significativa, sino el pH al cual se indujo la tolerancia a la acidez.

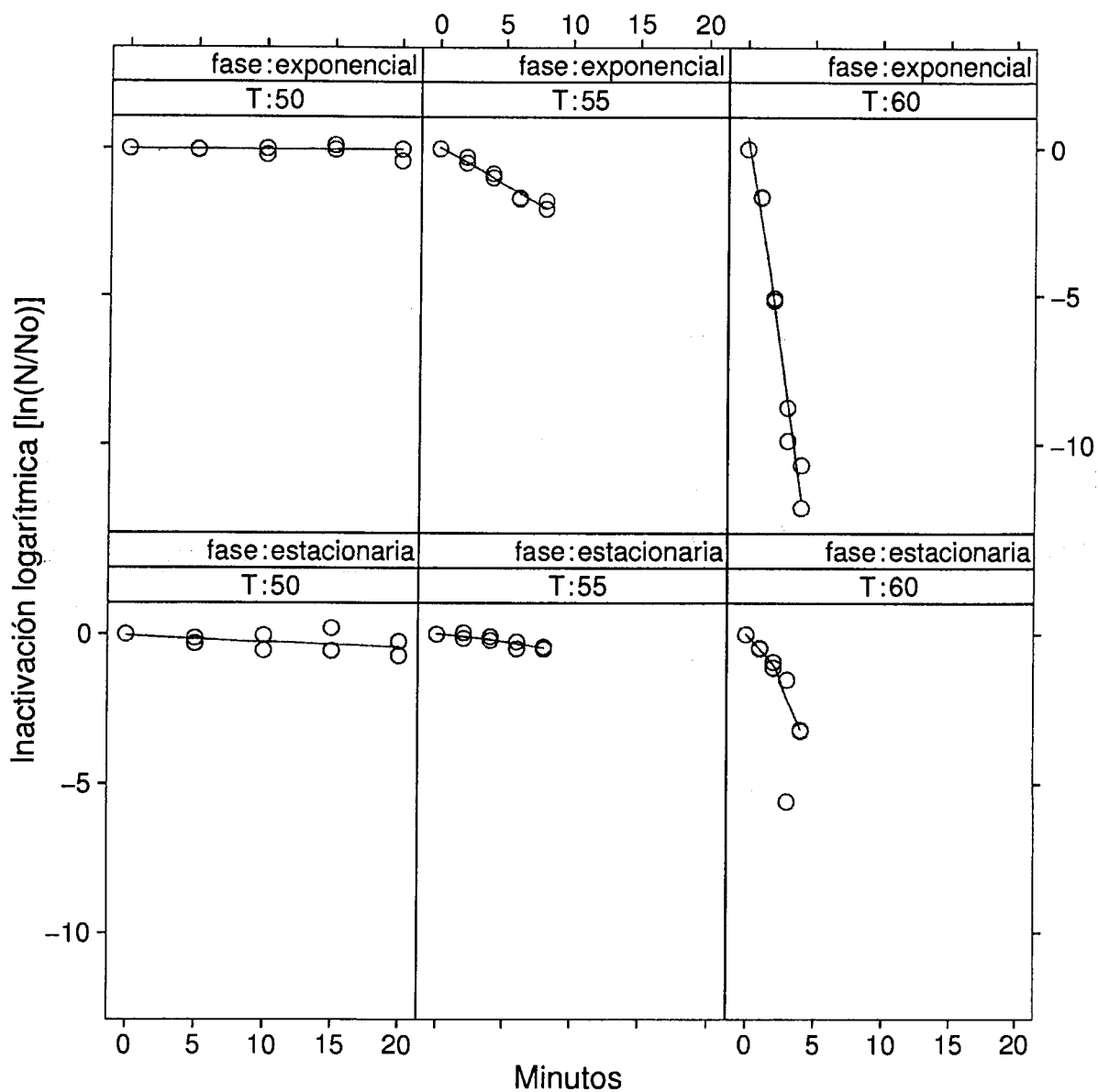


Figura 12. Inactivación de células en fase estacionaria y exponencial de *E. coli* O157:H7 suspendidas en SSI a 50, 55 y 60 °C.

Cuadro 17. Valores *D* estimados para células de *E. coli* O157:H7 suspendidas en SSI.

Temperatura (°C)	Valor <i>D</i> (min)	
	Fase exponencial	Fase estacionaria
50	333.77	123.16
55	9.08	36.44
60	0.77	2.42

Cuadro 18. Cuentas viables de *E. coli* O157:H7 en SSI, después del reto ácido (pH 2.5) en función del pH y del tiempo de incubación.

Tiempo (h)	pH	log N ₀ (UFC/ml)	log N (UFC/ml)	Réplica
1.5	7.0	8.9138	5.1732	1
1.5	7.0	8.8865	5.4914	2
1.5	5.0	8.1399	5.9294	1
1.5	5.0	8.1732	6.3579	2
1.5	5.8	8.5705	5.5563	1
1.5	5.8	8.5563	5.6021	2
2.0	7.0	8.8513	6.8196	1
2.0	7.0	9.0269	5.7482	2
2.0	5.0	8.1335	6.4654	1
2.0	5.0	8.2148	6.2765	2
2.0	5.8	8.5911	5.8808	1
2.0	5.8	8.6532	5.8513	2

Cuadro 19. ANOVA de la inducción a la ácido-tolerancia de *E. coli* O157:H7 en SSI.

Factor	Suma de cuadrados	Valor p
Tiempo	0.6075	0.1258
pH	3.2305	0.0222
Bloque	0.0560	0.0015
Tiempo:pH	0.0042	0.6012
Bloque	0.3245	0.4637
Residuales	0.914	-----

