



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

Programa de Posgrado en Alimentos del Centro
de la República. (PROPAC)

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Estudio de la aplicación del agua electrolizada neutra en la
desinfección de frutas y hortalizas frescas”.

TESIS

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

Presenta: I. Q. en A. Elizabeth Eugenia Cadena Moreno

Dirigido por: Dra. Blanca Estela García Almendárez.

CU, Santiago de Querétaro, Qro. Diciembre, 2014.



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

“Estudio de la aplicación del agua electrolizada neutra en la desinfección de frutas y hortalizas frescas”.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Maestro en Ciencia y Tecnología de alimentos

Presenta:

I. Q. en A. Elizabeth Eugenia Cadena Moreno.

Dirigido por:

Dra. Blanca Estela García Almendárez

SINODALES

Dra. Blanca Estela García Almendárez
 Presidente



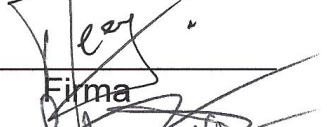
 Firma

Dr. Carlos Regalado González
 Secretario



 Firma

Dr. Yunny Meas Vong
 Vocal



 Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
 Suplente




 Firma

Dr. José Eleazar Barboza Corona
 Suplente



 Firma


M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
 Director de la Facultad de Química


Dr. Irineo Torres Pacheco
 Director de Investigación y Posgrad

Centro Universitario
 Querétaro, Qro.
 Diciembre, 2014.
 México.

“Jehová es mi peñasco y mi plaza fuerte y el Proveedor de escape para mí. Mi Dios es mi roca. En Él me refugiaré, mi escudo y mi cuerno de salvación. Mi altura segura”.

Salmos 18:2

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer y dedicarle esta investigación a Dios, por que siempre ha sido mi plaza fuerte en situaciones difíciles. Cuando sentía que no podía más, siempre me ayudó a encontrar el camino de vuelta. Sin ti, no podría haber culminado este proyecto.

Mis más grandes ejemplo de vida, a mis padres, Pedro Cadena y Eva Moreno, esta tesis es para ustedes. Siempre apoyándome y dándome consejos en cada decisión tomada. Brindándome su apoyo para nunca rendirme, regañándome cuando era necesario. Siempre impulsándome a seguir adelante y dar lo mejor de mi. Gracias por estar siempre a mi lado, no solo cuando más los necesitaba. LOS AMO.

A la Dra. Blanca, una excelente investigadora y un gran ser humano, por brindarme la oportunidad de seguir trabajando con ella, por su asesoramiento a lo largo de esta investigación y a los consejos brindados para llevar a cabo este proyecto. Gracias por recibirme en su laboratorio nuevamente y ayudarme a cumplir una meta más. Al Dr. Regalado, su ayuda ha sido invaluable, sus consejos y aportaciones al trabajo enriquecieron esta investigación. Gracias a los dos, por todo su apoyo.

Al Dr. Yunny Meas, por brindarme el agua electrolizada neutra, por su gran apoyo y colaboración para llevar acabo este proyecto, sin su aportación este trabajo no se hubiera podido realizar. A la Dra. Silvia, porque a pesar de que tiene muchas ocupaciones, siempre me brindo atención y tiempo, su apoyo ha sido invaluable y su aportación enriqueció el proyecto. Al Dr. Barboza, gracias por todas sus aportaciones y consejos.

A mis hermanos, Poncho, Kika y Edith. Son lo mejor, con ustedes he llorado y reído, y hecho muchas travesuras. Son parte de este triunfo. Gracias porque ustedes me han impulsado a ser mejor y siempre me apoyaron. Gracias por esos días en que necesitaba ir a la escuela los fines de semana. Los amo y sin ustedes tampoco podría haber culminado este proyecto, siempre me alentaron a seguir adelante.

A Jazel Velasco, muchas gracias, siempre has estado a mi lado, gracias por acompañarme cada fin de semana al laboratorio para hacer mis experimentos, seguramente querías ir a otro lugar, pero estabas allá apoyándome de todo corazón. Te amo y siempre lo haré. Nunca podré agradecerte todo lo que has hecho por mi. Tu formas parte de este éxito, de esta meta cumplida. Gracias por tu apoyo y escuchar mis presentaciones antes de cada seminario, acompañarme en mi estrés. Te estaré agradecida de por vida.

A Luis, Dunia y Rosa, su amistad es increíble. Hemos compartido esta aventura juntos y ahora es momento de separarnos, pero aunque la vida nos lleve por

caminos distintos, ustedes siempre estarán en mi mente y corazón. Se que triunfarán en lo que se desempeñen y siempre estaré orgullosa de ustedes. Gracias por formar parte de mi vida y de esta aventura que emprendimos juntos. Los consejos, regaños y travesuras, son mis mejores recuerdos. Los amo.

A mis amigos del laboratorio, que más que amigos, forman parte de mi familia. A Martha, Rodrigo, Tere, Víctor, Iraís, Blanca, Ivanna, Ángel y César. Alivianaron cada día, cada experimento. Gracias por su amistad, por sus consejos, por las bromas que alegraban cada día y por los muchos pasteles devorados. Los voy a extrañar mucho.

A Honorio, que se convirtió en mi hermanito en el laboratorio, siempre riéndonos, compartiendo traumas de los experimentos. Cada día me alegrabas y te preocupabas por mi. Gracias por tu bonita amistad. Te extrañaré demasiado.

A la UAQ y Facultad de Química por recibirme nuevamente para lograr una meta más.

A CONACyT, por el apoyo económico brindado a lo largo de la maestría, gracias por financiar proyectos de investigación que en un futuro ayudará a generaciones futuras.

A los trabajadores administrativos del posgrado en alimentos, a Carmelita, a Laura. Su ayuda es invaluable y aunque a veces preguntaba la misma cosa varias veces, siempre me ayudaron. Gracias por ayudarnos con tantas dudas que tenía, siempre dispuestas a responder cada de ellas.

RESUMEN

En la última década, la producción y el consumo de frutas y hortalizas frescas ha ido en aumento. Sin embargo, su composición puede proveer los suficientes nutrientes y condiciones para el desarrollo microorganismos patógenos y deterioradores entre los cuales destacan *Salmonella* spp y *L. monocytogenes*. Ya que éstos generalmente se consumen de manera cruda, sin ningún tipo de tratamiento que garantice su inocuidad, es indispensable el desarrollo de tratamientos y desinfectantes que no sean tóxicos ni corrosivos y que permitan reducir sustancialmente el número de microorganismos que se encuentran superficialmente en los alimentos. El agua electrolizada, es un agente alternativo que ha demostrado tener una actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos. El objetivo de esta investigación fue determinar el grado de desinfección del agua electrolizada neutra (AEN) y del NaClO en alimentos modelos (tomate, aguacate y espárrago) que presentan una topografía distinta así como la eliminación de *Salmonella sp.* y *L. monocytogenes* en la superficie del tomate y aguacate. Los alimentos de estudio fueron sumergidos en una solución de diferentes concentraciones de AEN (70-300) con distintos tiempos de contacto (1-5 min). La flora natural (coliformes, hongos y levaduras y bacterias mesófilas) fueron determinadas. *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp fueron inoculados en la superficie del tomate y del aguacate y tratados con AEN (200 ppm) y fueron almacenados a 4°C durante 21 días. Hipoclorito de sodio, NaClO (200) y agua destilada fueron usados como estándar de desinfectante y como control negativo, respectivamente. Las reducciones más grandes (>3 log UFC/unidad) en la flora natural se alcanzaron en la superficie lisa como la del tomate, pero en el caso del aguacate, la efectividad del desinfectante es mínima reduciendo entre 2-3 Log UC/unidad, probablemente debido a la rugosidad de la superficie. La efectividad de los tratamientos de desinfección del AEN (200) y del NaClO (120) fueron similares al no encontrarse diferencias significativas ($p < 0.05$), reduciendo aproximadamente 2 Log UFC/unidad. *Salmonella* y *L. monocytogenes* fueron inoculados en el tomate, NaClO y AEN fueron capaces de inactivar más de 2.5 log UFC/unidad después de un tiempo de contacto de 1 min. Por otro lado, los tratamientos de desinfección del aguacate, las reducciones alcanzadas fueron <2 Log UFC/unidad a la misma concentración y tiempo. Los resultados indican que la topografía de las frutas y hortalizas es un parámetro crítico en la adhesión bacteriana y por lo tanto en la remoción de las células por los desinfectantes. Los tratamientos con AEN mantuvieron los conteos en niveles no detectables (<1 Log UFC/unidad) al final del almacenamiento. Sin embargo, el NaClO requirió más tiempo (21 días) para alcanzar valores similares en las reducciones. Por lo que el AEN puede ser usado como una alternativa al uso del NaClO, reduciendo el desperdicio de agua y siendo más amigable con el medio ambiente y sin dañar la salud de los trabajadores.

Palabras clave: Frutas y hortalizas, desinfección, agua electrolizada neutra, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp.

ABSTRACT

In the last decade, the production and the consumption of fresh fruits and vegetables have been increasing. But, its composition provides nutrients and conditions for microbial growth. Pathogens most frequently associated with fresh produce include *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. Fresh produce are often consumed raw without any type of intervention that would reduce or eliminate pathogens prior to consumption. Sodium hypochlorite (SH) is the most used chemical disinfectant for washing fresh produce. However, the reaction of chlorine with other organic compounds reduce its effectiveness and may lead to the formation of potentially carcinogenic or mutagenic by-products. Recently, the application of electrolyzed water it has been reported to be effectiveness in reducing microflora and adhered pathogens to several fresh produce surface. The aim of this investigation was to compare the effectiveness and the degree of disinfection of sodium hypochlorite (SH) and neutral electrolyzed water (NEW) in the reduction of microflora and pathogenic microorganisms adhered to fresh produce surface. Tomatoes, avocado and asparagus were treated by immersion at various times of exposure (1-5 min) and total available chlorine concentration (70-300 ppm) of NEW. Natural flora (coliforms, yeast/molds and mesophilic bacterias) was determined. *L. monocytogenes*, and *Salmonella* spp, were inoculated on the surface of tomato and avocado and treated with NEW (200ppm) and subsequently were storage at 4°C during 21 days. Cells were recovered on selective media. Sodium hypochlorite, NaClO (200 ppm) and distilled water were used as a control of a sanitizer and as a negative control, respectively. Higher microbial reduction (>3 Log CFU/unit) in natural flora was reached in the smooth surface of tomato, but in avocado, the effectiveness in sanitizing the vegetables is minimal with less than 2-3 Log CFU/unit, probably due to the roughness of the surface. The disinfection treatments of NEW (200) and SH (120) were similar in degree of effectiveness, no significant difference were found ($p < 0.05$), both treatments reduced about 2 Log UFC/unit. *Salmonella* and *L. monocytogenes* cells inoculated in tomato, SH and NEW were able to inactivate up to 2.5 Log CFU/unit after 1 min. Compared to the disinfection treatments used in avocado, the reduction reached were <2 Log CFU/unit at the same concentration and time. The results indicate that topography of fruits and vegetables is a critical parameter for the adhesion of bacterial cells and hence, the removal of cells by disinfectants agents. Microbial counts of the pathogens analyzed in this study were reduced during the storage period. NEW treatment maintained the lowest values of pathogens during the whole storage period, reaching undetectable levels (<1 Log CFU/unit) at the end of storage. Following a similar pattern, SH treatments needed more time (21 days) to reach same values of pathogens as NEW disinfection treatment. NEW could be used as an alternative disinfectant, is less corrosive, reduces wastewater and it is environmentally friendly and does not damage human health.

Key words: Neutral electrolyzed water, Sodium hypochlorite, Fresh produce, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp.

ÍNDICE

Contenido	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. REVISIÓN DE LITERARIA.	3
II. 1 Frutas y Hortalizas.	3
II.1.1 Producción Mundial.	4
II.1.2 Producción en México.....	5
II.1.2.1 Tomate (<i>Lycopersicom esculentum</i>).	7
II.2.1.2 Espárrago (<i>Asparagus officinalis</i>)	10
II.2.1.3 Aguacate (<i>Persea americana</i>)	11
II.2 Problemática de frutas y hortalizas frescas.	13
II.2.1 Factores de contaminación	14
II.2.1.1 Factores pre-cosecha	14
II.2.1.2 Factores post-cosecha.	17
II.3. Microorganismos de interés asociados a frutas y hortalizas frescas... ..	22
II.3.1 <i>Salmonella</i> spp.	23
II.3.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	24
II.4 Enfermedades relacionadas con el consumo de frutas y hortalizas.....	26
II.5 Desinfección de frutas y hortalizas.	27
II.5.1 Hipoclorito de sodio (NaClO)	28
II.6.2 Otros desinfectantes.	31
II.5.3 Resistencia a antimicrobianos.	33
II.5.4 Agua electrolizada.	34

II.5.4.1 Producción.....	35
II.5.4.2 Mecanismo de acción.....	37
II.5.4.3 Teoría de electroactivación del agua.....	38
III. JUSTIFICACIÓN.....	41
IV. HIPOTESIS.....	42
V. OBJETIVOS.....	43
V.1 Objetivo general.....	43
V.2 Objetivos específicos.....	43
VI. METODOLOGÍA.....	44
VI.1 Materiales.....	44
VI.1.1 Materiales biológicos.....	44
VI.1.2 Alimentos.....	44
VI.1.3 Soluciones desinfectantes.....	44
VI.1.4 Compuestos químicos.....	45
VI.2 Métodos.....	45
VI.2.1 Activación de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Salmonella</i>	45
VI.2.2 Preparación del inóculo (coctel de microorganismos patógenos).....	46
VI.2.3 Preparación de las soluciones de tratamiento.....	46
VI.2.4 Efecto del agua electrolizada neutra sobre cultivos puros.....	47
VI.2.5 Retos microbianos.....	48
VI.2.5.1. Tomate.....	48
VI.2.5.2 Aguacate.....	48
VI.2.6 Tratamiento de alimentos con AEN.....	49
VI.2.6.1 Desinfección con AEN y NaClO para reducir la carga de la microflora natural de los alimentos modelos.....	49
VI.2.6.2 Reducción de los microorganismos patógenos inoculados en la superficie del alimento.....	49
VI.2.6.2.1 Tomate.....	49

VI.2.6.2.2 Aguacate	50
VI.2.6.3 Mantenimiento de la calidad microbiológica del tomate inoculado con <i>Salmonella</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i>	51
VI.2.7 Análisis microbiológico de los alimentos	52
VI.2.7.1 <i>Listeria monocytogenes</i> EGDe	52
VI.2.7.2 <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A.....	52
VI.2.7.3 <i>Salmonella</i> spp.....	53
VI.2.8. Desinfección con agua electrolizada neutra y NaClO para reducir la carga de la microflora natural de los alimentos modelos.....	53
VI.2.8.1. Determinación de la microflora natural de los alimentos modelos (Bacterias mesofílicas aerobias).....	53
VI.2.8.2 Determinación de Hongos y Levaduras	54
VI.2.8.3 Determinación de coliformes totales por Número más probable (NMP)	54
VI.2.8.3.1 Prueba presuntiva	54
VI.2.8.3.2 Prueba confirmatoria.....	55
VI.3 Análisis estadístico	55
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
VII.1 Calidad microbiológica de los alimentos en fresco: determinación de la microflora	56
VII.2 Efecto de las soluciones desinfectantes AEN y NaClO sobre la microflora natural de los alimentos en fresco	59
VII.2.1 Propiedades fisicoquímicas de las soluciones desinfectantes	59
VII.3 Reducción de la microflora natural de los productos frescos	61
VII.3.1 Efecto del NaClO	61
VII.3.2 Efecto del AEN	67
VII.4 Adhesión microbiana	84
VII.4.1 Adhesión de <i>L. monocytogenes</i> EGDe y <i>L. monocytogenes</i> Scott A así como <i>Salmonella Saintpaul</i> , <i>Salmonella</i>	

<i>Oraniemburg</i> y <i>Salmonella</i> E1 en la superficie de tomate y aguacate	85
VII.5 Efecto del AEN e hipoclorito de sodio sobre <i>L. monocytogenes</i> y <i>Salmonella spp.</i>	92
VII.5.1 Células libres	92
VII.6 Efecto antimicrobiano del AEN y NaClO en la población adherida de <i>Salmonella spp</i> y <i>L. monocytogenes</i> en la superficie de tomates y aguacate.	101
VIII. CONCLUSIONES	118
VIII. ANEXOS	120
IX. BIBLIOGRAFIA.....	125
X. ABREVIATURAS	138

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificación de hortalizas producidas en México	7
2. Producción Nacional de tomate.	10
3. Principales municipios productores de espárrago en el estado de Querétaro	11
4. Producción de aguacate variedad Hass en el Estado de Querétaro	13
5. Fuentes de contaminación de microorganismos en frutas y hortalizas frescas en la pre-cosecha	15
6. Propiedades fisicoquímicas de las soluciones desinfectantes usadas para la desinfección de tomate, aguacate y espárrago.	60
7. Análisis de varianza de la reducción de la microflora de HyL en productos frescos a temperatura ambiente (23±2°C).	73
8. Factores involucrados que afectan la reducción de la microflora de HyL en productos frescos a temperatura ambiente (23±2°C).	73
9. Análisis de varianza de la reducción de la microflora de BMA en productos frescos a temperatura ambiente (23±2°C).	75
10. Factores que involucrados en la reducción de la microflora de BMA en productos frescos a temperatura ambiente (23±2°C).	76
11. Análisis de varianza de la reducción de la microflora de CT en productos frescos a temperatura ambiente (23±2°C).	77
12. Interacciones de los factores involucrados en la reducción de la microflora de la reducción de la microflora deCT en productos frescos a temperatura ambiente (23±2°C).	77
13. Diseño factorial fraccionado (1/3) 3 ³ para lograr una mayor adhesión microbiana de <i>L. monocytogenes</i> en la superficie del tomate.	86
14. Análisis de varianza de los factores involucrados en la adherencia de <i>L.monocytogenes</i> en la superficie de tomate a temperatura ambiente (23±2°C).	87