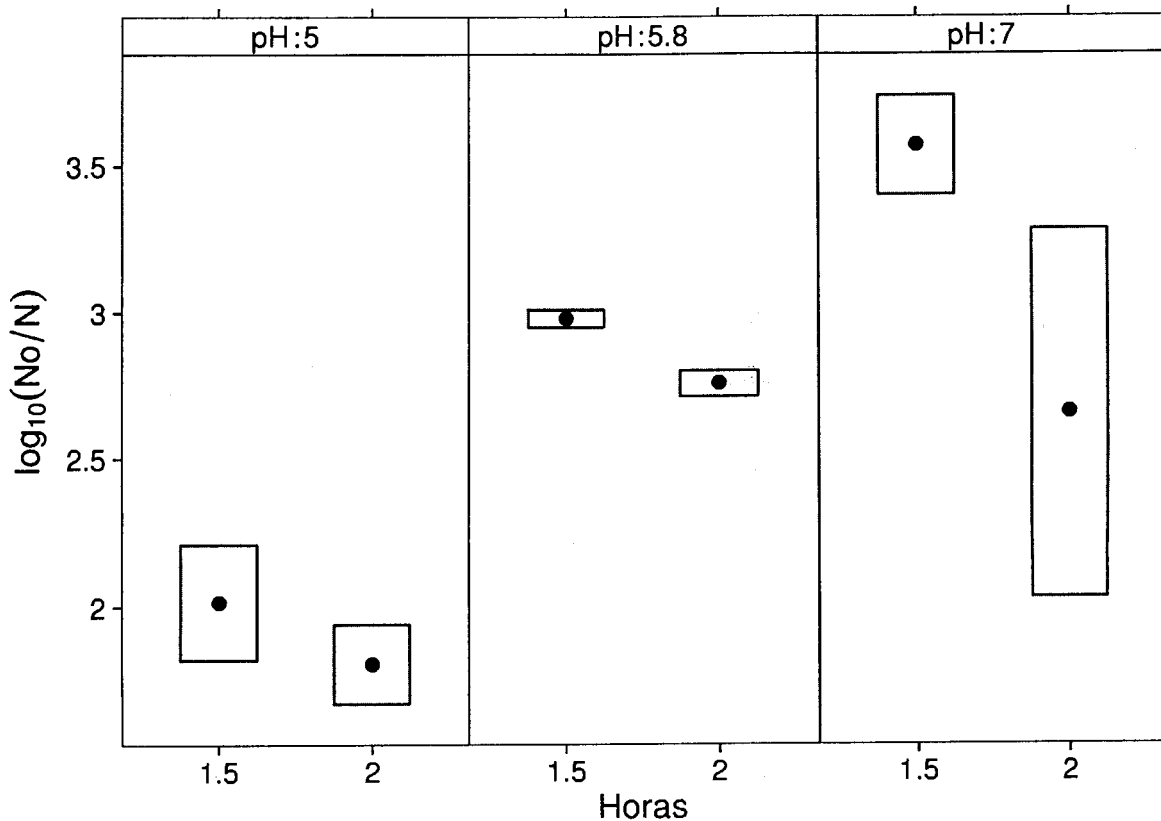


Figura 13. Disminución logarítmica de células en fase estacionaria de *E. coli* O157:H7, después del reto ácido (pH 2.5) en función del pH y del tiempo de incubación. El punto negro representa la media de 2 réplicas independientes, las cajas los cuantiles 25 y 75%, respectivamente.

Evaluación del efecto del número de ondas de choque aplicadas, la cavitación, la luz producida por la descarga y el tipo de reflector

Se obtuvieron células resistentes a Rifampicina (R^+) para poder diferenciarlas de la flora nativa del jugo de naranja. El Cuadro 20 muestra las cuentas viables de la inactivación de una cepa ácido tolerante de *E. coli* O157:H7 en SSI. De acuerdo con el Cuadro 21, la mayor inactivación lograda de células R^+ en fase estacionaria y ácido tolerantes de *E. coli* O157:H7 fueron aquellas tratadas con el reflector E4, con cavitación aumentada (viales al 75% de su capacidad), permitiendo el paso de la luz y con 350 ondas de choque aplicadas. Este tratamiento (Cuadro 21) logró inactivar $2.34 \log_{10}$ UFC/ml de la suspensión de *E. coli* O157:H7.

Se logró inactivar más células que en el primer Objetivo específico ya que las células posiblemente están estresadas por el reto ácido que sufrieron previamente las suspensiones y por el aumento en el número de choques aplicados.

El ANOVA (Cuadro 22) reveló que la interacción que tuvo un efecto sobre la inactivación de este microorganismo fue el tipo de reflector con el número de choques aplicados (Figura 16), en donde el reflector E4 ocasionó mayor inactivación de *E. coli* O157:H7 con 350 ondas de choque aplicadas y el reflector E3 tuvo mayor efecto sobre el microorganismo cuando se aplicaron 500 ondas de choque aplicadas. El ANOVA también reveló que la cavitación y a luz son estadísticamente significativos. La Figura 14 muestra mayor efecto al dejar pasar la luz producida por la descarga, que sin no se deja pasar la luz por las suspensiones. Si observamos la Figura 15 hay una mayor inactivación en las suspensiones de *E. coli* O157:H7 con cavitación aumentada.

Cuadro 20. Cuentas viables de la inactivación de una cepa ácido tolerante de *E. coli* O157:H7 en SSI.

Tratamiento	log N₀ (UFC/ml)	log N (UFC/ml)	Réplica
1	8.1553	7.5563	1
1	7.4814	6.9868	2
2	7.9031	6.1139	1
2	7.6532	4.7634	2
3	8.0128	8.0000	1
3	7.3729	7.6902	2
4	8.3424	8.2833	1
4	7.5185	8.0645	2
5	7.6335	6.9395	1
5	7.9031	8.1206	2
6	8.1523	8.0492	1
6	7.8325	7.9868	2
7	7.5441	7.6128	1
7	7.9294	7.3424	2
8	7.9868	6.6021	1
8	8.0792	5.0000	2

Cuadro 21. Inactivación de *E. coli* O157:H7 en SSI por el efecto del número de ondas de choque aplicadas, el nivel de cavitación, la luz producida por la descarga eléctrica y el tipo de reflector.

Experimento	Reflector	Luz ^a	Cavitación aumentada ^b	No. de ondas de choque	Inactivación logarítmica lograda (UFC/ml) ^c
1	E4	Si	Si	350	2.34 ± 0.78
2			No	500	0.55 ± 0.07
3		No	Si	500	-0.24 ± 0.43
4			No	350	-0.15 ± 0.23
5	E3	Si	Si	500	2.23 ± 1.20
6			No	350	0.26 ± 0.46
7		No	Si	350	0.24 ± 0.64
8			No	500	-0.03 ± 0.18

^a La luz generada por la descarga eléctrica se bloqueó utilizando una bolsa de polipropileno negro (No), o se permitió llegar la luz a los viales (Si).

^b La cavitación se exacerbó llenando los viales solamente al 75% de su capacidad, dejando una interfase aire-suspensión en su interior.

^c Media de dos réplicas independientes ± desviación estándar. $\text{Log}_{10} (N_0/N)$ donde N_0 es la cuenta viable en los viales control y N la cuenta viable en los viales tratados.

Cuadro 22. ANOVA de la inactivación de *E. coli* O157:H7 en SSI.

Factor	Suma de Cuadrados	Valor p
Luz	7.817	0.0066
Cavitación	3.943	0.0279
Reflector	0.010	0.7900
Ondas de choque	0.011	0.8859
Reflector-luz	0.269	0.4799
Reflector-cavitación	0.064	0.7269
Reflector-och	3.287	0.0388
Residuales	2.844	-----

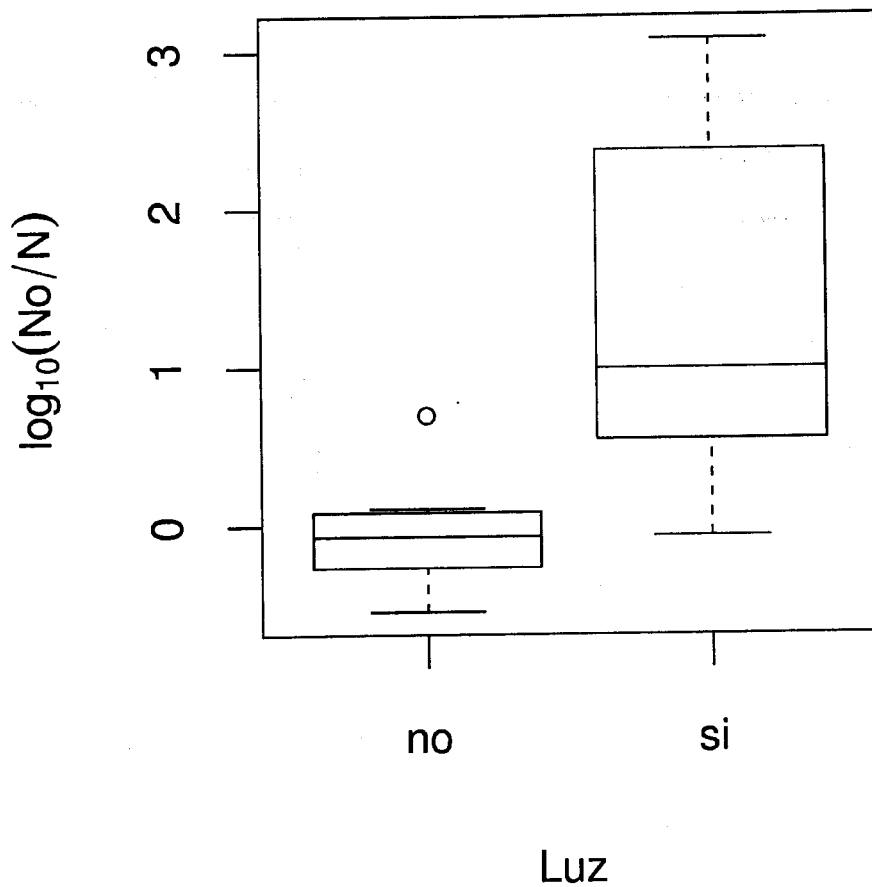


Figura 14. Disminución logarítmica de células en fase estacionaria de *E. coli* O157:H7 en SSI con ("si"), o sin luz ("no"). La línea en las cajas representa la media de tres réplicas independientes, las cajas los cuantiles 25 y 75% y las barras los valores extremos.