15. Factores involucrados en la adherencia de <i>L.monocytogenes</i> en la superficie de tomate a temperatura ambiente (23±2°C).....	87
16. Condiciones sugeridas para adhesión microbiana.	87
17. Diseño factorial fraccionado (1/3) 3 ³ para lograr una mayor adhesión microbiana de <i>Salmonella spp.</i> en la superficie del tomate.....	88
18. Análisis de varianza de los factores involucrados en la adherencia de <i>Salmonella spp</i> en la superficie de tomate a temperatura ambiente (23±2°C).....	89
19. Factores involucrados en la adherencia de <i>Salmonella spp</i> en la superficie de tomate a temperatura ambiente (23±2°C).....	89
20. Adhesión microbiana de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Salmonella spp.</i> en la superficie del aguacate.....	90
21. Células sobrevivientes de <i>Listeria spp.</i> después de tratamientos con AEN y NaClO a varias concentraciones y tiempos de contacto.	94
22. Células sobrevivientes de <i>Salmonella spp.</i> después de tratamientos con AEN y NaClO a varias concentraciones y tiempos de contacto	95
23. Concentración bactericida de AEN y NaClO en células en estado libre de <i>Listeria spp.</i> y <i>Salmonella spp.</i>	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Exportaciones agroalimentarias por grandes grupos	6
2. Principales productores de tomate en México	9
3. Mecanismos por el cual, las frutas y hortalizas pueden contaminarse por microorganismos patógenos	14
4. Factores a los que se asocian los brotes de enfermedades por consumo de frutas y hortalizas	17
5. Porcentaje de brotes y enfermedades atribuidos a frutas y hortalizas.....	27
6. Celda electrolítica compuesta por dos electrodos en la que se produce agua electrolizada.....	36
7. Número de ciclos logarítmicos reducidos por la solución desinfectante de NaClO en la cuenta inicial HyL, BMA y CT	64
8. Efecto de los tratamientos de desinfección en un tiempo de exposición de 1 min en la inactivación de la microflora HyL, BMA y CT presente en la superficie de alimentos en fresco.....	69
9. Efecto de los tratamientos de desinfección en un tiempo de exposición de 3 min en la inactivación de la microflora HyL, BMA y CT presente en la superficie de alimentos en fresco.....	70
10. Efecto de los tratamientos de desinfección en un tiempo de exposición de 5 min en la inactivación de la microflora HyL, BMA y CT presente en la superficie de alimentos en fresco.....	72
11. Número de ciclos logarítmicos reducidos en la cuenta inicial de HyL en tiempos de contacto de a) 1 min, b) 3 min y c) 5 min.....	74
12. Número de ciclos logarítmicos reducidos en la cuenta inicial de BMA en tiempos de contacto de a) 1 min, b) 3 min y c) 5 min	76
13. Número de ciclos logarítmicos reducidos en la cuenta inicial de CT en tiempos de contacto d a) 1 min, b) 3 min y c) 5 min.	78

14. Número de ciclos logarítmicos reducidos en la cuenta inicial de HyL y BMA en aguacate, espárrago y tomate con tratamientos de AEN (200 ppm) y NaClO (120 ppm) con tiempos de contacto de 1 min.....	79
15. Número de ciclos logarítmicos reducidos en la cuenta inicial de <i>Listeria monocytogenes</i> adherida a la superficie del tomate con tratamientos de AEN y NaClO (200 ppm) con tiempos de contacto de 1 min	102
16. Número de ciclos logarítmicos reducidos en la cuenta inicial de <i>Salmonella</i> spp. adherida a la superficie del tomate con tratamientos de AEN y NaClO (200 ppm) con tiempos de contacto de 1 min	103
17. Número de ciclos logarítmicos reducidos en la cuenta inicial de <i>L. monocytogenes</i> adherido a la superficie del aguacate con tratamientos de AEN y NaClO (200 ppm) con tiempos de contacto de 1 min	104
18. Número de ciclos logarítmicos reducidos en la cuenta inicial de <i>Salmonella</i> spp adherida a la superficie del aguacate con tratamientos de AEN y NaClO (200 ppm) con tiempos de contacto de 1 min	105
19. Efecto de los tratamientos de desinfección con control (agua destilada: 0 ppm), AEN, y NaClO (200 ppm) en una población adherida de <i>L. monocytogenes</i> en la superficie del tomate durante el almacenamiento en refrigeración (4°C) por 21 días.	114
20. Efecto de los tratamientos de desinfección con control (agua destilada: 0 ppm, AEN, y NaClO (200 ppm) en una población adherida de <i>Salmonella</i> spp. en la superficie del tomate durante el almacenamiento en refrigeración (4°C) por 21 días..	115

I. INTRODUCCIÓN.

Las frutas y hortalizas son parte esencial de la dieta de las personas y son fuente importante de vitaminas, minerales, fibra y ricos en compuestos fenólicos, antioxidantes. De acuerdo con la Organización Mundial de la salud, en el 2003, se recomienda el consumo de 400 g por día y la Comisión del Codex Alimentarius, en el 2010, introdujo la campaña “cinco al día” en el que se promueve el consumo de al menos, 5 porciones de frutas y hortalizas cada día (Goodburn y Wallace, 2012).

Inevitablemente, con el crecimiento de la demanda de frutas y hortalizas, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) ha reportado un incremento en los brotes relacionados con el consumo de estos productos. Los microorganismos patógenos comúnmente asociados a frutas y hortalizas son *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. El uso de agentes desinfectantes como el hipoclorito de sodio (NaClO) son usados en la industria de alimentos, sin embargo, la producción de trihalometanos, subproductos reconocidos como carcinógenos, que se producen cuando el cloro reacciona con materia orgánica, hace urgente el desarrollo de nuevos tratamientos de desinfección que sean más efectivos, menos tóxicos y que permitan inactivar los microorganismos patógenos al mismo tiempo que reduzca el costo del uso de agua y disminuya el riesgo en la salud en los trabajadores (Riazi y Matthews, 2011).

El agua electrolizada surge como una nueva alternativa en la desinfección de frutas y hortalizas y se ha estudiado como agente desinfectante, estas soluciones que son generadas por electrólisis de una solución diluida de cloruro de sodio (NaCl), tiene un fuerte poder bactericida contra la mayoría de los microorganismos patógenos de importancia en la industria de alimentos (Mukhopadhyay y Ramaswamy, 2012).

El estudio de la desinfección de frutas y hortalizas frescas se hace cada vez más extenso y complejo, puesto que se conoce que existen varios factores que

afectan la efectividad de los sanitizantes y es fundamental considerar que la contaminación de estos productos con microorganismos patógenos es perjudicial en términos del número de personas que son afectadas y del costo económico que causan, debido a estas razones es de vital importancia mejorar las condiciones de un sistema contaminado a través de tratamientos no térmicos que permitan reducir la carga microbiana y la inactivación de microorganismos patógenos (Sapers *et al.*, 2006)

II. REVISIÓN DE LITERARIA.

II. 1 Frutas y Hortalizas.

Las frutas y hortalizas son parte esencial de la dieta de las personas y son fuente importante de vitaminas, minerales, fibra y ricos en compuestos fenólicos, antioxidantes. La composición de las frutas y hortalizas consta de 88% agua, 8.6% carbohidratos, 1.9% proteínas, 0.3% de grasa y 0.84% de cenizas. Una dieta rica en frutas y hortalizas ha demostrado que protege contra enfermedades cardiovasculares y enfermedades crónicas como el cáncer, obesidad y diabetes (Olaimat *et al.*, 2012).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, en el 2003, se recomienda el consumo de 400g por día y la Comisión del Codex Alimentarius, en el 2010, introdujo la campaña “cinco al día” en el que se promueve el consumo de al menos, 5 porciones de frutas y hortalizas cada día (Goodburn y Wallace, 2012). Globalmente, el consumo de frutas y hortalizas ha incrementado aproximadamente 4.5% entre los años de 1990 y 2004 por varias razones; una de las cuales, son los beneficios para la salud asociados con su consumo, que ha llevado a cambios alimenticios de los consumidores que están más conscientes e interesados en los beneficios a la salud y comer de la manera correcta y equilibrada, con menor proporción de carbohidratos, grasas y aceites y con una mayor participación de la fibra, vitaminas y minerales (Codex Alimentarius, 2007, Srey *et al.*, 2013).

Las frutas son definidas como “fruto, semilla o partes carnosas de órganos florales que hayan alcanzado un grado de madurez y sean adecuadas al consumo humano”. Puede proceder de árboles pequeños y grandes, frutales y arbusto. Desde el punto de vista nutricional, las frutas aportan principalmente agua, vitaminas, minerales y fibra. Dentro de los macronutrientes, los hidratos de carbono son los componentes más abundantes, en particular azúcares, almidones, celulosas, hemicelulosas y sustancias pécticas. Así mismo, este grupo de alimentos es rico en fibra, especialmente de tipo solubles, lo que se asocia con el efecto de

saciedad, regulación de la motilidad gastrointestinal (efecto laxante), reducción de colesterol, modificación en la absorción de grasas y disminución en la incidencia de cáncer. Por otro lado, las hortalizas se definen como “cualquier planta herbácea que se puede utilizar como alimento, ya sea en crudo o cocinada. La parte comestible está constituida por sus órganos verdes (hojas, tallos o inflorescencia)”. Las hortalizas, en su composición, son ricas en fibra, vitaminas y minerales, pero con un contenido bajo de lípidos (menos del 1%) y proteínas (0.6-5%). El agua es el principal componente de las mismas, pues supone aproximadamente el 90% de su peso, seguida por los hidratos de carbono, mayormente polisacáridos. Este grupo de alimentos destaca por su aporte de vitamina C y carotenos, que les concede una alta capacidad antioxidante (Aranceta y Pérez-Rodrigo, 2006).

II.1.1 Producción Mundial.

El aumento de la población, las características de sus actividades y sus hábitos alimenticios, son algunos de los factores que han influenciado el mercado de frutas y hortalizas a nivel mundial. El mercado mundial de fruta fresca primaria, medido por las importaciones mundiales determinadas por el Centro de Comercio Internacional (CCI), registró un crecimiento de 34.6% en su valor en el período 2005-2009, incrementándose desde US\$ 51,686 millones a US\$ 69,562 millones. Por su parte, el mercado mundial de fruta fresca, incluida la fruta fresca mínimamente procesada (congelada, deshidratada y preservada), registró un crecimiento similar (37.2%), aumentando desde US\$ 55,132 a US\$ 75,673. Los principales países europeos importadores de frutas frescas, como Alemania, Holanda, Reino Unido, entre otros, fueron afectados por la crisis internacional del año 2009, por lo que su importación tuvo un leve aumento, mientras que países como China y Emiratos Árabes Unidos tuvieron importaciones altas, 129 y 108 %, respectivamente (FAO, 2011).

A nivel global, la producción de hortalizas en 2010 fue de mil 36 millones de toneladas, en las que destacan: tomate con 152 toneladas; sandías 99; cebollas

secas 78; coles y otros crucíferas 66; pepinos y pepinillos 62 toneladas. Se estima que la producción mundial de fruta tropical alcanzará 82 millones de toneladas en 2014, según las estimaciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Desde 1980 a 2005, la producción de hortalizas en el mundo, creció de 324 millones a 881 millones de toneladas, lo que representó una tasa de crecimiento anual de 4.1% anual. Este importante crecimiento, se debió principalmente al aumento de la producción en China, que creció a un ritmo del 8.6% anual, país que lidera la producción mundial de hortalizas. Las principales países comercializadores de hortalizas en los últimos años han sido: la Unión Europea, liderando regiones comerciales mundiales con una participación del 48% de exportaciones; los países miembros del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN) con el 20% de exportaciones; y el este de Asia con el 7% de exportaciones (FAO, 2012).

II.1.2 Producción en México.

México es de los principales productores de frutas del mundo y ocupa el primer lugar en exportación de aguacate, sandía, limón y papaya, siendo su principal mercado Estados Unidos. De acuerdo con la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), de 1994 a 2010 las exportaciones de frutas crecieron 11.3% en promedio anual. De los 17.2 millones de toneladas de producción de frutas que se obtuvieron en 2010, 2.6 millones se destinaron al mercado de exportación de fruta en fresco, con un valor superior a los 2,567 millones de dólares. Los productos agrícolas mexicanos están bien catalogados en el mundo, por sus altos niveles de diversidad, sanidad e inocuidad, situación que permite a los productores nacionales realizar exportaciones a 43 países del mundo con los que se tienen acuerdos comerciales, principalmente países europeos y asiáticos que cuentan con los más rigurosos estándares de calidad (SAGARPA, 2012).

México se encuentra entre los principales productores y exportadores de hortalizas en el mundo. En la Figura 1 se presentan las exportaciones agroalimentarias por grandes grupos. Se ubica en el cuarto lugar a nivel mundial y el primero en el continente. Otros exportadores de gran importancia son: Países Bajos, España, China, Francia, Bélgica y Canadá; los diez principales productores de hortalizas suman alrededor de 70% de la producción de hortalizas en el mundo.

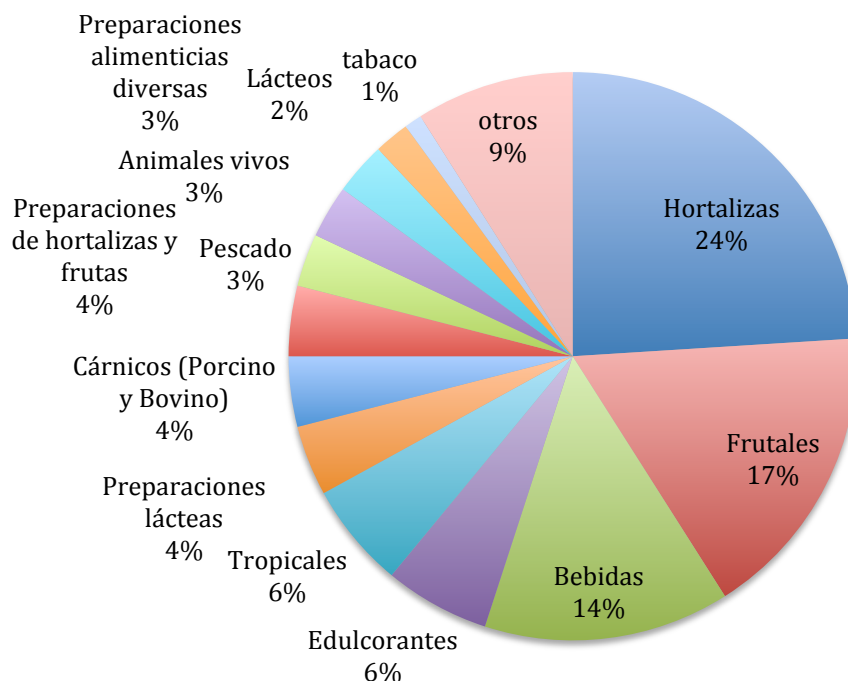


Figura 1. Exportaciones agroalimentarias por grandes grupos (SAGARPA, 2012).

Por su parte, México posee una riqueza de climas y ecosistemas que permiten la adecuada producción de hortalizas durante todo año, lo cual constituye una de las principales ventajas ante otros competidores potenciales. En el país se producen alrededor de 70 variedades de hortalizas que se clasifican en 7 grupos, entre los que destacan los presentados en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación de hortalizas producidas en México (SAGARPA, 2012).

Parte de la planta	Hortalizas
Semillas-granos	Chícharo, habas, arvejas, vainita, elote, ejote.
Frutos	Tomates, chiles en todas sus variedades, berenjena, pimientos, sandía, melón, chayote.
Bulbos	Ajo, cebolla, puerro, poro.
Coles	Repollo, coles de Bruselas.
Hojas	Espinaca, lechuga, nabo.
Tallos tiernos	Endibia, espárrago, apio, etc.
Pepónidas	Calabacín, calabaza, pepino, chilacayote.
Raíces	Zanahoria, rábano, remolacha, betabel, papas.
Flores comestibles	Alcachofa, flor de calabaza, brócoli, coliflor

Entre 2006 y 2010, el volumen de producción de las hortalizas creció 8.6% en el país. Este sector productivo tiene un valor promedio anual de 38 mil millones de pesos. En 2011, el país registró una producción de 10.7 millones de toneladas de hortalizas, de las cuales 2.1 fueron de chile verde; 1.8, de tomate; 1.4, cebolla; 800 mil, nopalitos; 700 mil, elote; 600 mil, tomate verde y 3.3 millones de otros. México ocupa el segundo lugar en chile y maíz verde (elote para ensalada); cuarto en espárragos; sexto en coliflor; séptimo en calabazas; décimo en tomate y cebolla; 18 en zanahoria y 23 en ajo. En el ámbito geográfico la producción hortalizas está concentrada en la región del Bajío y noroeste del país. Se destaca Sinaloa con la producción de tomate rojo y chile verde, y Baja California Norte y Sur en la producción de tomate rojo (SAGARPA, 2012).

II.1.2.1 Tomate (*Lycopersicon esculentum*).

El tomate (*Lycopersicon esculentum*) es un fruto perteneciente a la familia de las Solanáceas, constituida por un tallo principal largo con ramificaciones y es un

fruto climatérico, donde el proceso de madurez, es un proceso gradual y hormonal pero continuo, caracterizado por un rápido aumento en la tasa de la respiración y el desprendimiento de etileno por la fruta. Cambios en la textura, reducción de firmeza, cambios de color, en sabor (generalmente volviéndose más dulces por la hidrólisis del almidón) y aroma acompañan a la madurez. En las frutas climatéricas, como el tomate, la velocidad de la respiración se eleva llegando a un máximo y luego declina hasta el comienzo del envejecimiento, mientras que en las frutas no climatéricas la tasa de respiración decrece gradualmente. El etileno tiene un papel de relevancia directa con el daño físico de frutas y hortalizas. Actualmente se sabe que el etileno se produce en todos los tejidos vegetales como una respuesta al estrés (FAO, 2006; UC Davis, 2012).

Los frutos climatéricos se les cosecha en un estado de madurez fisiológica pero que todavía presente un color verde (en el caso del tomate se cosecha en una etapa 2, donde el fruto es de color verde), de esta manera, se permite que los exportadores, mayoristas y minoristas controlen mejor la comercialización de estas frutas. Si las frutas climatéricas se cosechan cuando están maduras, pudieran ser demasiado blandas para soportar los rigores del empaclado y transporte, y llegar a su mercado de destino en una condición altamente deteriorada, con un porcentaje inaceptable del cargamento en condiciones que no permitiría su comercialización. Las frutas climatéricas pueden por lo tanto cosecharse verdes, empacarse y transportarse en este estado de “pre madurez”, cuando son ligeramente más duras y más capaces de soportar los rigores del transporte (López-Camelo, 2003).

Los requisitos mínimos de calidad que debe reunir el tomate son: estar entero, sano (sin lesiones físicas, plagas ni enfermedades), libre de daños físicos, mecánicos, fisiológicos o fitopatológicos, limpio (sin materiales extraños), con un color típico de la especie y variedad, de aspecto fresco, textura suave, exentos de olores y sabores extraños y no deben exceder los límites máximos de plaguicidas permitidos internacionalmente (FAO, 2006).

El tomate es una especie de gran importancia económica a nivel mundial. En la actualidad, se ha convertido en una de las hortalizas más populares y cultivadas en todo el mundo, siendo la base de una importante industria agraria. Sus frutos, además de consumirse frescos, se procesan para la obtención de salsas, sopas, purés, zumos, concentrados, conservas.

En México, el tomate es el producto hortícola de mayor exportación, y Sinaloa es el principal productor, con más del 31% de la producción total nacional y más de 200 000 productores, registró un aumento (283.7%) en la producción de tomate, al pasar de 240,734 toneladas registradas durante el 2011, a 923,704 toneladas en el 2012 (Figura 2).