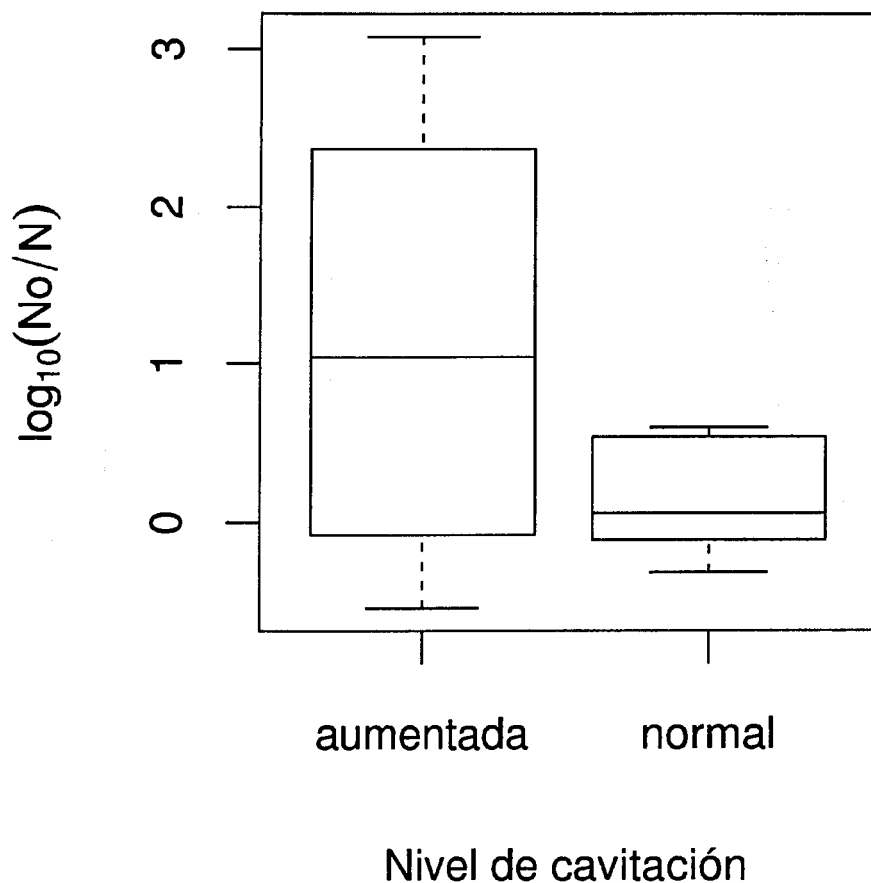


Figura 15. Disminución logarítmica de células en fase estacionaria de *E. coli* O157:H7 en función del nivel de cavitación. La línea en las cajas representa la media de tres réplicas independientes, las cajas los cuantiles 25 y 75% y las barras los valores extremos.

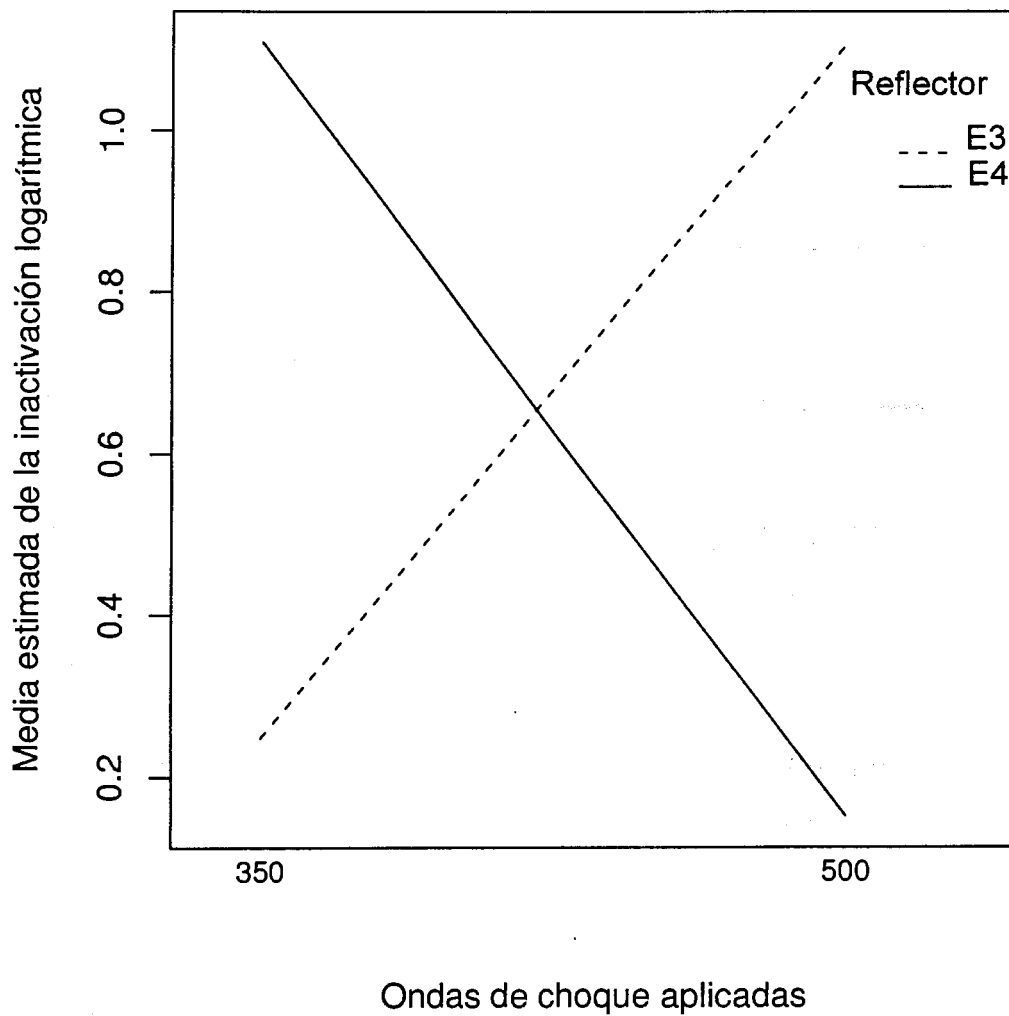


Figura 16. Inactivación logarítmica estimada de *E. coli* O157:H7 en SSI en función del número de ondas de choque y el tipo de reflector.

Análisis de calidad del jugo fresco

Se obtuvieron cuentas de tres grupos importantes: mesófilos aerobios, coliformes, hongos y levaduras. A todas las muestras de jugo se les midió el pH. Al observar el Cuadro 23, vemos que aún cuando el jugo fresco se obtuvo en condiciones asépticas, tiene una carga microbiana considerable:

Evaluación del número de ondas de choque aplicadas, la cavitación, la luz producida por la descarga y el nivel de inóculo

En estos experimentos se utilizó el reflector E4 ya que, de acuerdo con el Cuadro 21, no tiene ningún efecto el cambiar de reflector. La temperatura de realización de los experimentos varió entre los 21-22 °C.

El Cuadro 24 muestra las cuentas viables obtenidas de la inactivación de *E. coli* O157:H7 en jugo fresco de naranja. La mayor inactivación logarítmica lograda para células en fase estacionaria de una cepa ácido tolerante de *E. coli* O157:H7 inoculada en jugo de naranja fue de 1.11 log₁₀ UFC/ml (Cuadro 25). Esta se logró con el nivel de inóculo bajo (3 - 4 log₁₀ UFC/ml), con 350 ondas de choque aplicadas, sin dejar pasar la luz y con cavitación aumentada.

El ANOVA (Cuadro 26) reveló que ninguno de los factores tiene efecto sobre la disminución poblacional de *E. coli* O157:H7. La Figura 17 muestra la disminución poblacional debido a la interacción entre el nivel de inóculo y el número de choques aplicados; “sí” y “no” indican si hubo o no luz presente en el tratamiento; “alto” y “bajo”, se refieren al nivel de inóculo utilizado. Se puede ver claramente que no hay disminución del microorganismo en el nivel de inóculo alto.

Cuadro 23. Contenido microbiano del jugo fresco de naranja.

Grupo indicador	Contenido Microbiano UFC/ml
Mesófilos aerobios	4.24 ± 0.21
Coliformes	4.19 ± 0.82
Hongos y levaduras	3.86 ± 0.80

Los valores que se presentan son la media del \log_{10} de tres réplicas independientes \pm una desviación estándar.

Cuadro 24. Cuentas viables de la inactivación de *E. coli* O157:H7 en jugo fresco de naranja.

Tratamiento	log N₀ (UFC/ml)	log N (UFC/ml)	Réplica
1	5.3010	5.0374	1
1	4.4771	4.2455	2
1	5.7404	5.8129	3
2	5.4771	5.5441	1
2	7.0000	4.4728	2
2	6.0414	6.0569	3
3	5.3010	5.5441	1
3	6.6021	4.3674	2
3	6.0492	6.2695	3
4	5.0000	5.3541	1
4	6.4771	4.2330	2
4	5.7853	6.1931	3
5	3.1004	2.5185	1
5	4.4166	4.1436	2
5	6.2014	6.7482	3
6	3.1004	3.0645	1
6	4.5276	2.3802	2
6	6.1038	6.8261	3
7	3.2227	2.9590	1
7	4.5132	4.0382	2
7	6.0453	6.1790	3
8	3.0334	3.3385	1
8	4.4609	4.2068	2
8	6.0086	6.1038	3

Cuadro 25. Inactivación de *E. coli* O157:H7 en jugo fresco de naranja por efecto del número de ondas de choque aplicadas, la cavitación, la luz producida por la descarga eléctrica y el nivel de inóculo.

Experimento	Nivel de inóculo ^a	Luz ^b	Ondas de choque aplicadas	Inactivación logarítmica lograda (CFU/ml) ^c
1	Alto	Si	350	-0.37 ± 0.50
2			500	-0.25 ± 0.22
3		No	350	-0.31 ± 0.34
4			500	-0.18 ± 0.06
5	Bajo	Si	350	0.37 ± 0.15
6			500	0.41 ± 0.25
7		No	350	1.11 ± 1.47
8			500	-0.03 ± 0.40

^a Cuenta viable inicial inóculo alto: 7-8 log₁₀ UFC/ml. Cuenta viable inicial inóculo bajo: 3 - 4 log₁₀ UFC/ml.

^b La luz generada por la descarga eléctrica se bloqueó utilizando una bolsa de polipropileno negro (No), o se permitió llegar a los viales (Si).

^c Media de tres réplicas independientes ± desviación estándar. Log₁₀ (N₀/N), donde N₀ representa la cuenta viable en los viales control y N, la cuenta viable en los viales tratados.

Cuadro 26. ANOVA de la inactivación de *E. coli* O157:H7 en jugo fresco de naranja.

Factor	Suma de cuadrados	Valor p
Luz	0.049	0.7113
Ondas de choque	0.1800	0.4839
Inóculo	2.2005	0.3211
Inóculo-luz	0.0077	0.883
Inóculo-och	0.4547	0.2785
Luz-och	0.3345	0.3473
Residuales	2.3070	-----

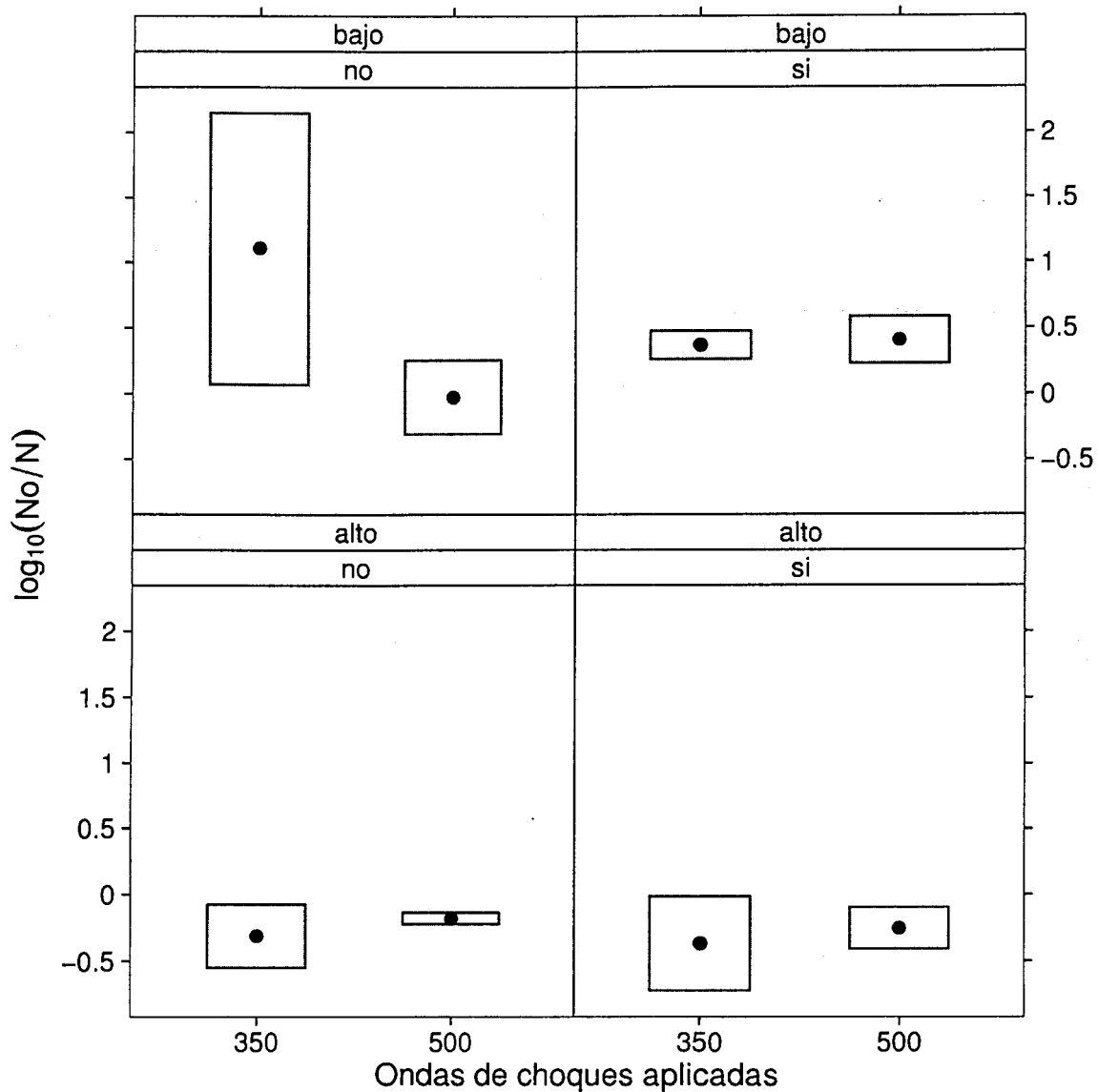


Figura 17. Inactivación logarítmica de células en fase estacionaria de *E. coli* O157:H7 debida a la interacción entre las ondas de choque y el nivel de inóculo utilizado, con y sin luz. El punto negro representa la media de 3 réplicas independientes, las cajas los cuantiles 25 y 75%.