Cadereyta, Colón, Peñamiller y Pedro Escobedo son los principales municipios productores de tomate en Querétaro. La producción del tomate en invernadero ha permitido que el estado de Querétaro se ubique entre los principales productores de tomate en invernadero debido a su calidad y cantidad a nivel nacional e internacional. La producción del tomate se encuentra por encima del promedio nacional, con 214 toneladas por hectárea, compitiendo con países como Canadá, Holanda e Israel. Querétaro exporta a países del norte las hortalizas (como los espárragos), además del brócoli, y envía al extranjero 80% de la producción local (SIAP-SAGARPA, 2012).

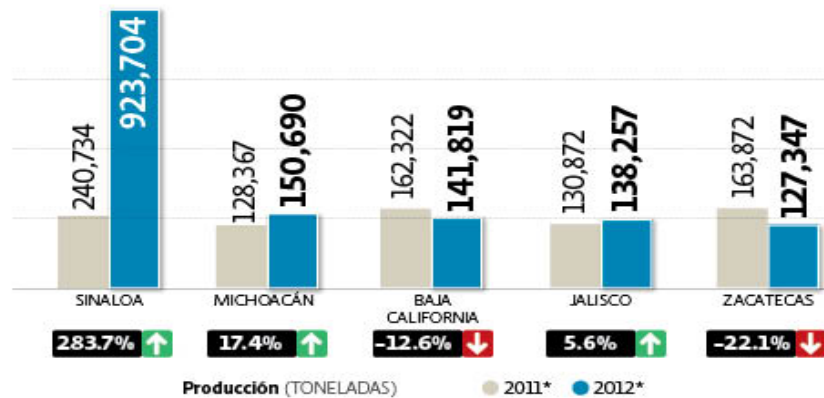


Figura 2. Principales productores de tomate en México (SIAP-SAGARPA, 2012)

Querétaro se ubica en el lugar 19, con un promedio anual de 24 mil 622 toneladas de tomate producido, y en el lugar número 27 en hectáreas sembradas de tomate, apenas abarcando 152 de las 246 hectáreas de superficie sembrada del estado. Con respecto al rendimiento en la producción del tomate, Querétaro ocupa el primer lugar a nivel nacional, a pesar de ser una entidad pequeña, y en promedio el rendimiento se traduce en la producción de 173 toneladas por hectárea, siendo Guanajuato el segundo lugar con una producción de 68 toneladas por hectárea (Cuadro 2).

Cuadro 2. Producción Nacional de tomate (SIAP-SAGARPA, JULIO 2013).

Lugar	Estado	Superficie sembrada (ha)			Producción (ton)	Rendimiento (ton/ha)
		sembrada	cosechada	siniestrada		
1	Sinaloa	12 177	11 879	215	485 635	40.882
2	Veracruz	1 497	1 486	8	37 048	24.927
3	Michoacán	1 308	1 129	138	29 309	25 960
19	Querétaro	44	44		12 666	287.866

II.2.1.2 Espárrago (*Asparagus officinalis*)

El espárrago (*Asparagus officinalis*) pertenece a la familia Asparagaceae. Es un producto natural de textura carnosa y firme, un aroma intenso con un sabor ligeramente dulce que requiere una mayor exposición a la luz solar para obtener un color verdoso. Es considerado un alimento gourmet por su consumo exclusivo y dietético. Su alto contenido de fibra facilita el proceso de la digestión. Las presentaciones en las cuales se comercializa son: fresco, procesado (conserva o congelado). El espárrago es un producto no climatérico en donde, la madurez comercial solamente se alcanza en la planta. Los productos no climatéricos carecen de la capacidad de continuar su maduración luego de ser separados de la planta, por lo cual se debe asegurar que hayan alcanzado un estado apropiado para su consumo al momento de la cosecha. Los frutos cítricos son ejemplos típicos de

frutos no climatéricos y en ellos el etileno no regula la maduración, es decir, no maduran por acción del etileno. Sin embargo, el etileno es capaz de acelerar la degradación de las clorofilas, pigmentos responsables del color verde de los frutos (FAO, 2006).

En el 2011, se produjeron 9 244 toneladas de espárrago, y Baja California se ubica en el tercer sitio a nivel nacional, después de Sonora y Guanajuato. Baja California representó aproximadamente el 14 por ciento de la superficie sembrada de espárrago en el país. La mayor parte de la producción del espárrago es destinada a la exportación, siendo los principales mercados a los que se exporta Estados Unidos, Japón, Inglaterra, Italia y España.

En el año 2012, se reportó que los municipios productores de espárrago en el estado de Querétaro, fueron: Cadereyta, Querétaro y San Juan del Río (Cuadro 3). Con una superficie total sembrada de 800 hectáreas y una producción total de 2,861 toneladas con un valor total de 66, 799.80 miles de pesos

Cuadro 3. Principales municipios productores de espárrago en el estado de Querétaro (SIAP-SAGARPA, 2012).

Lugar	Municipio	Sup. Sembrada (ha)	Sup. Cosechada (ha)	Producción (ton)	Rendimiento (ton/ha)	Valor producción (miles de pesos)
1	Cadereyta	60	60	245	4.10	5 289
2	Querétaro	146	134	536	4	19 296
3	San Juan del Río	594	594	2 079	3.50	42 214

II.2.1.3 Aguacate (*Persea americana*)

El aguacate es una especie originaria de México, perteneciente a la familia de las lauráceas. Es un fruto climatérico, con un incremento en la tasa de respiración, que precede al ablandamiento y a la maduración de consumo. Por su

carácter climatérico, el aguacate presenta una elevada tasa de producción de etileno al inicio del proceso de maduración que se asocia con una pronta madurez del fruto, la que puede ser alcanzada de 5 a 7 días. El fruto de aguacate presenta una gran actividad metabólica y una marcada sensibilidad al daño por frío una vez que es removido del árbol. Los frutos de aguacate se cosechan en un estado firme, e inicia su proceso de maduración experimentando diversos cambios fisiológicos, expresados en pérdida de agua, de firmeza y cambios en el color hasta alcanzar en pocos días su estado óptimo de consumo (Woolf *et al.*, 2003).

México es el principal productor de aguacate, superando el millón de toneladas anuales, seguido por Chile y República Dominicana. América concentra el 60% de las plantaciones mundiales y exporta a 21 países, principalmente Estados Unidos, Japón, Canadá, América Central y Europa. En México, el aguacate se cultiva en 25 estados del país, siendo Michoacán el principal productor. El 95% de la producción nacional se concentra en los estados de Michoacán, Jalisco, Nayarit, Edo. de México y Morelos. Durante el ciclo 2012-2013 las exportaciones de aguacate mexicano se incrementaron en más de 33 por ciento, en relación al ciclo anterior, al pasar de 464 mil a 643 mil toneladas, lo que representó divisas superiores a los mil 200 millones de dólares. En el estado de Querétaro, el municipio de Cadereyta tuvo una superficie sembrada de 31 hectáreas y una producción de 87 toneladas de aguacate, por otro lado, el municipio de Querétaro, tuvo una superficie sembrada de 4 Has y una producción de 2.4 toneladas (Cuadro 4). En general, el estado de Querétaro tuvo una producción total de 89.40 toneladas con un valor de producción de 563.80 miles de pesos (SIAP-SAGARPA, 2012).

Cuadro 4. Producción de Aguacate variedad Hass en el estado de Querétaro (SIAP-SAGARPA, 2012).

Lugar	Municipio	Sup. Sembrada (ha)	Sup. Cosechada (ha)	Producción (ton)	Rendimiento (ton/ha)	Valor producción (miles de pesos)
1	Cadereyta	31	29	87	3	559
2	Querétaro	4	2	2.4	1.2	4.8

II.2 Problemática de frutas y hortalizas frescas.

Un incremento gradual en la población y en los cambios de estilo de vida y dieta, así como los cambios en las prácticas agronómicas, cosecha, distribución, producción y consumo, han incrementado los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA'S) asociadas al consumo de frutas y hortalizas (Hung *et al.*, 2010). En el 2008, la FAO y WHO identificaron a las frutas y hortalizas como un grupo de alimentos de mayor preocupación en seguridad microbiológica (Issa-Zacharia *et al.*, 2011).

Aunque las frutas y hortalizas son parte importante de la dieta de las personas, y son percibidos como productos frescos, saludables y fáciles de preparar, su composición provee suficientes nutrientes y condiciones que hacen que sean ideales para el desarrollo de microorganismos deterioradores y patógenos, por lo que son asociados con infecciones microbianas. Las frutas y hortalizas pueden contaminarse en cualquier etapa del procesamiento, cosecha, distribución hasta el consumo del mismo y debido a que se consumen de manera cruda y sin ningún tratamiento que garantice su inocuidad por lo que representan un riesgo (Ongeng *et al.*, 2006; Abadías *et al.*, 2008; Pangloli y Hung, 2013; Srey *et al.*, 2013).

II.2.1 Factores de contaminación

Los riesgos en alimentos pueden reconocerse como microbiológicos, químicos y físicos. Sin embargo, la seguridad microbiológica es el aspecto de mayor importancia en la industria de frutas y hortalizas mínimamente procesadas. Varios factores se encuentran relacionados en la contaminación de los alimentos y estos pueden dividirse en dos categorías (Figura 3).

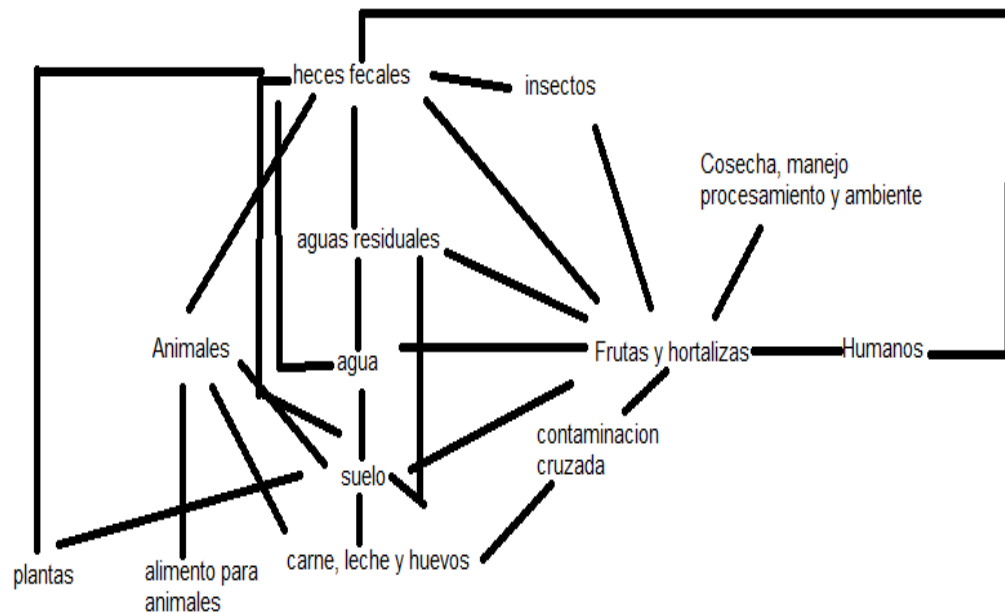


Figura 3. Mecanismos por el cual, las frutas y hortalizas pueden contaminarse por microorganismos patógenos (Lamikanra, 2002).

II.2.1.1 Factores pre-cosecha

Una categoría involucra los factores o condiciones que contaminan las frutas y hortalizas con microorganismos patógenos antes o durante el cultivo o en la cosecha de éstos. Los microorganismos pueden llegar al interior de la planta durante el crecimiento, desde la contaminación de la semilla o tubérculo. Las semillas son fuentes de microorganismo patógenos como *Bacillus cereus* y *Salmonella* así como de bacterias y hongos que causan enfermedades post-

cosecha. La mayoría de la contaminación ocurre en el exterior o en la superficie de la plantas, o en algunos casos puede ocurrir cuando el tejido interno es invadido en etapas tempranas del desarrollo. Las principales especies microbianas presentes en las frutas y hortalizas también están presentes en el suelo, agua de irrigación y en general, en el ambiente de la granja donde se cultivan (Cuadro 5). Estos incluyen las prácticas agronómicas, uso de aguas residuales o contaminadas para la irrigación de los alimentos, uso de estiércol como fertilizantes y falta de capacitación entre los trabajadores (malas prácticas sanitarias y de manejo del producto) e higiene entre el personal (Beuchat, 1998; Lamikanra, 2002)

Cuadro 5. Fuentes de contaminación de microorganismos en frutas y hortalizas frescas en la pre-cosecha (Lamikanra, 2002).

Fuente de contaminación	Producto en fresco	Microflora
Animales, estiércol	Vegetales	Esporulados, <i>Salmonella</i> , <i>E.coli</i> O157:H7
Malas prácticas de higiene de trabajadores	Frutas rebanadas	<i>Vibrio cholerae</i>
Agua de irrigación	Tomates	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Vibrio cholerae</i>
Suelo, materia orgánica y transporte	Vegetales	<i>Clostridium perfringens</i>

Suelo: es el ambiente natural de una variedad de microorganismos patógenos incluyendo *B. cereus*, *C. botulinum*, *C. perfringens* y *L. monocytogenes* (Olaimat, 2012). Se ha reportado que el periodo máxima se sobrevivencia en suelo de *E.coli* O157:H7 y *Salmonella* es de 7 a 25 semanas dependiendo del tipo del suelo, humedad, temperatura y fuente de contaminación (Erickson *et al.*, 2010).

Las condiciones de crecimiento en la locación son los factores de mayor importancia que afectan la seguridad microbiológica del producto. Los suelos que contienen estiércol como fertilizante son los contaminantes de patógenos entéricos debido a su habilidad de sobrevivir en el suelo por meses e incluso años. La materia fecal suele contener entre 10^2 y 10^5 UFC/g de *E. coli* y 10^2 y 10^7 UFC/g de

Salmonella spp. El estiércol de los rumiantes (ganado, ovejas) es considerada la fuente principal de *Salmonella* y *E.coli* O157:H7 (Warriner *et al.*, 2009).

Animales: para la mayoría de los patógenos transmisibles por estos productos, la fuente de contaminación más frecuente es la materia fecal humana y de animales. Como fuente de contaminación animal de las frutas y hortalizas se incluye la materia fecal de animales domésticos, de crianza, silvestres e insectos. Patógenos, incluyendo *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Escherichia coli* pueden ser transmitidos a las frutas y hortalizas por el uso de agua contaminada, y materia fecal de animales que son usados como abono (Lamikanra, 2002).

Contaminación humana: los trabajadores también pueden tener un papel decisivo en la contaminación de las frutas y hortalizas desde el cultivo del mismo, la cosecha y todas aquellas etapas posteriores hasta su preparación en las cocinas y fábricas procesadoras. En el año 2004, se realizó un estudio para analizar las fuentes de contaminación y se clasificaron como factores de contaminación por “post-producción” en la que se incluyen manejo inapropiado en los servicios de alimento y factores de “productor” que fueron atribuidas por empaquetado, distribución y otras operaciones post-cosecha (Sapers *et al.*, 2006). El 83% de las enfermedades asociadas al consumo de frutas y hortalizas fueron atribuidas al factor de productor y el 17% de los casos se asocian a las operaciones post-cosecha (Figura 4).

Agua: la calidad del agua de irrigación y el tipo de sistema de irrigación son factores que influyen en la seguridad microbiológica de las frutas y hortalizas. El riego por inundación y la irrigación por atomizado representan el mayor riesgo debido a que el agua contaminada puede depositarse directamente en las hojas del producto. El alto costo y la falta de disponibilidad de agua potable, puede conducir a que en algunas regiones se haga uso de agua no potable (aguas negras o residuales) para la irrigación de frutas y hortalizas. En el 2011, Gemmell y Schmidt estudiaron la calidad microbiológica del agua usada de un río para la irrigación de

frutas y hortalizas en África, encontrando que el número total de coliformes y *E. coli* alcanzaban los 6 Log y 5.5 NMP/100ml, respectivamente.

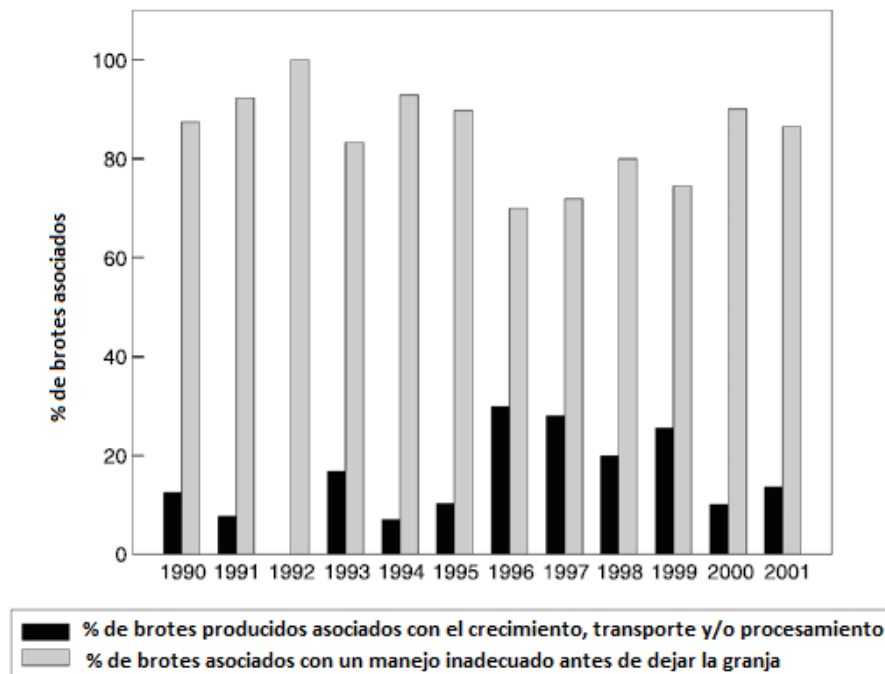


Figura 4. Factores a los que se asocian los brotes de enfermedades por consumo de frutas y hortalizas (Sapers *et al.*, 2006).

II.2.1.2 Factores post-cosecha.

La segunda categoría del riesgo microbiológico son las operaciones de cortado y rebanado en la planta, pues durante la cosecha y el procesado de los alimentos influyen la seguridad microbiológica de las frutas y hortalizas. Estas actividades que incluyen el contacto humano y mecánico, inmersión y el cortado y rebanado, no solo tienen el potencial de contaminar el producto con microorganismos patógenos, sino también incrementar el crecimiento de microorganismos. La higiene del personal es considerada un factor muy importante que influye la transferencia de microorganismos, debido a que los trabajadores infectados son considerados la fuente principal de virus y bacterias patógenas causantes de enfermedades (Berger *et al.*, 2010).