7. DISCUSIÓN

Estudió del efecto del número de ondas de choque aplicadas, la cavitación, la luz producida por la descarga y la fase de crecimiento sobre la viabilidad de una cepa nativa de *E. coli* O157:H7 en SSI

La población de *E. coli* O157:H7, cepa H1750PG, no disminuyó ni en un logaritmo al aplicar los diferentes tratamientos con ondas de choque. Alpas y *col.* (2000) observaron una inactivación de 0.58 log₁₀ UFC/ml sobre *E. coli* O157:H7 933, al aplicar 207 MPa de presión estática a 25 °C sobre el mismo patógeno. Aunque la presión estática y la presión dinámica generada por las ondas de choque no son comparables (por ejemplo, la presión estática no produce cavitación), nuestros resultados y los de Alpas y *col.* sugieren que *E. coli* O157:H7 es un microorganismo muy resistente al estrés producido por ambos tratamientos.

La aplicación de ondas de choque sobre *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* en estudios independientes entre sí, dio una inactivación de 3.17 y 1.56 UFC/ml respectivamente. Si comparamos estos valores con la inactivación lograda con *E. coli* O157:H7 (0.58 UFC/ml), en nuestro estudio podemos ver que es el microorganismo más resistente a las ondas de choque. De igual manera, al evaluar la resistencia térmica de *E. coli* O157:H7 resultó ser el más termoresistente de estos tres microorganismos (Cabello, 2003; Barajas, 2003).

E. coli O157:H7 es una bacteria relativamente sensible al calor. Se inactiva en condiciones normales de pasteurización. Sin embargo, en recientes investigaciones se observó que la tolerancia al calor es influenciada por la preexposición a ambientes ácidos y a altas concentraciones de cloruro de sodio (Ryu y Beuchat, 1998). Esto es de importancia ya que la resistencia al calor de los microorganismos generalmente se establece en un medio con pH neutro y con una actividad de agua adecuada, pero en la práctica, el pH y la concentración de solutos del alimento influenciará la resistencia al calor (Blackburn y *col.*, 1997) y a las ondas de choque.

De acuerdo al ANOVA, la interacción entre la luz y la fase de crecimiento fue la responsable de la inactivación observada ($p < 0.05$). De acuerdo con nuestros resultados, las ondas de choque tienen mayor efecto sobre células que se encuentran en la fase exponencial de crecimiento. Esto es importante, ya que cualquier tratamiento, debe asegurar la muerte completa de células en fase estacionaria (Dodd y col., 1997), ya que pueden causar un daño a la salud si están dañadas subletalmente. La luz UV, que se produce con cada descarga eléctrica, pudiera estar contribuyendo a la inactivación observada, ya que este tipo de radiación puede afectar a las proteínas y a los ácidos nucleicos de las bacterias, teniendo así un efecto letal y mutagénico sobre las mismas.

Estudió del efecto del número de ondas de choque aplicadas, la cavitación, la luz producida por la descarga y el tipo de reflector sobre la viabilidad de células en fase estacionaria de una cepa ácido tolerante de *E. coli* O157:H7 en SSI

E. coli O157:H7 es un microorganismo ácido tolerante, teniendo un pH óptimo de crecimiento de aproximadamente 7 y un rango de crecimiento de 4 a 9 (Hsin-Yi y Chou, 2001). Puede sobrevivir hasta 21 días de almacenamiento a 4 °C en jugo de naranja y sidra (Ryu y Beuchat; 1998). La sobrevivencia en condiciones ácidas no sólo depende del pH, sino también del tipo de acidulante, así como de la concentración de protones disociados y no disociados y, por último, de las características metabólicas y fisiológicas en las que se encuentre el microorganismo. Un microorganismo que se encuentre en fase exponencial, será más sensible al ataque por cualquier efecto físico que uno en fase estacionaria (Winniczuk y Parish, 1997).

Un ejemplo de esto son las investigaciones realizadas por Conner y Kotrola (1995), quienes utilizaron seis diferentes ácidos: málico, tartárico, cítrico, láctico, acético y mandélico, con pH's de 4, 4.5, 5, 5.5 y 7, manteniéndolos a 4, 10, 25 y 37

°C, con el objetivo de determinar como afecta a *E. coli* O157:H7 el tipo de ácido, el pH y la temperatura. Los ácidos que tuvieron mayor efecto inhibitor a temperatura ambiente fueron el acético y el mandélico mientras el que tuvo menor efecto fue el ácido tartárico. (Conner and Kotrola, 1995).

Normalmente en condiciones ácidas, los microorganismos mueren, sin embargo, *E. coli* O157:H7 en fase estacionaria podría expresar el factor sigma RpoS, el cual está asociado a la resistencia general a ambientes estresantes (Datta y Benjamin, 1999). De igual manera, la ácido tolerancia de los microorganismos está asociada a la secreción de ciertos componentes extracelulares. Dichos componentes subsecuentemente interactúan con organismos normales convirtiéndolos en ácido tolerantes (Rowbury y col., 1998). Esto los vuelve más resistentes a otros tipos de estrés.

En las condiciones evaluadas, se logró una mayor inactivación (2.34 UFC/ml), en comparación con el primer Objetivo específico (Cuadro 15). Esto se puede atribuir al incremento en la dosis de ondas de choque aplicadas que hubo en esta parte de la investigación (Cuadro 21). El ANOVA reveló que la interacción entre el tipo de reflector y las ondas de choque fue la responsable de la inactivación lograda.

Debido a que con el reflector E3 se tiene una menor pérdida de energía, esperábamos que al concentrar la energía por medio de este reflector, se lograría una mayor inactivación; sin embargo, esto no sucedió. Se puede observar (Cuadro 21) que para ambos reflectores la reducción es casi igual, tanto a 350 ondas de choque como a 500, por lo que decidimos no cambiar el reflector.

De acuerdo con el ANOVA, tanto la luz como la cavitación influyeron significativamente en la reducción de la población observada. La cavitación forma pequeñas burbujas en el agua, que al colapsarse, puede conducir a la homólisis de la molécula de agua, generando radicales libres H[·], OH[·] y peróxido de hidrógeno. Dichas especies son un poderoso agente oxidante (Earnshaw y col., 1995;

Segebarth y *col.*, 2002). También las colisiones entre microorganismos provocado por la cavitación podrían tener un efecto bactericida. Además, como ya se mencionó, la luz UV podría afectar las proteínas, el ADN y el ARN de la célula bacteriana y provocar su muerte.