Agua de enfriamiento: toda el agua que entra en contacto con el producto para blanqueado, lavado, hidrogenado, debe tener una calidad microbiológica lo suficientemente aceptable para prevenir la contaminación. El agua que recircula en el proceso, deberá tener cantidades suficientes del agente desinfectante para prevenir la contaminación cruzada.

Temperaturas de transporte: las frutas y hortalizas procesadas son transportadas en vehículos con sistema de control de temperatura, de esta manera, se mantiene los productos que son susceptibles a una temperatura apropiada hacia su destino, lo que permitirá que la vida de almacén se alargue más. Las frutas y hortalizas deben mantenerse a una temperatura por debajo de los 5°C, la tasa de crecimiento de los microorganismos se ve reducida incluyendo los patógenos humanos. Sin embargo, condiciones de bajas temperaturas y una alta humedad relativa pueden actuar en favor de la viabilidad de algunos microorganismos patógenos como las partículas virales (Sapers *et al.*, 2006)

Irregularidades de la superficie: lavar las frutas y hortalizas con agua remueve algunos microorganismos, pero algunos quedan atrapados en huecos entre la unión de las células de la epidermis y los pliegues, estos tienen la característica de ser hidrofóbicas debido a la cera que se encuentra presente en la superficie, y sirven de escondites que no permiten el acceso a las soluciones acuosas, por lo que los microorganismos no se ven afectados (Gómez-López *et al.*, 2008).

Heridas: los tejidos internos del producto fresco son virtualmente estériles y normalmente se encuentran protegidos de los microorganismos por una piel externa y cáscaras recubiertas de cera. Sin embargo, el procesamiento de frutas y hortalizas como el cortado o rebanado destruye la estructura del alimento o la barrera física, permitiendo la liberación de los nutrientes, de esa manera, la producción de etileno, la actividad respiratoria, el oscurecimiento enzimático y no

enzimático se ve acelerada, pero sobre todo, se estimula el crecimiento de microorganismos, incluyendo los patógenos. La calidad de las frutas y hortalizas se ve afectada y también la vida de almacenamiento (Sapers *et al.*, 2006., Artés *et al.*, 2009., Graca *et al.*, 2011).

La exposición de áreas con heridas debidas al proceso de cortado y rebanado, incrementa el área de la superficie para la adhesión microbiana, lo que a su vez incrementa la posibilidad de sobrevivencia de los microorganismos. Estas heridas presentes en la superficie del alimento introducen material orgánico en el agua de lavado y disminuye la eficacia de los sanitizantes (Gómez-López *et al.*, 2008).

Internalización: los microorganismos embebidos en el tejido de las plantas es definido como “internalización”, derivado de interno, indicando que los microorganismos se encuentran localizados en el interior de la superficie de la planta. Los microorganismos que se encuentran internalizados no pueden ser removidos por lavado, debido a que están protegidos del estrés ambiental y no pueden ser inactivados por contacto con agentes desinfectantes. En el interior de la planta, la mayoría de los microorganismos (epifíticos y endofíticos) se encuentran localizados en espacios entre las células llamados espacios intercelulares, donde infectan la célula hospedera sin causar daño aparente (Gómez-López *et al.*, 2008).

La internalización puede presentarse de manera natural o pasiva antes de la cosecha o puede presentarse durante el procesamiento de las frutas y hortalizas de manera activa. Durante el proceso activo, los microorganismos crecen en la superficie del fruto o vegetal e ingresan al interior del alimento a través de estomas o heridas. La internalización pasiva implica el transporte del microorganismo al interior debido al contacto con algún objeto que infrinja una herida o por la penetración a través de aperturas debido a un diferencial de temperatura negativo.

La internalización de los microorganismos ocurre durante el empacado y el procesamiento de los alimentos. Cuando una fruta u hortaliza se encuentra con una

temperatura superior a la normal, por lo que el espacio interno se llena de aire, y cuando este producto es colocado en agua fría, el gas interno se enfría y se contrae generando un vacío parcial que permite que el agua y cualquier microorganismo pueden transportarse en el interno del producto a través de los poros, canales o punciones en el alimento (Sapers, 2001, Sapers *et al.*, 2006, Gil *et al.*, 2009).

Por otro lado, las biopelículas son una fuente frecuente de enfermedades. Aproximadamente el 80% de las infecciones persistentes bacterianas en los Estados Unidos, se encuentran asociadas a biopelículas. Existen varios mecanismos por el cual ocurre una interacción inicial para que se dé lugar de manera exitosa la colonización del alimento. Para que se lleve a cabo la adhesión microbiana depende de las propiedades fisicoquímicas de la superficie de la célula bacteriana, algunos microorganismos son capaces de adherirse a la superficie a través de pilis. Cualquier superficie es vulnerable al desarrollo de biopelículas, desde plástico, vidrio, metal, madera y superficie d alimentos. La adhesión a la superficie depende de las propiedades fisicoquímicas de la superficie como la textura (rugosa o suave), carga de la superficie, hidrofobicidad, pH, temperatura y la presencia de nutrientes en ésta. El segundo paso involucra la síntesis de fibrillas de celulosa o de exopolímero extracelular que mantiene unida a la bacteria al sitio de infección y funcionan como una barrera física responsable de que los agentes antimicrobianos no penetren al interior retardando la difusión de éstos. Otro factor que interviene en la adhesión, es la presencia de fimbrias y pillis que interaccionan con la membrana celular (Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, 2013, Srey *et al.*, 2013).

La habilidad de los microorganismos patógenos de adherirse a un producto en fresco, como las frutas y hortalizas, depende de factores intrínsecos y extrínsecos incluyendo la movilidad de los microorganismos, su interacción con otros microorganismos y su capacidad para absorber nutrientes de la planta. La movilidad es un factor importante que contribuye a la infiltración del patógeno permitiendo la entrada a través de heridas, estomas y otras entradas. Algunas

bacterias como *E. coli* O157:H7 posee mecanismos, como quimiotaxis, movilidad y quorum sensing (comunicación celular), que los dirige hacia estomas. Estudios han demostrado que la adhesión en las hojas de la lechuga y espinacas, *E. coli* enterotoxigénica usa flagelos y *E. coli* enteroagregativa usa fimbrias agregativas de adhesión, que comúnmente son usados para la adhesión de este microorganismo patógeno en la mucosa intestinal humana. En el caso de *Salmonella*, este puede utilizar flagelos que permite el desplazamiento en la superficie de los productos en fresco y contribuye a la colonización exitosa de regiones dañadas de la superficie. Las áreas más comunes en la planta donde hay agregación bacteriana son los tricomas, alrededor de estomas y a lo largo de las venas de las hojas, estas regiones tienen una alta mojabilidad que promueve la disponibilidad del agua y la absorción de nutrientes que sostiene el crecimiento microbiano. Algunos estudios encontraron que *E. coli* O157:H7 y *Salmonella entérica* crecen y el número incrementa a 7 Log UFC/g cuando hay 100% humedad. Otros estudios demuestran que vegetales intactos como la lechuga, tomates, endivias, zanahoria, col, espárrago, brócoli y coliflor promueven el desarrollo y crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Otro factor importante es el pH, en la mayoría de los vegetales este factor suele ser apropiado para el crecimiento de microorganismo patógeno. En adición, los tejidos dañados proporcionan protección de tratamientos poscosecha, lo que los hace más difícil de remover e inactivar (Olamait y Holley, 2012).

Algunas cepas de bacterias colonizan de mejor manera las superficies de los alimentos que otras, es decir, que depende del tipo de microorganismos. La formación de biopelículas, tejidos dañados, especie de planta, así como el estado de madurez de la planta y su tasa de maduración influyen la persistencia y la adhesión de los microorganismos a la superficie de las frutas y hortalizas (López-Gálvez, *et al.*, 2009, Goodburn y Wallace, 2013).

Algunos microorganismos viven como organismos comensales en las granjas y en animales de vida salvaje, estos representan la mayor fuente de contaminación de agua y producto agrícola para el consumo humano. Los

microorganismos asociados con patrones moleculares como flagelos y lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas interactúan con receptores específicos de células que funcionan como guardianes, células especializadas en la epidermis de las hojas, estomas y otros órganos que se encargan del intercambio de gases (oxígeno, dióxido de carbono y vapor de agua) y forman poros del estoma, que provocan la apertura de estomas. Los microorganismos usan heridas o aperturas naturales como estomas, hidátodos, y lenticelas como pasajes hacia el tejido interno donde crecen y comienza la enfermedad en las plantas y frutos. *Listeria monocytogenes* usa flagelos para la adhesión en los tejidos del rábano y en el caso de *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* se produce fimbrias que median la adhesión a la superficie del producto. La percepción de *quorum* o comunicación celular, regula muchos de las funciones asociadas a virulencia en las bacterias como los flagelos, movilidad y la producción de pilis que pueden estar presentes durante la interacción de la colonización de las bacterias con la superficie y participan colectivamente en la adherencia y colonización. Basado en algunas observaciones, se sugiere que *E.coli* O157:H7 es capaz de obtener nutrientes en el estoma, tejido interno y en los espacios intercelulares de las plantas y es capaz de replicarse y sobrevivir, protegiéndose de enemigos ambientales (Saldaña *et al.*, 2011). De acuerdo con Liu *et al.*, (2004), la adhesión se ve facilitada cuando la superficie celular y la superficie de apoyo son hidrofóbicas. De hecho cuando la superficie celular es hidrofóbica, no sólo pueden adherirse, las células pueden agregarse en forma de gránulos microbianos

II.3. Microorganismos de interés asociados a frutas y hortalizas frescas.

Anteriormente se mencionó que en el 2008, la FAO y WHO identificaron a las frutas y hortalizas como un grupo de alimentos de mayor preocupación en seguridad microbiológica debido a que son vehículos de microorganismos patógenos (Issa-Zacharia *et al.*, 2011).

En el 2003, Harris *et al.*, reportaron los microorganismos patógenos relacionados con enfermedades transmisibles por frutas y hortalizas. Estos microorganismos pueden ser categorizados como sigue:

- Microorganismos asociados al suelo: *L. monocytogenes*, *C.botulinum*.
- Microorganismos asociados a materia fecal: *Samonella* spp., *Shigella* spp., *E.coli* O157:H7.
- Parásitos patógenos: *Cryptosporidium*, *Cyclospora*.
- Virus patógenos: Hepatitis A, enterovirus, virus Norwalk.

Muchos de estos microorganismos patógenos pueden contaminar las frutas y hortalizas vía humana (o animal). El manejo de frutas y hortalizas por parte de trabajadores o consumidores infectados, contaminación cruzada, uso de agua contaminada, uso inadecuado de estiércol como fertilizante o el contacto con el suelo, puede ocurrir la contaminación de los alimentos (Bérmudez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, 2013).

II.3.1 *Salmonella* spp.

Salmonella es un bacilo Gram negativo, perteneciente a la familia de *Enterobacteriaceae*, es una bacteria parásita intestinal de los animales, incluido el hombre. Se libera al medio cuando es expulsada a través de la materia fecal y muestra capacidad de supervivencia en los materiales con los que entra en contacto y bajo condiciones favorables puede multiplicarse en ellos (Beuchat, 1998).

La mayoría de casos de salmonelosis se atribuyen al consumo de productos de aves, sin embargo, se ha incrementado el número de enfermedades asociados al consumo de frutas y hortalizas frescas, como tomates, melón, lechuga y mangos. Los brotes de *Salmonella* debido al consumo de estos alimentos, sugiere una contaminación previa a la producción, como en el campo en la planta procesadora. De manera natural, las frutas y hortalizas frescas pueden contaminarse con *Salmonella*, a partir del contacto directo o indirecto con materia fecal animal o

humana, las condiciones higiénicas en la producción, cosecha, transporte, distribución facilitan su contaminación y agua residuales. Se le puede detectar en cereales, frutas y hortalizas e incluso en especias y granos de cocoa, en ambos casos, se relacionan con brotes de salmonelosis. Las hortalizas de tierras que son regadas con aguas contaminadas, cercanas a animales, o abonadas con materia fecal de animales suelen estar contaminados con patógenos intestinales incluida a *Salmonella* (Riazi y Matthews, 2011).

Las frutas y hortalizas frescas son asociados a brotes de salmonelosis y se registraron tres brotes en 1992, 1993 y 2000, donde el vehículo del microorganismo fue el tomate y se aseguró que el microorganismo puede crecer en tomates dañados, picado y rebanado (Lamikanra, 2002).

La contaminación por *Salmonella* puede ocurrir por internalización o por adhesión en la superficie externa del tomate y la población bacteriana puede incrementarse con el tiempo, dependiendo de las condiciones ambientales. Y una vez contaminado, puede resultar difícil limpiar la superficie, debido a que la eficiencia de los agentes sanitizantes, como el cloro, dependen del lugar donde se encuentre *Salmonella*, ya que está sobrevive mejor en grietas de la piel que en superficies lisas. La internalización de los microorganismos dificulta los tratamientos sanitizantes debido a que los patógenos se encuentran físicamente protegidos de los agentes químicos (Hanning *et al.*, 2009).

II.3.2 *Listeria monocytogenes*.

El control de *L. monocytogenes* es un gran reto en la industria de alimentos procesados, especialmente en aquellas industria donde se producen productos listos para consumir. *L. monocytogenes* es un patógeno con la capacidad de adherirse y crecer en superficies frías y húmedas que son ideales para la formación de biopelículas como el acero inoxidable, plástico, superficies de policarbonato y otros materiales como superficies de alimentos. Comparado con otros patógenos,

L. monocytogenes es único en la resistencia que presenta a las condiciones adversas que normalmente impiden el crecimiento de otras bacterias (Tresse *et al.*, 2007). Por lo que el crecimiento de este microorganismo en alimentos reviste especial importancia por los aspectos ligados a la vida útil de los productos y a la salud del consumidor.

Puede reconocerse que *L. monocytogenes* es un patógeno oportunista y es el causante de provocar listeriosis en individuos entre los que se incluyen las personas de tercera edad, las mujeres embarazadas, los recién nacidos y las personas inmunocomprometidos como las que se encuentran enfermas de SIDA, (Gandhi y Chikindas, 2006; Fernández, 2008).

L. monocytogenes puede encontrarse en una gran variedad de alimentos procesados y crudos. Alimentos como la leche, productos lácteos, carnes como puerco, res, salchichas y productos frescos como los garbanzos, coliflor, pescado han sido asociados a la contaminación con *Listeria* (Gandhi y Chikindas, 2007). *L. monocytogenes* es un bacilo corto Gram positivo, aerobio y anaerobio facultativo no esporulado, de 1.2 x 0.5 μm , a veces clasificado de cocoide por mostrar diploformas; aunque también las células también aparecen asiladas. *L. monocytogenes* presenta un carácter halotolerante pues crece en medios con una concentración de 10% NaCl. Una cualidad predominante del microorganismo es su notable potencial psicrotrofo. Los límites de temperatura para el crecimiento son inusualmente amplios con un rango entre 2°C y 45°C, con óptima entre 30°C y 37°C (Gandhi y Chikindas, 2006; Fernández, 2008).

Este microorganismo entra a la cadena de procesamiento de las frutas y hortalizas desde la granja o debido al ambiente de procesamiento. Se encuentra presente en el tracto intestinal de los animales y humanos, y se encuentra ampliamente distribuido en el suelo y en agua residuales y puede diseminarse en las granjas por la materia fecal de los animales, si este microorganismo llega a contaminar el ambiente de procesamiento, puede llegar a colonizar las superficies

de los equipos, sobreviviendo en el suelo y paredes e incluso en hendiduras de los equipos formando biopelículas. Se encuentra ampliamente distribuido en frutas y hortalizas frescas, ha sido aislado en diferentes productos como en ensaladas, hojas de lechuga, pepino y frutas rebanadas, así como en tomate y melón. En 1981, una ensalada, siendo la col, el vehículo de *L. monocytogenes* fue asociado, causando un brote de listeriosis en Canadá. Sin embargo, la mayoría de los reportes de listeriosis son asociados al consumo de frutas y hortalizas frescas, como espárrago, brócoli, col y coliflor que son almacenados a 4°C (Lamikanra, 2002).

II.4 Enfermedades relacionadas con el consumo de frutas y hortalizas.

Las enfermedades transmitidas por alimentos es un tema muy importante a nivel mundial en términos del número de personas que son afectadas y del costo económico que causan. Los cambios en el consumo de alimentos o dieta de las personas, el incremento en la susceptibilidad de consumidores ha incrementado el número de brotes relacionado con el consumo de alimentos. El centro de prevención y control de enfermedades (CDC) reporta brotes ocasionados por microorganismos patógenos asociados a productos en fresco así como ensalada de frutas, frutas mixtas, fresas y moras. En el 2004, estos microorganismos patógenos causan 16 058 enfermedades, 598 hospitalizaciones y 8 muertes. Y las pérdidas económicas que causan las enfermedades están estimadas en 12.7 billones de dólares por año. Por otro lado, la CDC en el año de 2011 presenta una estimación más actual, en la que se reportan 48 millones de personas enfermas, 128 000 hospitalizaciones y 3000 muertes cada año (Pangloli y Hung, 2013), de las cuales 14.8% son asociados con frutas y hortalizas frescas, los alimentos procesados que incluyen ensaladas, frutas y hortalizas se relacionan con 345, 228 enfermedades. En la Figura 5 se muestra el porcentaje de enfermedades y brotes relacionados con el consumo de alimentos (Olaimat y Holley, 2012).

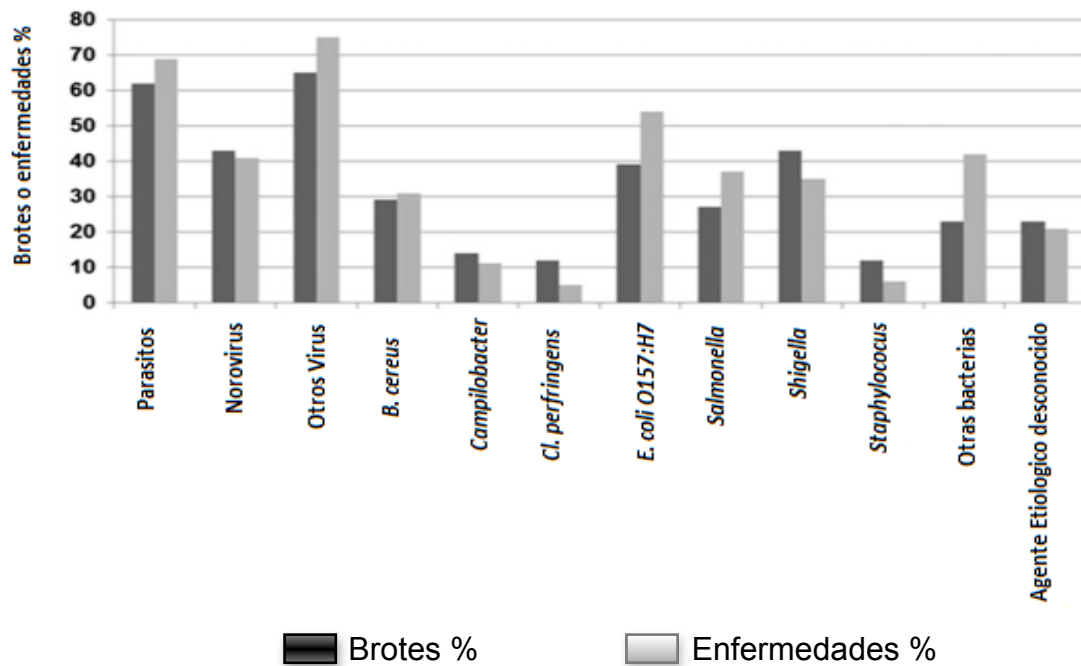


Figura 5. Porcentaje de brotes y enfermedades atribuidos a frutas y hortalizas (Olaimat y Holley, 2012).

II.5 Desinfección de frutas y hortalizas.

Uno de los mayores desafíos de la industria de los alimentos, es el control de la contaminación microbiana y satisfacer la demanda del consumidor al proporcionar productos de calidad (Issa-Zacharia *et al.*, 2010).

El proceso de desinfección se refiere a la destrucción física de los microorganismos cuya actividad compromete la inocuidad de los alimentos. La eficacia de este proceso depende de cuatro factores: los microorganismos (tipo y número), el sustrato sobre el cual se encuentran (presencia de materia orgánica), la estructura del material (que permita el acceso directo del germicida a los microorganismos) y el germicida (concentración, tiempo de contacto y temperatura). La susceptibilidad a un germicidas varía entre microorganismos; algunos pueden ser inactivados desde el primer contacto con el germicida y otros pueden sobrevivir y desarrollar resistencia a los germicidas (Fernández, 2008).

El principal paso para la descontaminación de las frutas y hortalizas es el lavado, considerado como un método directo e indispensable para remover suciedad que soporten el crecimiento de microorganismos, residuos de pesticidas y microorganismos deterioradores y patógenos de la superficie de los alimentos que comprometan la calidad e inocuidad del alimento, sin embargo, el lavado con agua reduce la carga microbiana en aproximadamente 1-2 Log UFC/g, debido a esta razón, el proceso de lavado incluye la aplicación de agua con productos desinfectantes bajo diferentes condiciones. El objetivo de la desinfección es destruir o disminuir sustancialmente el número de microorganismos deterioradores y patógenos sin afectar la calidad del producto y la seguridad del consumidor. Sin embargo, algunos microorganismos pueden transferirse los alimentos a través del agua de lavado y resistir a la acción de los agentes desinfectantes, causando contaminación cruzada. La localización de los microorganismos en la superficie de los alimentos afecta la su desinfección de los alimentos y la inactivación del microorganismo debido a que tienden a localizarse en poros, irregularidades y heridas. Es sabido que estos factores aumentan la posibilidad de los microorganismos para sobrevivir a la acción de los agentes desinfectantes, además de que las heridas introducen material orgánico que disminuye la efectividad de los antimicrobianos. La variedad de topografías de las superficies de los alimentos que proveen numerosos sitios de protección así como la formación de biopelículas que son difíciles de remover afectan la desinfección de los alimentos (Rahman *et al.*, 2010).

II.5.1 Hipoclorito de sodio (NaClO)

El uso de desinfectantes es importante para minimizar la propagación de los microorganismos. Algunos germicidas usados comúnmente en la industria alimenticia y que juegan un papel importante en el mantenimiento de la calidad y seguridad microbiológica del alimento, son el peróxido de hidrógeno, los

compuestos clorados, ácidos orgánicos y ozono (Chmielewski y Frank, 2003; Park *et al.*, 2008).

Los compuestos clorados son germicidas muy poderosos debido a su poder oxidante y a su poder desinfectante, ejercen efectos a través de diversos mecanismos que afectan procesos metabólicos vitales como la inhibición de enzimas que participan en el metabolismo, en la biosíntesis de proteínas y en el transporte activo a través de la membrana, lesiones en las cadenas de DNA y mutaciones. El hipoclorito comercial puede ser de sodio o calcio y ambos son germicidas con un amplio espectro y aunado a su bajo precio son los más utilizados en la industria alimentaria. No manchan, muestran baja toxicidad, pero son irritantes, corrosivos, con olor propio y pierden fuerza con la presencia de materia orgánica. La Administración de alimentos y medicamentos (FDA) permite su uso en frutas y hortalizas a concentraciones de 50-200 ppm con tiempos de contacto de 1-2 min. La forma activa es el ácido hipocloroso (HClO), molécula generada mediante el ión hipoclorito a pH ácido de 4 a 7 forma moléculas como cloraminas con las aminas que también son usados como agentes germicidas. Sin embargo, el uso de hipoclorito de sodio (NaClO) produce trihalometanos, subproductos reconocidos como carcinógenos, que se producen cuando el cloro reacciona con materia orgánica. Su uso a concentraciones por arriba de 200 ppm lleva a la pérdida de calidad del alimento y daño al ambiente (Keskinen y Annous, 2011)

El principal desinfectante que ha sido reconocido y que tiene una alta efectividad en la industria de alimentos es el hipoclorito de sodio (NaClO), Sin embargo, su efectividad se ve limitada, ya que es reducida por la presencia de materia orgánica presente en el agua y/o la exposición a la luz o aire por lo que es considerado un desinfectante inestable. Aunado a estos problemas, el uso de cloro ha sido asociado a la formación de compuestos carcinogénicos (cloroformo y ácidos haloacéticos) y a la aparición de microorganismos emergentes más resistentes a la acción letal de este desinfectante (Allende *et al.*, 2009; Koide *et al.*, 2009; Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas; 2013).

En el 2005, Virto *et al.*, realizaron un estudio cuyo objetivo fue investigar el daño subletal y la relación del daño en la membrana y la pérdida de la viabilidad en dos microorganismos Gram positivos (*Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*) y dos Gram negativos (*Escherichia coli*, y *Yersinia enterocolitica*) después de la exposición al NaClO en ausencia y presencia de materia orgánica o demanda de oxígeno. Los resultados en ausencia de materia orgánica, las Gram positivas demostraron una alta resistencia al NaClO (0.3-1.2 ppm) con tiempos de contacto de 2 min. La presencia de materia orgánica incremento de manera drástica la resistencia de los microorganismos al NaClO, pues las concentraciones tuvieron que aumentarse de 10-30 ppm. La resistencia se vio especialmente marcada en los microorganismos Gram negativos, y después de 2 min de contacto, comenzó la muerte celular a concentraciones mayores de 20 ppm. Los resultados obtenidos muestran que hay grandes diferencias en la resistencia al NaClO dependiendo del microorganismo estudiado y la composición del medio en el tratamiento, por ejemplo, en agua destilada, los microorganismos Gram negativos fueron más sensibles que las bacterias Gram positivas, pero en presencia de materia orgánica la resistencia al tratamiento aumenta. A través de esta investigación, se determinó el efecto protector de la materia orgánica, el efecto es atribuido a la demanda de cloro de compuestos orgánicos, que resulta en un decline rápido del cloro disponible. Se estableció que hay estructuras celulares estabilizadas en presencia de materia orgánica. Cuando los microorganismos presentan un daño acumulado, este pasa a un nivel crítico e irreparable.

El cloro es considerado, generalmente, como un oxidante no selectivo, que actúa ávidamente sobre diferentes componentes celulares y afecta procesos metabólicos. La membrana citoplasmática ha sido propuesta como un blanco clave involucrado en la inactivación bacteriana, dado a la permeabilidad ocasionada después de la cloración. Para investigar el daño a la membrana se estudió la fuga de sustancias intracelulares de las bacterias, a través de la absorbancia UV (260-280 nm) del material después del tratamiento con cloro. Los resultados mostraron que la

adición de pequeñas cantidades de materia orgánica al tratamiento previene de manera completa la absorbancia del material intracelular, sugiriendo que hubo una protección de la membrana celular de los microorganismos. Debido a que el tamaño molecular del RNA y de las proteínas y péptidos, principales moléculas detectadas por la medición de absorbancia UV. Los resultados obtenidos en esta investigación indican la posibilidad de que la membrana celular desempeña un papel importante en la inactivación de las células, dado que la presencia de la materia orgánica en el medio protegerá las membranas celulares contra la permeabilización y simultáneamente incrementará la concentración de cloro disponible para alcanzar la inactivación o muerte celular. Resultado de esta investigación sugieren que la presencia de materia orgánica puede estabilizar la envoltura y de esta manera disminuir la penetración del cloro hacia el interior de la célula. La envoltura de las bacterias Gram positivas consiste en una membrana citoplasmática rodeada de una pared delgada de peptidoglicanos, por otro lado, la envoltura de las Gram negativas posee una capa externa, la membrana externa, que provee una barrera extra contra los compuestos antimicrobianos.

Mahmoud *et al.*, en el 2012, realizaron un estudio similar al anterior y se demostró que la muerte celular depende de la penetración del cloro al interior de la célula. Así mismo, los autores tuvieron resultados similares a Virto *et al.*, (2005), concluyendo que la presencia de materia orgánica, estabiliza la membrana y dificulta la penetración del antimicrobiano al interior de la célula.

II.6.2 Otros desinfectantes.

El dióxido de cloro no reacciona con los compuestos de amonio o materia orgánica y muestra una mayor actividad oxidante y su poder germicida no es afectado por el pH, no reacciona con las aminas y fenoles y es menos corrosivo que los hipocloritos, pero su poder germicida se ve afectada por la temperatura Su uso está permitido por la FDA para la desinfección de equipos y alimentos a concentraciones que no excedan las 5 ppm.

El peróxido de hidrógeno y el ácido peracético son sanitizantes usados en la industria de alimentos, estos germicidas ejercen un poder bacteriostático o bactericida dependiendo de la concentración usada. Su efectividad depende de la temperatura, pH y la cepa del microorganismo. La acción de estos compuestos involucra la formación de compuestos oxigenados tóxicos como el radical OH^\cdot que daña a los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Sin embargo, su uso en frutas y hortalizas tiene efectos negativos en la coloración de la superficie, pues induce oscurecimiento (Rahman *et al.*, 2010).

En el caso del ácido peracético se ha encontrado que es efectivo contra las bacterias de la biopelícula. La actividad antimicrobiana de estos compuestos se extiende a la inactivación de esporas. Es un desinfectante que se descompone en ácido acético y peróxido de hidrógeno, residuos que son seguros para el medio ambiente, por lo que puede aplicarse en los alimentos (Chmielewski y Frank, 2003; Mukhopadhyay y Ramaswamy, 2012).

El ozono (O_3), es el agente oxidante más poderoso (potencial oxidante es 1.36 veces más poderoso que el cloro), y la FDA aprobó su uso como desinfectante directo en alimentos. Estudios demuestran que logra reducir la población de *S. Typhimurium* en 4.3 Log. Su acción germicida es a través de la descomposición de la molécula de ozono (O_3) a radicales y los microorganismos son erradicados al inducir ruptura en la membrana ocasionando la salida del contenido celular, ataca numerosos constituyentes celulares incluyendo proteínas, lípidos insaturados y enzimas respiratorias y ácidos nucleicos. La lisis celular es un mecanismo rápido de inactivación y es indispensable para inactivar a los microorganismos. Debido a este mecanismo, se especula que este agente desinfectante no induce resistencia. Sin embargo, es muy inestable y se descompone en O_2 rápidamente (20-30 min). El agua que contiene sustancias orgánicas e inorgánicas, que pueden ser oxidables y reaccionan rápidamente con el ozono (Mukhopadhyay y Ramaswamy, 2012; Srey *et al.*, 2013)

Los sanitizantes comúnmente usados presentan algunos riesgos e inconveniencias tienen una limitada capacidad para penetrar y dejan residuos químicos, causan decoloración del alimento, tienen un alto costo y efectividad limitada por lo que se hace urgente el desarrollo de nuevos tratamientos de desinfección que sean más efectivos, menos tóxicos y que permitan inactivar los microorganismos patógenos al mismo tiempo que reduzca el costo del uso de agua y disminuya el riesgo en la salud en los trabajadores y sobre todo que garanticen la seguridad microbiológica sin comprometer las características organolépticas del producto (Ongeng *et al.*, 2006; Riazi y Matthews, 2011).

II.5.3 Resistencia a antimicrobianos.

De acuerdo con Holah *et al.*, (2002), los microorganismos resistentes pueden ser descritos como especies o cepas que son capaces de sobrevivir programas de limpieza y desinfección en repetidas ocasiones en comparación con las especies o cepas que dominan la microflora ambiental. La resistencia se describe como un factor intrínseco (propiedad natural de un organismo o su modo de crecimiento) o adquirido, por mutación o la adquisición de plásmidos o transposones.

Para que una molécula del desinfectante alcanza el sitio específico, debe atravesar la membrana externa de las células. La naturaleza y la composición de esta capa dependen del tipo de microorganismo y puede actuar como una barrera permeable. Otra alternativa, pero menos común, es la síntesis de enzimas que pueden degradar el compuesto. La resistencia intrínseca (innata), es una propiedad natural, controlada cromosómicamente de la bacteria. Las bacterias Gram negativas tienden a ser más resistentes que los microorganismos Gram positivos. La pared celular de las bacterias Gram positivas está compuesta esencialmente de una capa de peptidoglicanos y ácido teicoico, que no actúan como una barrera efectiva contra la entrada de agentes desinfectantes y por ejemplo, en el caso de bacterias como *Staphylococcus* la membrana resulta ser permeable a sustancias

de alta peso molecular. En contraste, las bacterias Gram negativas son generalmente más resistentes que las bacterias Gram positivas debido a que la membrana actúa como una barrera que reduce la entrada de muchos agentes antibacteriales al citoplasma. Estas diferencias, se explica por la composición de la membrana (Oulé *et al.*, 2008).

Se resalta el hecho de que las bacterias Gram negativas poseen una membrana externa que actúa como una barrera que limita la entrada de los desinfectantes. La membrana externa de las bacterias Gram negativas desempeña un papel crucial al proveer una capa extra de protección al microorganismo, esto sin comprometer el intercambio de material genético requerido para sostenerse. Formada de una bicapa lipídica altamente hidrofóbica, compuesta de fosfolípidos y lipopolisacáridos, situada por encima de una capa delgada de peptidoglicanos. La bicapa lipídica consta de poros formados por proteínas con propiedades específicas de exclusión, por lo que la membrana externa actúa como una barrera selectiva. Entre la membrana externa y la membrana plasmática, se encuentra una matriz en forma de gel llamado periplasma encontrado en el espacio periplásmico. Las bacterias Gram negativas que muestran gran resistencia a los desinfectantes incluyen *P. aeruginosa*, que es naturalmente resistente a varios agentes antimicrobianos, antisépticos y antibióticos (Beveridge, 1999; McDonnell y Russell, 1999; Delcour, 2009).

II.5.4 Agua electrolizada.

El lavado de los alimentos frescos es un procedimiento de limpieza que se usa comúnmente en la industria; sin embargo, el lavado no hace que los alimentos se encuentren libres de microorganismos y otras sustancias antimicrobianas a concentraciones aceptables en la industria no inactivan una alta cantidad de microorganismos patógenos y comprometen la calidad y características organolépticas del alimento. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de tratamientos antimicrobianos efectivos que inactiven a los microorganismos patógenos de los

alimentos (Venkitanarayanan *et al.*, 1999, Ongeng *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008). El agua electrolizada es uno de los tratamientos antimicrobianos que surgieron como un nuevo concepto desarrollado en Rusia que ha ganado interés como desinfectante usado en la agricultura, odontología, medicina y en la industria alimenticia. Se ha demostrado tener una actividad bactericida contra la mayoría de microorganismos patógenos que son importantes en la seguridad de alimentos incluyendo *Pseudomona aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, entre otros. Tiene la ventaja de ser más efectiva, más económica y menos corrosivo que los agentes desinfectantes tradicionales.

II.5.4.1 Producción.

El agua electrolizada se produce al hacer pasar una solución diluida de cloruro de sodio (12%) o agua desionizada con una baja concentración de cloruro de sodio (0.1%) a través de una celda electrolítica en la que el ánodo y el cátodo, con un voltaje de 19.8 y 10 V respectivamente, que se encuentran separados por una membrana o un diafragma como se muestra en la Figura 6.

Durante el proceso de electrólisis, el cloruro de sodio disuelto en el agua se disocia en cargas negativas como los iones cloruros (Cl^-) e hidroxilo (OH^-) y en iones positivos, el ión sodio (Na^+) y el ión hidrógeno (H^+). Los iones negativos se adsorben en el ánodo liberando un electrón cada uno para convertirse en radicales libres que se convierten en oxígeno gas (O_2), cloro gas (Cl_2), ión hipoclorito (ClO^-), ácido hipocloroso (HClO) y ácido clorhídrico (HCl), dos radicales de cloro pueden formar también el cloro libre en forma de gas, mientras que en el cátodo, cada ión Na^+ recibe un electrón y se convierte en sodio metálico que se combina con una molécula de agua formando hidróxido de sodio (NaOH) e hidrógeno gas (H_2). (Hricova *et al.*, 2008; Venkitanarayanan *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2008, Mukhopadhyaya y Ramaswamy, 2012). Por lo tanto, durante la electrólisis se

producen dos tipos de agua: el agua electrolizada ácida y el agua electrolizada alcalina o básica.

El agua electrolizada ácida (AEA) es la que se produce en el ánodo, tiene un pH bajo (2.3-2.7), un potencial de oxidación alto mayor de 1000 mV y 50-80 ppm de cloro total disponible, se usa ampliamente en la desinfección de vegetales evitando así las enfermedades, tiene un alto efecto bactericida contra microorganismos patógenos como *E. coli*, *Salmonella entereditis* y *Listeria monocytogenes*. Por otro lado el agua electrolizada alcalina (AEAc), producido en el cátodo, tiene un pH alto (10.0-11.5) y un potencial de oxidación bajo (-800 a -900 mV) (Huang *et al.*, 2008), debido a que tiene un potencial fuerte de reducción se usa para remover la suciedad de utensilios. El agua electrolizada neutra se obtiene combinando las dos soluciones obtenidas en el ánodo y cátodo, tiene un pH neutro 6.0-8 con un potencial de óxido reducción de 750 mV y 20 ppm de cloro total disponible. Debido a su pH neutro no es corrosivo con los equipos (Deza *et al.*, 2003; Hsu, 2005).