Estudió del efecto del número de ondas de choque aplicadas, la luz producida por la descarga y el nivel de inóculo sobre la viabilidad de células en fase estacionaria de una cepa ácido tolerante de E. coli O157:H7 en jugo fresco de naranja

Para jugo sin pasteurizar, el pH debería estar entre 3.9 y 4.2 (Ryu and Beuchat, 1998). Los niveles microbiológicos iniciales en jugo fresco varían de 1.3 a 5.3 UFC/ml (Pao and Davis, 2001) . Según la norma oficial mexicana los parámetros para jugos pasteurizados es pH de 4.6, mesófilos aerobios 100 UFC/ml y de 25 UFC/ml para hongos y levaduras como máximo (NOM-130-SSA1-1995). Si se comparan estos valores con los mencionados en el Cuadro 23, observamos microorganismos que deben de ser eliminados para mayor seguridad del consumidor.

En estos experimentos podríamos atribuir la muerte celular a la cavitación producida en los viales, ya que se logró una inactivación sin luz pero con cavitación (Cuadro 25). Por otra parte, el aumento en las ondas de choque no fue relevante, ya que hubo mayor inactivación a 350 que a 500 ondas de choque aplicadas (Cuadro 25).

El jugo de naranja contiene compuestos que podrían proteger al microorganismo, como su contenido de azúcar y los compuestos fenólicos, tales como los flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, que ayudarían a los microorganismos a protegerse de los diversos ambientes estresantes. Los flavonoides tienen propiedades antioxidantes, los cuales pueden neutralizar los radicales libres, enmascarar iones metálicos y modular ciertas actividades

enzimáticas. Esto es importante porque inhiben la peroxidación de lípidos y de esta manera ayudarían a evitar la destrucción celular (Caccioni y col., 1998; Robards y col., 1999; Minussi y col., 2003; Loo, 2003; López y col., 2003). *E. coli* O157:H7 podría estar protegido por dichos componentes, lo cual provocaría una barrera efectiva en contra de la cavitación generada por las ondas de choque y contra los radicales libres.

La reducción observada sobre las suspensiones de *E. coli* O157:H7 fue muy poca, tal vez una mayor dosis de ondas de choque conducirían a una mayor reducción. Podríamos potencializar la cavitación inyectando microburbujas a las suspensiones, así lograríamos un mayor efecto sobre la muerte bacteriana. También analizar como se comporta el patógeno suspendido en sustancias tales como flavonoides al aplicarle ondas de choque, nos darían una idea de si este tipo de sustancias ayudan a crear una barrera.

Un mejor entendimiento del efecto inhibitor nos conduciría a la solución de problemas para, en un futuro, posiblemente aplicar dicha técnica como un método de conservación. Falta mucho por saber en cuanto a las condiciones de operación de las ondas de choque, la dosis, las presiones y sobre todo cual o cuales son los blancos que afectan en los microorganismos, también si solamente sufren un daño subletal o letal. Para todo esto se necesitan pruebas mucho más específicas.

8. CONCLUSIONES

Se puede concluir que:

- Las ondas de choque inactivan a *E. coli* O157:H7 en SSI y jugo de naranja.
- Un aumento en la dosis de ondas de choque inactiva en mayor medida al microorganismo.
- La inactivación observada es consecuencia de un mecanismo complejo en el que las interacciones entre la luz producida por la descarga eléctrica, la cavitación y el número de ondas de choque son significativas ($p < 0.05$).
- Al no reducir ni en $5 \log_{10}$ la viabilidad microbiana, las ondas de choque todavía no pueden ser utilizadas como un método alternativo de conservación de alimentos. Se recomienda continuar con la búsqueda de parámetros más agresivos o combinarlas con algún otro tratamiento.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abee, T., and Wouters, J. A. 1999.** Microbial stress response in minimal processing. *Int. J. Food Microbiol.* 50:65-91.
- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Sikes, A., Dunne, C. P., and Ray, B. 1999.** Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Appl. and Environ. Microbiol.* 65:4248-4251.
- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F. and Ray, B. 2000.** Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature y pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 60: 33-42.
- Altekruse, S. F., Cohen, M. L. and Swerdlow, D. L. 1997.** Emerging foodborne diseases. *Emerging Infectious Diseases.* 3:285-293.
- Arthur, M. H. 2002.** IFT Expert report on emerging microbiological food safety issues. Implications for control in ghe 21st century. Arthur, M. H. Ed. Chicago, IL.
- Barajas, A. D. 2003.** Reporte interno del laboratorio de ondas de choque. Querétaro, Qro. UNAM.
- Beltrametti, F., Kresse, A. U. And Guzmán, C. A. 2000.** Transcriptional regulation of the *pas* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiol. Lett.* 184:119-125.
- Berens, M. E., Welander, Ch. E., Griffin, A. S., and McCullough, D. L. 1989.** Effect of acoustic shock waves on clonogenic growth and drug sensitivity of human tumor cells in vitro. *The J. Urol.* 142:1090-1094.
- Blackburn, C., Curtis, L. M., Humpheson, L., Billon, C., and McClure, P. J. 1997.** Development of thermal inactivation models for *Salmonella enteritidis* and

- Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors. *Int. J. Food Microbiol.* 38: 31-44.
- Box G. E. P., Hunter W. G. and Hunter J. S. 1978.** Statistics for Experiments. New York: John Wiley & Sons.
- Bräuner, T., Brümmer, F., and Hülser, D. F. 1989.** Histopathology of shock wave treated tumor cell suspensions and multicell tumor spheroids. *Ultrasound Med. Biol.* 15:451-460.
- Bradshaw, J. G., Peeler, J. T., Corwin, J. J., Bennett, J. E., and Twedt, R. M. 1987.** Thermal resistance of disease-associated *Salmonella typhimurium* in milk. *J. Food Prot.* 50: 95-96.
- Brümmer, F., Brenner, J., Bräuner, T., and Hülser, D. F. 1989.** Effect of shock waves on suspended and immobilized L1210 cells. *World J. Urol.* 8:224-232.
- Cabello, M. E., 2003.** Efecto de la aplicación de ondas de choque sobre la viabilidad de una cepa ácido-resistente de *Salmonella Typhimurium* suspendida en solución salina isotónica y en jugo de naranja. Querétaro, Qro. UAQ. Tesis para obtener el título de Químico en alimentos. 59.
- Caccioni, D. R. L., Guizzardi, M., Biondi, D. M., Renda, A., and Ruberto, G. 1998.** Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Int. J. Food Microbiol.* 43: 73-79.
- Castro, A. J., Barbosa, G. V., and Swanson, B. G. 1993.** Microbial inactivation of foods by pulsed electric fields. *J. Food Proc. Preserv.* 17:47-73.

- Chaussy, Ch., Schmiedt, E., and Jocham, D. 1982.** First clinical experience with extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves. *J. Urol.* 127: 417-430. Citado en: Chaussy, Ch. G., 1988.
- Chaussy, Ch. G., 1988.** ESWL: past, present, and future. *J. Endourol.* 2: 197-205.
- Coia, J. E. 1998.** Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. *Inmunol. Med. Microbiol.* 20:1-9.
- Conner, D. E., and Kotrola, J. S. 1995.** Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:382-385.
- Cuyás, X. F., Trujillo, A. J., Sendra, E., y Guamis, B. 1994.** Utilización de los tratamientos por alta presión para la conservación de alimentos. *Instituto de Investigaciones para la industria alimentaria (La Habana).* 35-39.
- Datta, A. R., and Benjamin, M. M. 1999.** Cell density dependent acid sensitivity in stationary phase cultures of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiol. Lett.* 181: 289-295.
- Dodd, Ch. E. R., Sharman, R.L., Bloomfield, S.F., Booth, I.R., and Stewart, G. S. A. 1997.** Inimical Processes: Bacterial self-destruction and sub-lethal injury. *T. Food Sci. & Tech.* 8: 238-241.
- Delius, M. 1994.** Medical applications and bioeffects of extracorporeal shock waves. *Shock Waves.* 4: 55-72.
- Desrosier, N. W. 1992.** Elementos de tecnología de alimentos. Cía. Editorial Continental. 272-273, 278.
- Dingman, D. W. 2000.** Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in bruised apple (*Malus domestica*) tissue as influenced by cultivar, date of Harvest, and source. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1077-1083.