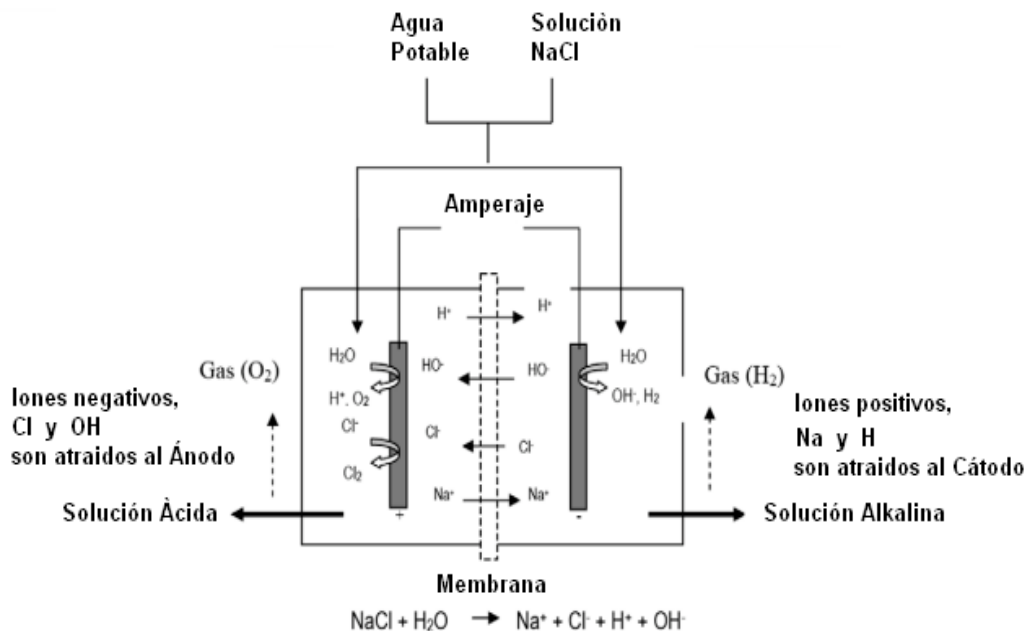


Figura 6. Celda electrolítica compuesta por dos electrodos en la que se produce agua electrolizada (Huang *et al.*, 2008).

II.5.4.2 Mecanismo de acción.

La teoría de desinfección del agua electrolizada se debe a tres factores: el pH, concentración de cloro disponible y el potencial de óxido reducción (Redox).

El potencial de óxido-reducción (Redox) de una solución es un indicador de la capacidad para oxidar o reducir. Un potencial positivo y alto indican un gran poder oxidante. El pH bajo junto a un potencial oxidante alto y la presencia de cloro total disponible hacen del agua electrolizada un sanitizante efectivo, debido a que un potencial oxidante alto libera oxígeno (O_2) por la ruptura de los enlaces débiles e inestables de los radicales OH^\cdot , cuando el oxígeno entra en contacto con los compuestos causa que éstos pierdan electrones y causa su ruptura y el cambio de funciones. En el caso de los microorganismos, la oxidación daña la membrana de la célula, creando un desbalance en los procesos metabólicos causando su muerte (Huang *et al.*, 2008; Bialka *et al.*, 2004; Tomás-Callejas *et al.*, 2011).

En general, las bacterias suelen crecer en un rango de pH de 4 a 9. Las bacterias aeróbicas crecen sobre todo en un rango de potencial oxidante de +200 a +800 mV, mientras que las bacterias anaerobias crecen bien en -700 a -200 mV. Un alto potencial de oxidación en el agua podría causar la modificación de los flujos metabólicos y la producción de ATP, probablemente debido al cambio en el flujo de electrones en las células (Huang *et al.*, 2008, Tomás-Callejas *et al.*, 2011). El potencial de óxido reducción es atribuido como el factor primordial para la inactivación microbiana, debido a que daña la membrana externa e interna de *E. coli* O157:H7 lo que lleva a su inactivación (Hao *et al.*, 2012).

El pH bajo sensibiliza la membrana celular de las bacterias ocasionando la entrada del ácido hipocloroso (HClO) al interior de la célula. El ácido hipocloroso (HClO) es el más activo de los compuestos clorados, al parecer elimina a los microorganismos al interrumpir la síntesis de proteínas, inhibe la oxidación de glucosa debido a que se oxidan los grupos sulfhidrilo de ciertas enzimas importantes en el metabolismo de los carbohidratos, reacciona con los ácidos

nucleícos, purinas y pirimidias, causando un desbalance del metabolismo al destruir enzimas claves, induce lesiones en el DNA, forma de derivados tóxicos a partir de citosina y la creación de aberraciones cromosomales (Bialka *et al.*, 2004; Hao *et al.*, 2012).

El ácido hipocloroso también produce el radical $\cdot\text{OH}$ que actúa en los microorganismos, otros factores que influyen en la potencia bactericida son las concentraciones del ión hipoclorito (ClO^-) y cloro gas (Cl_2) (Huang *et al.*, 2008). El dióxido de cloro actúa a nivel de la membrana celular y no reacciona con la materia orgánica, oxida los fenoles (Fernández, 2008).

El agua electrolizada no afecta el tejido, color de la superficie y la apariencia en general del producto (Tomás-Callejas *et al.*, 2011).

II.5.4.3 Teoría de electroactivación del agua.

Teóricamente, el agua electrolizada se encuentra asociada con la alteración química de su composición, acidez y/o alcalinidad. El agua, es una molécula polar, con interacciones intermoleculares dipolo-dipolo que llevan a la formación de puentes de hidrógeno. El estado dinámico de los puentes de hidrógeno y de la estructura de los clúster del agua pueden ser cambiados por la amplificación de un campo eléctrico externo o por la concentración de iones en la solución. La activación del agua es un proceso en el que el agua es transferida a un estado termodinámico de no-equilibrio, el cual está acompañado por un cambio en la estructura del agua. Cuando las moléculas de agua son excitadas por un campo eléctrico, se observa un cambio estructural y energético de los clúster de agua, más aún, el agua adquiere una estructura de microcluster resonante, puesto que los clústers de agua pasan a ser más pequeños. Al activarse, el agua pasa a un estado meta-estable, manifestando un incremento en la actividad química en un periodo de relajación. El agua activada está caracterizada por una alta actividad fisicoquímica y biológica y un de los parámetros más importantes de este tipo de agua es su

potencial de óxido–reducción (redox) y pH, resultado de la alta resonancia de los microcluster estables de alta energía resonante, esta estructura está dada por la co-vibración de las moléculas de agua y de las especies cargadas cerca de la interface del electrodo. El arreglo de las moléculas de agua cuando son alteradas electroquímicamente esta directamente relacionado con una mejor penetrabilidad e interacción de los iones microbicidas. La reactividad de las soluciones electroactivadas se incrementan significativamente comparada con las de una estado normal (Rico *et al.*, 2008; Xiong *et al.*, 2010; Aider *et al.*, 2012).

El efecto antimicrobiano del agua activada resulta de diferentes especies oxidantes generados durante la aplicación del campo eléctrico en la solución. Como resultado, al solución se satura con especies activas de oxígeno y otros oxidantes, incluyendo peróxido de hidrogeno y ozono, iones cloro, cloro libre y dióxido de cloro. Por lo que el efecto antimicrobiano de las soluciones activadas son el resultado de la acción de estos oxidantes. Se ha indicado que le HOCl producido a partir de electrólisis es 400% más efectivo que el formado químicamente, por ejemplo en el cloro o conocido comúnmente como blanqueador. Algunos estudios reportan que radicales libres como el OH^\cdot se encuentran presentes en el agua electrolizada y el agua electrolizada neutra, este radical es uno de las especies más reactivas y puede ser uno de los principales responsables del efecto antimicrobiano del AEN y AE. El anolito, generado en la interface ánodo/solución, son conocidos como agentes oxidantes que producen una mezcla de radicales libres que tienen efecto antimicrobiano. Por lo que la conductividad eléctrica incrementa y cambia la estructura del agua. Cualquier cambio significativo en el potencial de óxido-reducción del medio de la bacteria puede causar consecuencias letales en las células bacterianas, debido a que el re-arreglo de las moléculas de agua permite una mejor penetrabilidad e interacción de los iones microbicidas. Los cambios irreversibles en el potencial transmembranal originados por la acción de aceptores/donadores de electrones pueden ser asociado a los procesos electrolíticos acompañados por la difusión del agua contra el gradiente de oxidación-reducción, resultando en una ruptura de la membrana y la salida del

contenido celular. Se ha establecido que la membrana celular se encuentra cargada eléctricamente, el exceso de aniones presente en la solución de anolito puede reaccionar con la membrana celular. Este fenómeno interrumpe funciones vitales de la célula bacteriana. (Xiong *et al.*,2010; Issa-Zacharia *et al.*, 2011; Aider *et al.*, 2012).

III. JUSTIFICACIÓN.

El estudio de la desinfección de frutas y hortalizas mínimamente procesadas se hace cada vez más extenso y complejo, debido a las múltiples fuentes de contaminación a los cuales se encuentran expuestos. La contaminación de los alimentos puede darse durante la producción, cosecha, empaclado, transporte, distribución y mercadeo e incluso antes del consumo, ya que pueden estar en contacto con materia fecal de humanos y animales. Algunos factores favorecen la internalización y adhesión microbiana en la superficie de los alimentos y posteriormente la formación de biopelículas, estructuras que permiten que los microorganismos sean más resistentes a los agentes antimicrobianos. Aunado a esto se conoce que existen varios factores que afectan la efectividad de los sanitizantes y es fundamental considerar que la contaminación de estos productos con microorganismos patógenos es perjudicial en términos del número de personas que son afectadas y del costo económico que causan, debido a estas razones es de vital importancia mejorar las condiciones de un sistema contaminado a través de tratamientos no térmicos que permitan reducir la carga microbiana y la inactivación de microorganismos patógenos

Es necesario el desarrollo de tratamientos antimicrobianos efectivos que inactiven a los microorganismos patógenos de los alimentos. El agua electrolizada es uno de los tratamientos antimicrobianos que surgieron como un nuevo concepto y tiene actividad bactericida contra la mayoría de microorganismos patógenos que son importantes en la seguridad de alimentos incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, entre otros.

Por lo que en este trabajo, se pretende determinar la efectividad del AEN contra microorganismos patógenos que comprometen la inocuidad de los alimentos.

IV. HIPOTESIS.

El agua electrolizada neutra (AEN) representa una alternativa al uso del hipoclorito de sodio (NaClO) para la desinfección y el control de microorganismos tales como, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* en superficies de alimentos.

V. OBJETIVOS.

V.1 Objetivo general.

Determinar la efectividad del agua electrolizada neutra (AEN) en la desinfección y eliminación de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* en la superficie de los alimentos

V.2 Objetivos específicos.

1. Evaluar el efecto AEN en la desinfección superficial de vegetales en fresco: tomate, aguacate y espárrago
2. Evaluar el efecto del AEN sobre cultivos puros de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes*
3. Estudiar el efecto del AEN sobre vegetales frescos inoculados con *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp.

VI. METODOLOGÍA.

VI.1 Materiales

VI.1.1 Materiales biológicos

Cepa bioluminiscente de *Listeria monocytogenes* EGDe resistente a cloranfenicol donada por el Dr. Collin Hill, Universidad de Cork, Irlanda.

Listeria monocytogenes Scott A donada por el Dr. Scott E. Martin. Laboratorio de microbiología. Departamento de Ciencia de Alimentos y Nutrición Humana, Universidad de Illinois en Urbana- Champaign, E.U.A.

Salmonella spp. (*Salmonella Saintpaul*, *Salmonella Oranienburg*, *Salmonella* E1) donadas por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Coordinación Culiacán. Cepas aisladas de tomate.

VI.1.2 Alimentos

Tomate variedad Saladette y Cherry, aguacate variedad Hass, espárrago sin lesiones físicas aparentes, de superficie firme y en estado de madurez óptimo obtenidos de manera comercial en la central de abastos de la ciudad de Querétaro, Qro., México

VI.1.3 Soluciones desinfectantes

Solución de hipoclorito de sodio (Cloralex[®]) al 6% equivalente a 60,000 ppm de cloro total disponible pH 9.7 ± 0.28 y un potencial redox de 792.78 ± 1.19 mV

Agua electrolizada neutra producida por un prototipo desarrollado en el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico del Estado de Querétaro (CIDETEQ) con una concentración de cloro total disponible (especies oxidantes) de 5639.20 mg/L, pH 7.36 ± 0.92 y redox de 1022.87 ± 6.39 mV

Agua destilada (tratamiento control) pH 6.87 ± 0.39 y un redox 411.55 ± 2.02 mV.

VI.1.4 Compuestos químicos

Caldo soya tripticaseína, buffer neutralizante, caldo LB, solución salina 0.85%, amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7), agar papa dextrosa, agua peptonada al 10%, agar *Salmonella-Shigella* y caldo selenito cistina se obtuvieron de Difco. Agar para métodos estándar, caldo bilis verde brillante, caldo lauril sulfato triptosa, caldo y cloranfenicol se obtuvieron de Sigma Aldrich. El suplemento selectivo para *Listeria* modificado, se adquirió de Oxford; agua destilada, agar MacConkey-sorbitol, agar XLD, caldo tetrionato, ácido tartárico y agar soya tripticaseína fueron suministrados por Bioxon, mientras que el caldo EC se obtuvo de Merck.

VI.2 Métodos

VI.2.1 Activación de las cepas de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*

Las cepas se conservaron en chaquiras de vidrio a -70°C con una suspensión que contenía 10% (v/v) glicerol y 10% (v/v) leche como agentes criogénicos. Para su activación, se tomaron una conserva de *Listeria monocytogenes* Scott A y se colocaron en 10 mL de caldo soya tripticaseína suplementado con 6.0 g/L de extracto de levadura y 2.5 g/L de K₂HPO₄ y se incubaron a 24 h a 37° C en agitación a 180 rpm. Finalizado el periodo de incubación, se tomaron los 10 mL del caldo con el microorganismo y se resuspendió en 90 mL del mismo caldo. Al finalizar el tiempo de incubación, los 100 ml del caldo la cepa se centrifugó a 6500 rpm durante 15min, se removió el sobrenadante y las células se resuspendieron en un mismo volumen solución salina 0.85% estéril, y se centrifugaron nuevamente para lavar las células a las mismas condiciones. La pastilla se resuspendió en 5 mL de la misma solución salina.

Las diferentes especies de *Salmonella* se activaron en 10mL caldo soya tripticaseína a 24 h a 37°C. Finalizado el periodo de incubación, los 10 mL de caldo de cada cepa se incubaron nuevamente en el mismo caldo por 24h a 37°C en

agitación a 180 rpm. Los microorganismos se centrifugaron a 6500 rpm durante 15 min, se removió el sobrenadante y las células se resuspendieron en un mismo volumen solución salina 0.85% estéril, y se centrifugaron nuevamente para lavar las células a las mismas condiciones.

Para conocer la concentración de los microorganismos se realizó por vaciado en placa, inoculando 0.1mL del resuspendido en Agar Soya Trypticaseína o Agar LB, para confirmar en Agar *Salmonella-Shigella* y sulfito bismuto para *Salmonella*, Agar oxford y LB con cloranfenicol para *L. monocytogenes*.

VI.2.2 Preparación del inóculo (coctel de microorganismos patógenos)

Para la preparación del inóculo individual de cada microorganismos, el cultivo activado de 18 h de *L. monocytogenes* Scott A, *L. monocytogenes* EDGe y *Salmonella* spp. se centrifugaron a 10 000 x g por 10 minutos. Se removió el sobrenadante de cada microorganismo individual y se resuspendió usando la misma cantidad de solución salina 0.85%, este proceso se repitió para un total de 2 lavados. Como último paso, se realizó una mezcla de *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp., para esto, se resuspendió el paquete celular de cada uno de ellos en solución salina 0.85% estéril y se combinaron de manera proporcionada de tal manera que contuviera 10⁹ UFC/mL de cada uno de ellos. Los volúmenes de cada suspensión microbiana de realizó para crear una mezcla de cepas.

VI.2.3 Preparación de las soluciones de tratamiento

Para el tratamiento con células libres se utilizaron concentraciones en un rango de 5-90 ppm de cloro libre de agua electrolizada neutra (AEN) e hipoclorito de sodio (NaClO) para *L. monocytogenes* Scott A, *L. monocytogenes* EGDe, y *Salmonella* spp.

Para los tratamientos a los que se sometieron las células libres, se prepararon las soluciones a las concentraciones deseadas de cloro total disponible de ambos desinfectantes, diluyendo con agua destilada estéril.

En el tratamiento con NaClO, se utilizó una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) comercial (Cloralex®) AL 6% que se diluyó con agua desionizada estéril a una concentración de 120 y 200 ppm.

Se midió el pH, el redox usando un pHmetro/ión/conductímetro (Thermo scientific. Modelo Orionstar A211 pHmeter. electrodo de platino plata/ electrodo AgCl)

VI.2.4 Efecto del Agua electrolizada Neutra sobre cultivos puros

Se prepararon tubos de rosca con 9 mL de AEN y NaClO con las diferentes concentraciones de agentes oxidantes y 9 mL de agua desionizada como control.

Para cada experimento, se utilizó un inóculo, de alrededor de 9 Log UFC/mL. Todos los tubos de AEN y NaClO y agua desionizada se aclimataron durante 15 min a temperatura ambiente.

Una vez acondicionados los tubos, se colocó 1 mL de inóculo a cada tubo de las soluciones de tratamiento y control. Se evaluó el efecto de las concentraciones de 5, 7, 9 y 12 ppm a los 1, 3 y 5 min de tiempo de exposición para células libres de *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. a temperatura ambiente

Transcurridos los tiempos de exposición se tomaron 1 mL de cada tubo de tratamiento y se transfirió a 9 mL de solución de amortiguador neutralizante (5.2 g/L, amortiguador neutralizante, Difco) que contenía una mezcla de 0.0043% fosfato mono potásico, 0.016% tiosulfato de sodio y 0.5% de aril sulfonato durante 10 s para neutralizar el cloro total disponible del agua electrolizada (Ayebah *et al.*, 2006 y Robbins *et al.*, 2005).

Posteriormente, se realizaron diluciones sucesivas y se determinó el número de células viables mediante el método de Miles-Misra en placas de agar LB y

Oxford para *Salmonella* usando dos medios, agar *Salmonella-Shigella* y agar sulfito bismuto.

VI.2.5 Retos microbianos

VI.2.5.1. Tomate

Los tomates variedad Cherry de peso similar (aproximadamente 10 g), se almacenaron a 5°C, hasta su tratamiento. Antes de los tratamiento de desinfección, el tomate fue lavado y desinfectado (NaClO, 200 ppm seguido de la exposición a luz UV por 15 min) para eliminar la microflora natural antes de la inoculación. Los vegetales se sumergieron en una suspensión preparada con 250 mL de peptona al 0.1%, en donde cada microorganismos en estudio tenía una población de 10^9 UFC/mL. Se evaluó el tiempo de contacto necesario para la adhesión microbiana a la superficie del tomate, para lo cual se realizó un diseño experimental factorial fraccionado 1/3 (3^3), que involucra tres factores con tres niveles cada uno. Los factores fueron, tiempo de incubación: 1, 3 y 5 min, velocidad de agitación: 150, 300 y 500 rpm y tiempo de secado del tomate inoculado en campana de flujo laminar: 1, 3 y 5 min.

VI.2.5.2 Aguacate

Para la adhesión de la mezcla de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*, en aguacate, se siguió la metodología descrita por Rodríguez-García *et al.* (2011), el aguacate previamente desinfectado y libre de materia orgánica, se cortó la cáscara de manera aséptica en cuadros de 2.54 cm x 2.54 cm, con área de 6.45 cm², procurando dejar pulpa para evitar la rápida deshidratación de la cáscara. Posteriormente se realizó una desinfección con etanol al 70% (v/v) y se sometieron a radiación UV por 15 min, para eliminar sobrevivientes de la microflora natural del fruto. Posteriormente, los aguacates fueron inoculados con 100 µL de una suspensión de 9 Log UFC/mL de cada uno de los microorganismos patógenos. El inóculo se dispersó con una asa estéril y se dejó secar en campana de flujo laminar

por 1 h. Posteriormente se realizó un lavado con amortiguador de fosfatos 50 mM para retirar las células no adheridas a la superficie.

VI.2.6 Tratamiento de alimentos con agua electrolizada neutra

VI.2.6.1 Desinfección con agua electrolizada neutra y NaClO para reducir la carga de la microflora natural de los alimentos modelos

Los alimentos (tomate, aguacate y espárrago) con un peso aproximado de 25 g se sumergieron en 225 mL de la solución desinfectante de AEN con diferentes concentraciones (70-300 ppm) y de NaClO (120 ppm). Posteriormente, se enjuagaron con amortiguador neutralizante durante 1 minuto, para parar cualquier actividad bactericida y/o bacteriostática, sin afectar la carga microbiana, y se dejaron secar en campana por 5 min. Posteriormente, los alimentos se colocaron en agua peptonada 0.1% y se homogenizaron en un stomacher por 2 min a una velocidad de 250 rpm.

El control (0 ppm) correspondió a un lavado con agua destilada desionizada pH 7, los tratamientos control fueron realizados como se describió anteriormente con los tratamientos con AEN.

La población inicial del vegetal se obtuvo mediante agitación orbital colocando el vegetal en 90 mL de agua peptonada al 0.1% durante 2 min. Se realizaron las diluciones apropiadas de esta solución y se realizó el recuento en placa con medio según la cepa.

VI.2.6.2 Reducción de los microorganismos patógenos inoculados en la superficie del alimento

VI.2.6.2.1 Tomate

Una vez inoculados los alimentos, estos se colocaron en 90 mL de la solución de tratamiento durante 1, 3 y 5 minutos en un agitador orbital a una

velocidad de 300 rpm. Posteriormente, se enjuagaron con amortiguador neutralizante durante 1 minuto, para parar cualquier actividad bactericida y/o bacteriostática, sin afectar la carga microbiana, y se dejaron secar en campana por 5 min. Posteriormente, los tomates se colocaron en agua peptonada 0.1% y se homogenizaron en un stomacher por 2 min a una velocidad de 250 rpm.

Los tratamientos con NaClO, se realizaron con una concentración máxima de 200 ppm y con un tiempo de contacto de 1, 3 y 5 min. Los tratamientos se realizaron como se describió anteriormente con los tratamientos con AEN.

El control (0 ppm) correspondió a un lavado con agua destilada desionizada pH 7, los tratamientos control fueron realizados como se describió anteriormente con los tratamientos con AEN.

La población inicial del vegetal se obtuvo mediante agitación orbital colocando el vegetal en agua peptonada al 0.1% durante 2 min. Se realizaron las diluciones apropiadas de esta solución y se inocularon placas con medio selectivo según la cepa.

VI.2.6.2.2 Aguacate

Una vez inoculados el aguacate, estos se colocaron en 20 mL de la solución de tratamiento durante 1, 3 y 5 minutos procurando que la cáscara quedara totalmente sumergida en la solución. Posteriormente, las cáscaras de aguacate, se enjuagaron con amortiguador neutralizante por 10 s. Las células se recuperaron por frotación con un hisopo húmedo estéril con agua peptonada 0.1%. Se frotó vigorosamente el área de tratamiento con el hisopo estéril de manera vertical, horizontal y dos veces en forma diagonal y se introdujeron en un tubo con 10 mL de agua peptonada 0.1%. Se homogenizaron en vórtex por 1 minuto y se realizaron diluciones seriadas.

Los tratamientos con NaClO, se realizaron con una concentración máxima de 200 ppm y con un tiempo de contacto de 1, 3 y 5 min. Los fueron realizados como se describió anteriormente con los tratamientos con AEN.

El control (0 ppm) correspondió a un lavado con agua destilada desionizada pH 7, los tratamientos control fueron realizados como se describió anteriormente con los tratamientos con AEN.

La población inicial del vegetal se obtuvo mediante frotación con hisopo y se colocó en un tubo con 10 mL de agua peptonada al 0.1%, se homogenizaron en vórtex por 1 min y se realizaron las diluciones apropiadas de esta solución y se inocularon placas con medio selectivo según la cepa.

VI.2.6.3 Mantenimiento de la calidad microbiológica del tomate inoculado con *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*.

Una vez inoculados los alimentos, estos se colocaron en una bolsa estéril conteniendo 90 mL de la solución de tratamiento de AEN y NaClO durante 1 min, en un agitador orbital a una velocidad media de 300 rpm. Los alimentos no se enjuagaron con amortiguador neutralizante debido a que el propósito era investigar si existía algún efecto residual de las soluciones desinfectantes a lo largo del tiempo. Posteriormente, los tomates se colocaron a una bolsa estéril para evitar cualquier contaminación externa, y se almacenaron en refrigeración (4 °C) por 21 días, con el objetivo de evaluar el efecto residual del AEN y NaClO. Se tomaron muestras los días 0, 7, 14 y 21 días y se analizaron microbiológicamente, para eso, los tomates estos se colocaron en 90 mL de agua peptonada 0.1% y se homogenizaron en un stomacher por 2 min a una velocidad de 250 rpm.

Los tratamientos con NaClO, se realizaron con una concentración máxima de 200 ppm y con un tiempo de contacto de 1, 3 y 5 min. Los tratamientos se realizaron como se describió anteriormente con los tratamientos con AEN.

El control (0 ppm) correspondió a un lavado con agua destilada desionizada pH 7, los tratamientos control fueron realizados como se describió anteriormente con los tratamientos con AEN.

La población inicial del vegetal se obtuvo mediante agitación orbital colocando el vegetal en 90 mL de agua peptonada al 0.1% durante 2 min. Se realizaron las diluciones apropiadas de esta solución y se inocularon placas con medio selectivo según la cepa.

VI.2.7 Análisis microbiológico de los alimentos

VI.2.7.1 *Listeria monocytogenes* EGDe

El alimento (tomate y aguacate) se colocó en 90 mL de peptona al 0.1%, siendo esta la dilución directa, para la recuperación de células adheridas. Para el tomate, las bolsas estériles con el alimento, se homogenizaron en un stomacher a una velocidad de 300 rpm por 2 min. Posteriormente se prepararon diluciones seriadas tomando 1mL de la solución directa y transfiriéndolo a tubos con 9 mL de agua peptonada 0.1%. Se inocularon placas en agar LB con cloranfenicol para *L. monocytogenes* EGDe. Las cajas se incubarán durante 24 horas a 37°C.

Para el aguacate, se realizaron diluciones seriales de tubo primario con el hisopo y se homogenizaron en un vórtex.

VI.2.7.2 *Listeria monocytogenes* Scott A

El alimento (tomate y aguacate) se colocó en 90 mL de peptona al 0.1%, siendo esta la solución directa dentro de una bolsa estéril, para la recuperación de células adheridas. Para el tomate, las bolsas estériles con el alimento, se

homogenizaron en un stomacher a una velocidad de 300 rpm por 2 min, después de ello se prepararon diluciones seriadas tomando 1mL de la solución directa y transfiriéndolo a tubos con 9 mL de solución salina al 0.85%. Se inocularon placas en agar Oxford suplementado con extracto de levadura 0.6% para *L. monocytogenes* Scott A. Las cajas se incubaron durante 24 horas a 37°C.

Para el aguacate, se realizaron diluciones seriales de tubo primario con el hisopo y se homogenizaron en un vórtex.

VI.2.7.3 *Salmonella* spp.

El alimento (tomate y aguacate) se colocó en 90 mL de peptona al 0.1%, siendo esta la solución directa dentro de una bolsa estéril, para la recuperación de células adheridas. Para el tomate, las bolsas estériles con el alimento, se homogenizaron en un stomacher a una velocidad de 300 rpm por 2 min, después de ello se prepararon diluciones seriadas tomando 1mL de la solución directa y transfiriéndolo a tubos con 9 mL de solución salina al 0.85%. Se inocularon placas en agar *Salmonella-Shigella* y Sulfito Bismuto suplementados con extracto de levadura 0.6% para *L. monocytogenes* Scott A. Las cajas se incubarán durante 24 horas a 37°C.

Para el aguacate, se realizaron diluciones seriales de tubo primario con el hisopo y se homogenizaron en un vórtex.

VI.2.8. Desinfección con agua electrolizada neutra y NaClO para reducir la carga de la microflora natural de los alimentos modelos

VI.2.8.1. Determinación de la microflora natural de los alimentos modelos (Bacterias mesofílicas aerobias)

Los alimentos sometidos al tratamiento de desinfección, se colocaron en 225 mL de agua peptonada 0.1%, siendo esta la solución directa dentro de una bolsa estéril, para la recuperación de células adheridas. Las bolsas estériles con el

alimento, se homogenizaron en un stomacher a una velocidad de 300 rpm por 2 min, después de ello se prepararon diluciones seriadas tomando 1 mL de la solución directa y transfiriéndolo a tubos con 9 mL de agua peptonada 0.1%. Se realizaron diluciones seriales y se colocó 1 mL de cada dilución en cajas Petri y se agregó de 12 a 15 mL del agar para métodos estándar. Se mezclaron mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas de reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante. Siguiendo la técnica de vaciado en placa descrita en la NOM-092-SSA1-1994, se incubaron las cajas en posición invertida durante 48 h a 37°C. Se contaron las colonias desarrolladas e incluyendo colonias puntiformes. Las colonias deben estar en un intervalo de 25 a 250 colonias. Placas con menos de 25 colonias, se contaron las presentes en esa dilución y se multiplicaron por el factor de dilución para obtener el valor estimado. En cajas con más de 250 colonias, se contaron aquellas porciones de placa que sea representativo de la distribución de las colonias y considerar que una caja Petri de 100 mm de diámetro contiene 65 cuadros de la cuadrícula del contador para obtener el valor estimado.

VI.2.8.2 Determinación de Hongos y Levaduras

Después de la inoculación de las diluciones de las muestras preparadas en las cajas Petri, se agregaron de 12 a 15 mL del agar Papa dextrosa atemperado a $45\pm 1^{\circ}\text{C}$ y acidificado a un pH de $3.5\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ con ácido tartárico estéril al 10%. Siguiendo la técnica de vaciado en placa descrita en la NOM-111-SSA1-1994, Se incubaron las cajas en posición invertida durante 5 días a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Contar aquellas cajas que contengan entre 10 y 150 colonias.

VI.2.8.3 Determinación de coliformes totales por Número más probable (NMP)

VI.2.8.3.1 Prueba presuntiva

Se inocularon 10 mL en tres tubos de caldo lactosado con concentración doble y 1 mL y 0.1 mL de muestra a cada uno de la serie de 3 tubos con caldo lactosa concentración sencilla (Los tubos contenían campanas de fermentación

Durham). Se incubaron los tubos a 35 ± 0.5 °C y se examinaron a las 24 ± 2 h y se observaron si hay formación de gas, en caso contrario se prolongó la incubación hasta 48 ± 2 h.

VI.2.8.3.2 Prueba confirmatoria

De cada tubo que mostró formación de gas, se tomó una azada y se sembró en un número igual de tubos con caldo bilis verde brillante y se incubaron a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 h, si la formación de gas no se observó en este tiempo, se prolongó la incubación por 48 ± 2 h. Para el conteo de coliformes totales se utilizó la tabla del número más probable (NMP) para serie de 3, que se encuentra descrita en la NOM-112-SSA1-1994.

VI.3 Análisis estadístico

Se reportaron los valores de reducción de microorganismos patógenos y de la microflora natural presentes en la superficie de los alimentos causados por los tratamientos de desinfección con AEN y NaClO y los control (0 ppm, lavado con agua destilada). Las medias de los valores y las desviaciones estándar, representaron los valores de 3 diferentes experimentos con 3 réplicas por tratamiento por experimento. Los datos fueron analizados usando JMP versión 5.0.1 para las diferencias significativas entre los tratamientos de AEN con diferentes concentraciones de cloro total disponible utilizando la prueba de Tukey. Las diferencias significativas se establecieron por una diferencia significativa a un valor de significancia $\alpha=0.05$.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1 Calidad microbiológica de los alimentos en fresco: determinación de la microflora

La determinación de la microflora natural de los alimentos modelo consistió principalmente de tres grupos de microorganismos indicadores, las bacterias mesófilas aerobias (BMA), hongos y levaduras (HyL) y coliformes totales (CT). La población HyL fue de 3.2, 3.9, 4.4 Log UFC/unidad para tomate, aguacate y espárrago, respectivamente. Para el caso de BMA, fue de 4.4, 5.0, y 4.8 Log UFC/unidad para tomate, aguacate y espárrago respectivamente, y la población inicial de CT fue de 1100 NMP/unidad para los tres alimentos modelos.

Algunos estudios realizados para conocer la calidad microbiológica de las frutas y hortalizas, como por ejemplo, Velázquez, *et al.*, (2009) y Lee *et al.*; (2014), reportan una microflora natural que va de un rango de 10^4 - 10^6 UFC/g de células viables, por lo que los productos en fresco siempre tendrán su propia microflora, y no sería inusual encontrar una carga inicial de 10^6 UFC/g de células viables. Por lo anterior, los resultados obtenidos de la calidad microbiológica en los tres alimentos modelo se encuentran dentro del rango reportado por otros autores. También se ha reportado la microflora de HyL y CT de 4.90 Log UFC/tomate y 3.04 Log UFC/tomate; los resultados encontrados en nuestros alimentos también oscilan entre estos valores. Oliveira, *et al.* (2011), estudiaron la calidad microbiológica de 162 vegetales, entre los que se encontraban calabazas, lechugas, una mezcla de champiñones y espinacas, y se detectaron poblaciones por arriba de 1000 NMP/g de CT para el 81.5% de las muestras. Allende *et al.*; en el 2008, realizaron un estudio en el que analizaron escarolas (endivia) y lechuga, encontrando que para la escarola, las poblaciones iniciales de BMA era de 6.9 ± 0.1 Log UFC/g, 5.4 ± 0.3 Log UFC/g para CT y 4.2 ± 0.1 Log UFC/g para los HyL. Para la lechuga, la población de BMA fue de 3.6 ± 0.2 Log UFC/g, para el caso de HyL se encontraron poblaciones de 3.0 ± 0.3 Log UFC/g y para los CT la población inicial fue de 2.4 ± 0.2 Log UFC/g.

Betts (2011) hace hincapié en que los productos en fresco, como las frutas y hortalizas, generalmente crecen en lugares abiertos o expuestos al medio ambiente y en contacto con el suelo. Ambos escenarios permiten el libre acceso de un gran número de microorganismos a la planta o al fruto, factores que deben considerarse a la hora de interpretar resultados

Los tres alimentos modelo tenían diferente tipo de superficie, siendo el espárrago y el aguacate los alimentos que contenían una mayor cantidad de BMA y HyL probablemente asociado a su topografía. Aycicek, *et al.*(2006), reportan que debido a que las frutas y hortalizas frescas tienen diferentes morfologías y funciones metabólicas, éstos consecuentemente, pueden proveer diversos nichos ecológicos para los microorganismos. Por lo que es lógico que los resultados reportados en la literatura y aquellos obtenidos en esta investigación indiquen una amplia diferencia en el número de microorganismos, dependiendo del tipo de producto, prácticas agronómicas y condiciones ambientales.

La presencia de bacterias esporuladas, hongos y levaduras y microorganismos patógenos se encuentra asociado a que durante cualquiera de las etapas del campo al consumo de los productos frescos (crecimiento, cosecha, procesamiento, empaque, transporte y manejo) la contaminación puede llevarse a cabo desde una gran variedad de fuentes como el ambiental, animal y humana, por lo que garantizar su inocuidad resulta difícil. (López-Gálvez *et al.*, 2009, Issa-Zacharia *et al.*, 2011, Koide *et al.*, 2011, Olaimat y Holley, 2012).

La cosecha, el transporte, el procesamiento y el manejo de los productos pueden influenciar de manera importante el patrón de la microflora. La calidad y la seguridad de los productos en fresco depende del uso apropiado de agua de irrigación y las buenas prácticas durante la manipulación, pero existen riesgos inherentes de contaminación debido a que durante el cultivo hay un contacto cercano con el suelo y los fertilizantes orgánicos que dificultan el control de

microorganismos patógenos y deterioradores. (Oliveira. *et al*, 2011., Ramos, B., *et al*, 2013).

Aunque los recuentos microbianos de los tres grupos indicadores se encontraban dentro del rango aceptable, cabe destacar que cada uno de estos grupos tiene un significado. La presencia de HyL en un alimento es indicativo de que estos productos se encuentran en camino hacia la descomposición. Debido a que la población observada fue relativamente alta debe ponerse especial cuidado en ellos. Los HyL son considerados como una de las principales causas de deterioro y desempeñan un papel muy importante en el deterioro de los productos frescos desde la cosecha hasta el almacenamiento y su procesamiento, que afectará los atributos organolépticos como la apariencia general, olor, color y textura como consecuencia de la actividad microbiana. Las bacterias Gram negativas dominan la microflora asociada de la mayoría de las frutas y hortalizas, donde los HyL forman parte de la microflora de los productos en fresco. Generalmente, la microflora natural se compone de bacterias no patógenas, si embargo, el producto puede contaminarse con microorganismos patógenos cuya fuente es humana, de animales o ambiental (Ramos *et al.*, 2013; Bessi *et al.*, 2014).

El grupo indicador que presentó grandes recuentos en todos los alimentos analizados en este trabajo fueron las BMA, las cuales son los principales indicadores de la calidad de los alimentos, puesto que reflejan la exposición a cualquier fuente de contaminación, y en general, de la existencia de condiciones favorables para la multiplicación de los microorganismos. Este parámetro es útil para indicar si la limpieza, desinfección y el control de la temperatura durante el procesamiento, el transporte y el almacenamiento han sido suficientes. Los coliformes son microorganismos anaerobios facultativos, Gram-negativos, fermentadores de lactosa con formación de gas en 48 h y son habitantes del contenido gastrointestinal de los mamíferos y humanos que son introducidos al superficies (Aycicek *et al.*, 2006).