- Doyle, M. P., Beuchat, L. R. and Montville, T. J. 2001.** Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Chapter 10. 2nd Ed. Edited by m. P. Doyle et al.193-203.
- Earnshaw, R. G., Appleyard, J. and Hurst, R. M. 1995.** Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *Int. J. Food Microbiol.* 28:197-219.
- Ekmekcioglu, C., Strauss-Blasche, G., Leibetseder, V. J., and Marktl, W. 1999.** Toxicological and biochemical effects of different beverages on human intestinal cells. *Food Res. Int.* 32: 421-427.
- Farkas, J. 1998.** Irradiation as a method for decontaminating food. *Int. J. Food Microbiol.* 44:189-204.
- Farmworth, E. R., Lagacé, M., Couture, R., Yaylayan, V., and Stewart, B. 2001.** Thermal processing, storage conditions, and the composition and physical properties of orange juice. *Food Res. Int.* 34: 25-30.
- Fennema, O. R. 1996.** Food Chemistry. Fennema, O. R. Ec. Marcel Dekker, Inc., Wisconsin. 746-747.
- Feng, P. 1995.** *Escherichia coli* serotype O157:H7: novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. *Emerging Infectious Diseases.* 1:47-52.
- Fernández, E. 2000.** Microbiología e Inocuidad de los alimentos. UAQ. Ed. Querétaro. Cap. 12: 217-231
- Fratamico, P. M., and Strobaugh, T. P. 1998.** Simultaneous detection of *Salmonella* spp and *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 21: 92-98.

García, C., Hauben, K. J. A., and Michiels, Ch. W. 1998. High-pressure inactivation and sublethal injury of pressure resistant *Escherichia coli* mutants in fruit juices. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1566-1568.

Gerhardt, P., and Marquis, R. E. 1989. Spore thermoresistance mechanisms. In: Smith, Sipecky, R., and Stlow, P. Ed. Regulation of prokaryotic development, America society for Microbiology, Washington, D. C. 1763-1770.

Gould, G. W. 1996. Methods for preservation and extension of shelf life. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 51-64.

Grigeldo, M. N., and Martín, B. O. 1999. Characterización of dietary fiber from orange juice extraction. *Food Res. Int.* 31:355-361.

Hamilton, W. A., and Sale, A. J. H. 1967. Effects of high electric field on microorganisms II. Mechanism of action of the lethal effect. *Biochim. Biophys.* 148:789-800.

Hancock, D., Besser, T., Lejeune, J., Davis, M., and Rice, D. 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. *Int. J. Food Microbiol.* 66:71-78.

Heuvelink, A. E., Zwartkruis, J. T. M., van den Biggelaar, F. L. A. M., van Leeuwen, W. J., and de Boer, E. 1999. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *Int. J. Food Microbiol.* 52:67-75.

Hite, B. H. 1899. The effects of pressure in the preservation of milk. *West Virginia Agricultural Experimental Stational Bulletin.* 58: 15-35.

Hsin-Yi, Ch., and Chou, Ch. 2001. Acid adaptation and temperature effect on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk product. *Int. J. Food Microbiol.* 70:189-195.

- Hülshager, H., Potel, J., and Niemann, E. G. 1983.** Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiat. Environ. Biophys.* 22:149-162.
- Ihaka, R. and Gentleman, R. 1996.** A language for data analysis and graphics. *J. Computational Graph. Stats.* 5:299-314.
- Jia, M., Zhang, Q. H., and Min, D. B. 1999.** Pulsed electric field processing effects on flavor compounds and microorganisms of orange juice. *Food Chem.* 65:445-451.
- Jordan, M. J., Tillman, T. N., and Mucci, B., and Laencina, J. 2001.** Using HS-SPME to determine the effects of reducing insoluble solids on aromatic composition of orange juice. *Lebensm. –Wiss- u.-Technol.* 34:224-250.
- Kalchayanand, N., Sikes, A., Dunne, C. P. and Ray, B. 1998.** Factors influencing death and injury of foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization. *Food Microbiol.* 15:207-214.
- Kerfoot, W. W., Beshai, A. Z., and Carson, C. C. 1991.** The effect of isolated high-energy shock wave treatments on subsequent bacterial growth. *Urol. Res.* 183-186.
- Kimmit, P. T., Harwood, C. R. and Barer, M. R. 2000.** Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerging Infectious Diseases.* 6:458-465.
- Kris, E. P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Griel, A. E., and Etherton, T. D. 2002.** Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine.* 113:71-88.

- Linton, M., McClements, J. M. J., and Patterson, M. E. 1999.** Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during storage in pressure-treated orange juice. *J. Food Prot.* 62: 1038-1040.
- Loo, G. 2003.** Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (Review). *J. Nutr. Biochem.* 14:64-73.
- López, M., Martínez, F., Del Valle, C., and Luque, F. R. 2003.** Study of phenolic compounds as natural antioxidants by a fluorescence method. *Talanta.* 60:609-616.
- Loske, A. M. 1990.** Generación de ondas de choque en agua por rompimiento eléctrico. México, D. F. UNAM. Tesis para obtener el grado de maestro. 17-24, 37, 89, 92-96.
- Loske, A. M., Alvarez, U. M., Hernández, C., Castaño, E., Prieto, F. E. 2002.** Bactericidal effect of underwater shock waves on *Escherichia coli* ATCC 10536 suspensions. *Inn. Food Sci. Emerging Technol.* 3:321-327.
- Loske, A. M., Hernández, C., Armenta, E., y Prieto, F. E. 2000.** Shock wave potential as a food preservation method. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.* 3:23-30.
- Loske, A. M., y Prieto, F. E. 1999.** Fundamentos técnicos de litotripsia extracorporal. Ed. JGH. México, D. F. 1-3, 27-46, 129-131, 134-139.
- Loske, A. M., y Prieto, F. E.** Generador de ondas de choque en agua. *Ciencia y Desarrollo.* 17:82-89.
- Loske, A. M., Prieto, F. E. y Méndez, A. 1998.** Generador de ondas de choque experimental. Memorias de trabajo del 1er congreso latinoamericano de ingeniería biomédica. 54-57.

- Loske, A. M., Prieto, F. E., Zavala, M. L., Santana, A. D., and Armenta, E. 1999.** Repeated application of shock waves as a possible method for food preservation. *Shock Waves*. 9:49-55.
- Madigan, T. M., Martinko, J. M. y Parker, J. 1999.** Biología de los Microorganismos. Ed. Prentice Hall. Madrid. 346
- McMeekin, T. A., Brown, J., Krist, K., Miles, D., Neumeyer, K., Nichols, D. S., Olley, J., Presser, K., Ratkowsky, D. A., Ross, T., Salter, M. and Soontranon, S. 1997.** Quantitative microbiology: a basis for food safety. *Emerging Infectious Diseases*. 3: 541-549.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M. and Tauxe, R. V. 1999.** Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*. 5: 607-625.
- Metrick, C., Hoover, D. G., and Farkas, D. F. 1989.** Effects of high hydrostatic pressure on heat-resistant and heat-sensitive of *Salmonella*. *J. Food Sci.* 54:1547-1564.
- Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G. M., and Durán, N. 2003.** Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chem.* 1-8.
- Morgan, T. R., Laudone, V. P., Heston, W. D., Zeitz, L., and Fair, W. R. 1988.** Free radical production by high energy shock wave-comparison with ionizing irradiation. *The J. Urol.* 139:186-189.
- Mussa, D. M., Ramaswamy, H. S., and Smith, J. P. 1999.** High pressure (HP) destruction kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in raw milk. *Food Res. Int.* 31:343-350.

- Nataro, J. P., and Kaper, J. B. 1998.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11:142-201.
- Olsen, S. J., Miller, G., Breuer, T., Kennedy, M., Higgins, Ch., Walford, J., Mckee, G., Fox, K., Bibb, W. and Mead, P. 2002.** A waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: implications for rural water systems. *Emerging Infectious Diseases*. 8: 370-375.
- Oshima, T., Tanaka, S., and Teshima, K. 1991.** Effects of shock waves on microorganisms: an evaluation of the effects. In. Takayama K. Shock waves. Springer. Berlin Heidelberg. New York. 1215-12919.
- Pao, S., and Davis, C. L. 2001.** Transfer of natural and artificially inoculated microorganisms from orange fruit to fresh juice during extracto. *Lebensm. –Wiss. u.-Technol.* 34:113-117.
- Parish, M. E. 1998.** Orange juice quiality after treatmente by thermal pasteurization or isostatic high pressure. *Lebensme. –Wiss. u.-Technol.* 31:439-442.
- Patterson, M. F., and Kilpatrick, D. J. 1998.** The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry. *J. Food Prot.* 61: 432-436.
- Peleg, M. 1999.** On calculating sterility in thermal and non-thermal preservation methods. *Food Res. Int.* 32:271-278.
- Peleg, M. 2000.** Microbial survival curves – the reality of flat “shoulders” and absolute thermal death times. *Food Res. Int.* 33:531-538.
- Potter, N. N. 1978.** La ciencia de los alimentos. Edutex: 34-38.

Qin, B., Pothakamury, U. R., Vega, H., Martín, O., Barbosa, G. V. and Swanson, B. G. 1995. Food pasteurization using high-intensity pulsed electric fields. *Food Technol.* 49: 55-60.

Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., and Glover, W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66: 401-436.

Rowan, N. J. 1999. Evidence that inimical food-preservation barriers alter microbial resistance, cell morphology and virulence. *Food Sci. Technol.* 10:261-270.

Rowbury, R. J., Hussain, N. H., and Goodson, M. 1998. Extracellular proteins and other components as obligate intermediates in the induction of a range of acid tolerance and sensitization responses in *Escherichia coli*. *Microbiol. Lett.* 166: 283-295.

Ruiz, F. J., y Ibarz, L. 2002. Litotripcia extracorporal por ondas de choque. *Urologia y Comarques:* 14:14-21.

Russell, N. J. 2002. Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing. An overview. *Int. J. Food Microbiol.* 79:27-34.

Ryu, J., and Beuchat, L. R. 1998. Influence of acid tolerance response on survival, growth, and thermal cross-protection of *Escherichia coli* O157:H7 in acidified media and fruit juices. *Int. J. Food Microbiol.* 45: 185-193.

Segebarth, N., Eulaerts, O., Reisse, J., Crum, L. A., and Matula T. J. 2002. Correlation between acoustic cavitation noise, bubble population, and sonochemistry. *J. Phys. Chem.* 106: 9181-9190.

- Shaw, P. E., and Moshonas, M. G. 1997.** Quantification of Volatile constituents in orange juice drinks and its use for comparison with pure juices by multivariate analysis. *Lebensme. -Wiss. u.-Technol.* 30: 497-501.
- Sheridan, J. J., and McDowell, D. A. 1998.** Factors affecting the emergence of pathogens on foods. *Meat Sci.* 49:151-167.
- Strachan, N. J. C., Fenlon, D. R., and Ogden, I. D. 2001.** Modelling the vector pathway and infection of humans in an environmental outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiol. Lett.* 203:69-73.
- Suhr, D., Brümmer, F., and Hülser, D. F. 1991.** Cavitation generated free radicals during shock wave exposure: investigations with cell-free solutions and suspended cells. *Ultrasound Med. Biol.* 17: 761-768.
- Tauxe, R. V. 2001.** Food safety and irradiation: protecting the public from foodborne infections. *Emerging Infectious Diseases.* 7: 516-521.
- Thakur, B. R., and Singh, R. K. 1995.** Combination processes, in food irradiation. *T. Food Sci. Technol.* 6:7-11.
- Tonder, T., Petersen, M. A., Poll, L., and Olsen, C. E. 1998.** Discrimination between freshly made and stored reconstituted orange juice using GC odour profiling and aroma values. *Food Chem.* 61:223-229.
- Uljas, A. E., and Ingham, S. C., 1999.** Combinations of intervention treatments resulting in 5-log₁₀-unit reductions in numbers of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* DT104 organism in apple cider. *Appl. Environ-Microbiol.* 65:1924-1929.

Vega, H., Martín, O., Qin, B., Chang, F., Góngora, M. M., Barbosa, G. V., and Swanson. 1997. Non-thermal food preservation: Pulsed electric fields. *T. Food Sci. Technol.* 8:151-157.

Von Eiff, C., Overbeck, J., Haupt, G., Herrmann, M., Winckler, S., Richter, K. D., Peters, G., and Spiegel, H. U. 2000. Bactericidal effect of extracorporeal shock waves on *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 49: 709-712.

Watanabe, Y., Ozasa, K., Mermin, J. H., Griffin, P. M., Masuda, K., Imashuku, S. and Sawada, T. 1999. Factory outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Japan. *Emerging Infectious Diseases.* 5: 424-428.

Weagant, S. D., and Feng, P. C. H. 2002. Comparative analysis of modified rapid presence/absence test and the standard MPN method for detecting *Escherichia coli* in orange juice. *Food Microbiol.* 19: 111-115.

Winniczuk, P. P., and Parish, M. E. 1997. Minimum inhibitory concentrations of antimicrobials against micro-organisms related to citrus juice. *Food Microbiol.* 14:373-381.

Yamamoto, S. A., and Harris, L. J. 2001. The effects of freezing and thawing on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *Int. J. Food Microbiol.* 67:89-96.

Ziegler, M., Koper, B., Riedlinger, R., Wurster, H., Ueberle, F., Neisius, D., Krauss, W., Vallon, P., Gebhardt, T. Die zertrümmerung von nierensteinen mit einem piezoelektrischen gerätesystem. Erste Klinische Erfahrung. *Urologe.* A25:193, 1986.

11. APÉNDICE

Glosario

Conductividad: está relacionada con la facilidad con la cual la corriente eléctrica puede fluir de un medio.

1Gray = 100 Rad.

Rad.: es la dosis de radiación absorbida (100erg/g).

MUG: 4-metilumberiferil- β -D-glucorónido.

Litiasis: es la presencia de cálculos a cualquier altura del sistema excretor de las vías urinarias.

Crepitación: chasquidos en las articulaciones.

Abreviaturas

UFC/ml: unidades formadoras de colonia por mililitro.

ANOVA: análisis de varianza.

SSI: solución salina isotónica

ASTEL: agar soya tripticasa con extracto de levadura al 0.6%.

CSTEL: caldo soya tripticasa con extracto de levadura al 0.6%.

MCS: agar MacConkey-sorbitol

MPa: megapascals (unidades de presión).

atm: atmósferas (unidades de presión).

ETA: Enfermedades Transmitidas por Alimentos.