Como se pudo observar en estos resultados, el crecimiento microbiano varía dependiendo del tipo de producto, pH, y de acuerdo con la literatura, también se ha reportado que puede variar por la presencia natural de antimicrobianos, tasa de respiración/interacción con el empaque. El pH del producto influencia en gran manera la sobrevivencia y crecimiento de los microorganismos. La mayoría de las hortalizas tienen un $\text{pH} > 5$ y consecuentemente sostiene el crecimiento de la mayoría de las bacterias. Tejidos de algunas frutas y hortalizas proveen niveles variados de protección contra bacterias y hongos. Con respecto al potencial óxido-reducción, los productos vegetales, suelen caracterizarse por valores redox entre + 300 y 400 mV, por lo cual no es de sorprenderse que las bacterias aerobias y los hongos y levaduras son la causa más frecuente de la alteración de estos alimentos. (Jay *et al.*, 2005; Francis *et al.*, 2012).

VII.2 Efecto de las soluciones desinfectantes AEN y NaClO sobre la microflora natural de los alimentos en fresco

VII.2.1 Propiedades fisicoquímicas de las soluciones desinfectantes

Los tratamientos con las soluciones desinfectantes y sus propiedades fisicoquímicas utilizadas se presentan en el Cuadro 6. Este cuadro muestra que el agua destilada presenta un pH cercano a la neutralidad, mientras que las soluciones preparadas de AEN presentaron un pH ligeramente alcalino, sin embargo, a este valor todavía podemos lograr encontrar una alta proporción de HClO (aproximadamente 50%), la especie clorada más efectiva para inactivar bacterias. El cloralex[®] (NaClO) presentó un pH alcalino que puede ser atribuido a la presencia de hidróxido de sodio, pues de acuerdo con Torlak (2014), algunos fabricantes adicionan hidróxido de sodio a las soluciones de hipoclorito para incrementar su vida de almacén, la especie clorada que se encuentra en mayor proporción al pH del este producto comercial es el ión OCl^- .

Cuando los potenciales redox de las soluciones de AEN son altos y positivos, como los obtenidos en este trabajo (966 ± 7.54 mV), es indicativo de que son

soluciones con una gran capacidad oxidante y con una gran capacidad para inactivar microorganismos. Por otro lado, el REDOX del agua destilada es mucho menor que la del AEN (411.55 mV) y con los del NaClO (770-805 mV). Los valores de los potenciales redox del NaClO se encuentran en un rango donde la mayoría de las bacterias aeróbicas pueden crecer (Pangloli y Hung, 2013). Los potenciales altos en el agua electrolizada se debe a los cambios ocasionados por la electrolisis, resultado de la alta resonancia de los microcluster estables de alta energía resonante, esta estructura está dada por la co-vibración de las moléculas de agua y de las especies cargadas cerca de la interface del electrodo (Aider *et al.*, 2012; Joshi *et al.*, 2013)

El agua electrolizada neutra (AEN) usualmente tiene un pH cercano a la neutralidad (6-8), sin embargo, el AEN utilizada en este estudio, tiene un pH un poco más alcalino. Pangloli y Hung (2013), así como Cui *et al.* (2009), mencionan que las diferentes propiedades fisicoquímicas que existen entre las soluciones desinfectantes producidas en la electrólisis pueden ocasionarse debido a los generadores y a las condiciones, como el tiempo y voltaje usado para generar el agua electrolizada.

Cuadro 6. Propiedades fisicoquímicas de las soluciones desinfectantes usadas para la desinfección de tomate, aguacate y espárrago.

Solución desinfectante (ppm de cloro total disponible)	pH	Redox (mV)
0	6.87±0.30	411.55±2.03
AEN 70	8.12±0.08	922.97±6.69
AEN 100	8.15±0.09	934.71±3.79
AEN 200	8.23±0.08	945.75±5.06
AEN 300	8.42±0.06	966.06±7.54
NaClO 120	8.64±0.14	970.71±3.57
NaClO 200	8.68±0.14	805.83±3.43

Los datos son reportados como la media de las determinaciones por triplicado ± desviación estándar.

VII.3 Reducción de la microflora natural de los productos frescos

La investigación presente se enfoca principalmente en la comparación del desinfectante más común y usado en la industria de alimentos, especialmente en la de frutas y hortalizas frescas, que es el cloro, particularmente en forma de hipoclorito, el cual será usado en concentraciones de 120 y 200 ppm de cloro total disponible con tiempos de contacto que no excedan los 5 minutos para asegurar la inocuidad de los productos en cada etapa, desde la cosecha, manejo, lavado, limpieza, empaquetado y transporte (Issa-Zacharia *et al.*, 2010; Keskinen y Annous, 2001; Francis *et al.*, 2012).

La etapa de lavado de los productos en fresco, consiste en retirar la suciedad o cualquier residuo que promueva el desarrollo y crecimiento microbiano, y de esta manera reducir la carga microbiana, sin embargo, esta etapa no elimina a los patógenos de la superficie de los alimentos. La desinfección, es definida por la FDA (1998) como el proceso de destruir o reducir sustancialmente el número de microorganismos de interés en salud pública, así como a aquellos que afecten de manera negativa la calidad del producto o la seguridad del consumidor (Sapers, 2001).

VII.3.1 Efecto del NaClO

Para disminuir la carga microbiana de los alimentos utilizados se efectuaron tratamientos de desinfección, para la cual se utilizó una solución de Cloralex (NaClO) con una concentración de cloro total disponible de 120 ppm con tiempos de contacto de 1, 3 y 5 min. En la Figura 7 se muestran las reducciones en la microflora natural de los alimentos evaluados. Se observa que para el tomate, la mayor reducción para HyL se logra a tiempos de contacto de 1 minuto, mientras que para BMA se obtuvo a los 5 minutos y para la eliminación de CT (reducción a niveles no detectables) se obtiene con la aplicación de la solución de hipoclorito de sodio con cualquier tiempo de exposición.

En el caso del aguacate, los resultados indican que para alcanzar reducciones cercanas a los 2 Log UFC/ unidad de HyL se requiere un tratamiento con hipoclorito de sodio con tiempos de contacto de 1 minutos, mientras que para BMA se requiere de 1 minuto y para CT se pueden realizar tratamientos con tiempos de contacto de 1 a 5 min.

En el caso de espárrago, la mayor reducción se obtiene a tiempos de contacto de 5 minutos para reducir aproximadamente 2 Log UFC/unidad de HyL, y para el caso de BMA los tiempos de contacto de 1 minuto son necesarios para eliminar alrededor de 2 Log UFC/unidad y para CT la reducción a niveles no detectables se requiere de cualquier tiempo de contacto.

La Figura 7 permite apreciar el grado de desinfección de los alimentos utilizando como tratamiento una solución desinfectante de NaClO. Se observa que el tomate fue el alimento que logró alcanzar mayores niveles de desinfección (Log UFC/ unidad) para todos los microorganismos indicadores, seguido del espárrago. El aguacate, fue el alimento cuya desinfección fue el de menor grado, observándose que fue el que menor reducción se obtuvo, para BMA y HyL.

Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, en el 2013, realizaron una desinfección de diferentes vegetales, entre los que se encontraba la lechuga, tomate y zanahorias. Para este tratamiento se usó una solución de NaClO con una concentración de cloro total disponible de 50-200 ppm, con tiempos de contacto de 0, 3, 6, 9, 12 y 15 min. Los resultados indican, que para la zanahoria, la mayor reducción de BMA fue de 3.5 Log después de 15 min de exposición con una concentración de 200 ppm. La misma reducción se alcanzó para la lechuga, pero la concentración usada fue menor (100 ppm) con un tiempo de exposición al agente de 15 min, y con un tiempo menor de 3 min, se logró una inactivación de coliformes de 1.4 Log. El tomate, fue el alimento cuya inactivación total de las BMA se alcanzó

con una concentración de cloro total disponible de 200 ppm con un tiempo de 15 min.

Al igual que esta investigación, la desinfección con NaClO en los distintos modelos de alimentos demuestran que el grado de desinfección dependerá de las características de la superficie como la rugosidad. En esta investigación, la desinfección de la superficie con NaClO se alcanza la inactivación total de BMA y de CT al igual que el estudio de Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, pero la concentración usada fue menor de 120 ppm y sobre todo con tiempos de contacto muy cortos (1-5 min), mientras que en el reporte anterior se muestra que usando una concentración mayor y con un tiempo de contacto de casi tres veces más grande se logra la inactivación total de las BMA. El aguacate y el espárrago que tienen una rugosidad similar que la de la zanahoria, es decir, con poros e irregularidades requieren de tiempos más prolongados e incluso de concentraciones mas grandes para alcanzar las máximas reducciones, pero no la inactivación total de las bacterias.

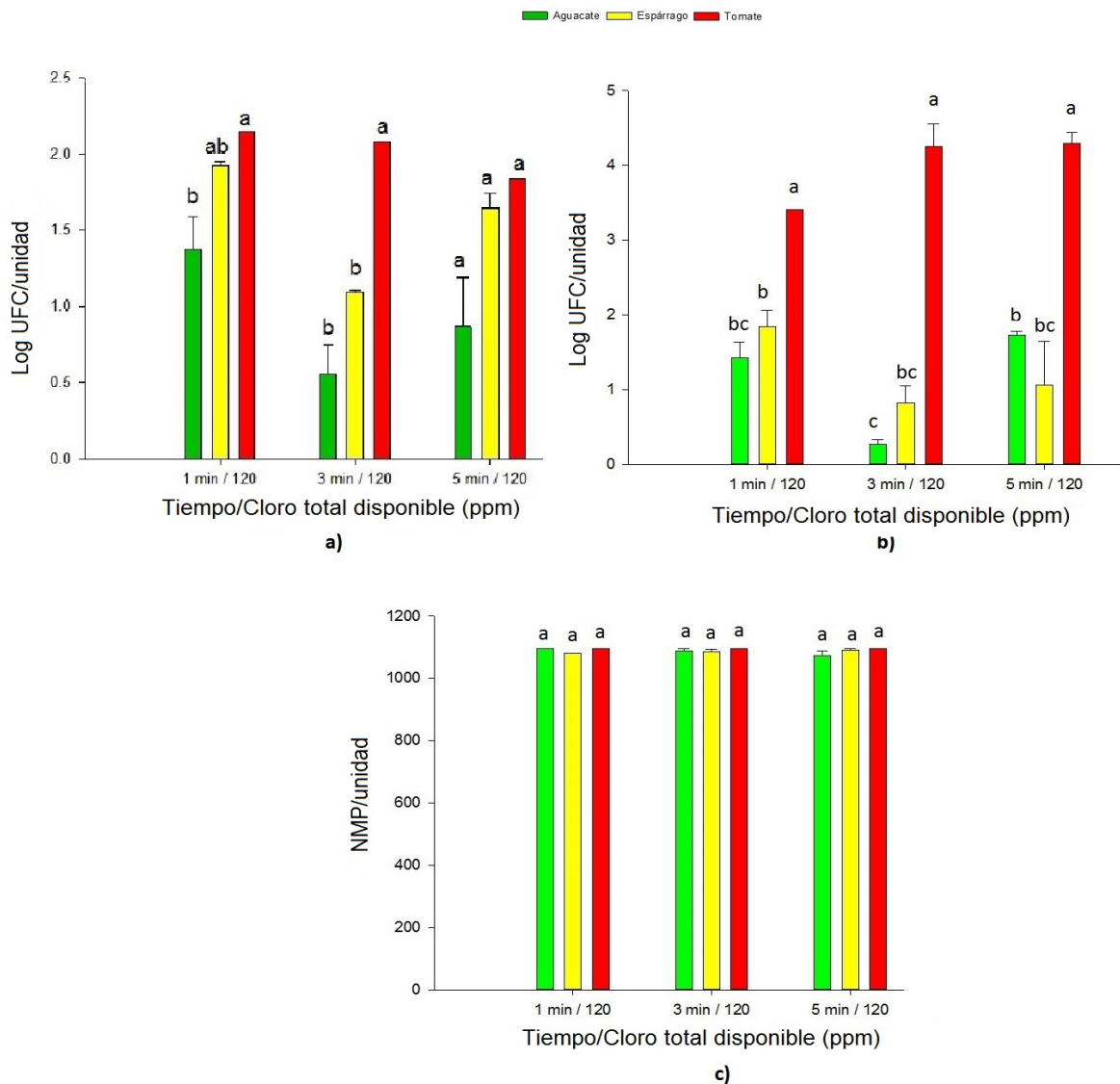


Figura 7. Número de ciclos logarítmicos reducidos por la solución desinfectante de NaClO en la cuenta inicial a) HyL, b) BMA y c) coliformes. ^{a-c} Diferentes letras arriba de las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). Las barras verticales representan la desviación estándar.

En la Fig. 7, se observa que para CT, la concentración de 120 ppm, aplicado durante 1 min, es suficiente para reducir la carga hasta niveles no detectables en los tres modelos de alimentos. Sin embargo, no es el caso para la reducción de HyL y BMA, pues para el tomate, las reducciones mayores de 2 Log UFC/unitad se obtienen a partir de un tiempo de contacto de 1 min. En un estudio realizado por

Allende *et al.*, (2008), se evaluaron diferentes desinfectantes, entre ellos el NaClO en una concentración de cloro total disponible de 100 ppm, en la reducción de la microflora de escarola y lechuga. Las reducciones más significativas fueron cuando, estos alimentos se sometieron a un proceso de desinfección en un tiempo de contacto de 1 min. Para la escarola, las reducciones de BMA, CT y HyL, fueron de 1.8, 2.0 y 0.5 Log UFC/g respectivamente. Para el caso de la lechuga, las reducciones alcanzadas de BMA, CT y HyL, fueron 1.3, 1.3 y 1.8 Log UFC/g, respectivamente. En el 2009, Allende *et al.*, realizaron un estudio cuyo objetivo fue comparar la eficiencia de diferentes sanitizantes a diferentes concentraciones para reducir la microflora del cilantro. Los resultados obtenidos muestran que la carga microbiana reducida de BMA por el NaClO a una concentración de 1 g/L fue de 1 Log UFC/g y la población inicial de HyL no tuvo una reducción significativa comparada con el lavado con agua. Ambos estudios, dejan en claro que, el grupo de microorganismos más difíciles de controlar son los HyL, pues en estos estudios, las reducciones no son significativas, aunque claro, la eficiencia de un sanitizante depende en gran medida de la rugosidad de la superficie del alimento.

Un estudio más reciente realizado por Sun *et al* en el 2012, se comparó el efecto del NaClO y del clorito de sodio acidificado en las reducciones de la microflora de algunos vegetales, entre ellos, el pepino, chile, papas, zanahorias y rábanos. La concentración usada fue de 100 mg/L (ppm), con un tiempo de contacto de 5 min. Se detectaron reducciones mayores de 2 Log UFC/g en la población inicial de BMA de la zanahoria, pero para los demás alimentos las reducciones obtenidas no fueron significativas. Para los coliformes, las reducciones alcanzadas no fueron mayores a 1 Log UFC/g. De acuerdo con Goodburn y Wallace en el 2013, expuso que las reducciones obtenidas por NaClO a una concentración de cloro disponible total de 200 ppm y con tiempos de contacto largos (10 min), fueron de 0.33 Log UFC/unidad para productos en fresco como lechuga.

En el estudio realizado por Koide *et al* (2009) y Keskinen y Annous, (2011) obtuvieron reducciones de 1 a 3.5 Log UFC/g al desinfectar productos en fresco como lechuga con NaClO con un pH de 9.6 y con tiempos de contacto que no excedían los 2 min. Estos autores mencionan que el ión hipoclorito (OCl^-), es el principal ión presente en el NaClO, debido a que el pH de la solución usada está por arriba de 9.6. En esta investigación el pH es de 8.64 ± 0.14 , por lo que, también se puede considerar que el principal ión presente es OCl^- . Este ión también tiene actividad antimicrobiana, sin embargo, presenta aproximadamente 1/8 de la habilidad desinfectante con respecto al HOCl.

Nuestros resultados son similares a lo reportado por Goodburn y Wallace en el 2013. De acuerdo con estos autores, se indican que a pesar de la concentración, pH, tiempo de contacto del NaClO, la reducción típica en la desinfección de frutas y hortalizas, es aproximadamente de 2 Log UFC/g.

Las grandes variaciones entre las reducciones obtenidas de algunas investigaciones pueden deberse a las diferencias entre las metodologías microbiológicas ocupadas, el tipo de producto en fresco objeto de estudio y la fuente de las muestras (Bohaychuk *et al.*, 2009).

Otros factores que pueden ser considerados importantes en la limitación de la eficiencia de los tratamientos son la adhesión bacteriana a sitios inaccesibles, como heridas y estomas. En la industria de productos frescos, las desinfectantes, generalmente se usan en presencia de materia orgánica, como , residuos de tierra y exudado del mismo producto, lo cual puede reducir la efectividad de la mayoría de los desinfectante, incluido el NaClO, pues reacciona con el cloro libre disponible convirtiéndolo a su forma combinada por lo que se incrementa la cantidad de solución requerida y ocasionando contaminación por la descarga de agua al medio ambiente (Park *et al.*, 2009; Keskinen y Annous 2011; Gómez-López *et al.*, 2013)

VII.3.2 Efecto del AEN

Los resultados anteriores de desinfección utilizando NaClO, permitieron proponer como desinfectante alternativo el agua electrolizada neutra (AEN) para la reducción de la microflora natural de los alimentos estudiados. Los tratamientos realizados con AEN por un tiempo de contacto de 1, 3 y 5 minutos, se muestran en la Figuras 8, 9 y 10 respectivamente. Este estudio se realizó para evaluar la eficiencia del agua electrolizada para reducir la microflora natural de los alimentos en fresco comparada con la obtenida anteriormente del NaClO y evaluar el grado de desinfección entre los alimentos que presentan rugosidades distintas. En las tres Figuras, se observa que los tratamiento con agua destilada (control: 0 ppm de cloro total disponible, etapa de lavado), reduce aproximadamente 1-2 log UFC/unidad de BMA y HyL para los tres alimentos, con respecto a CT se observa una disminución de 1100 a 600 NMP/ unidad, independientemente del tiempo de contacto.

Con respecto a los tratamientos de desinfección con el AEN con un tiempo de exposición de 1 minuto, las concentraciones de cloro total disponible de 70-200 ppm utilizadas para la desinfección de tomate, lograron una disminución en la carga microbiana al reducir aproximadamente 2.5 Log UFC/unidad para los HyL. La reducción hasta niveles no detectables se logró a 300 (Figura 8a). Sin embargo, para las bacterias mesófilas se observa una reducción de 2 Log UFC/unidad cuando el tomate es tratado a concentraciones de 70 ppm de cloro total disponible, pero al exponer el alimento a concentraciones mayores (100 y 200 ppm) se aprecia una reducción menor en la población de BMA en comparación con una concentración de 70 ppm. La inactivación a niveles no detectables de las BMA presentes en la superficie del tomate, conocido como efecto bactericida, se da a concentraciones de 300 ppm de cloro total disponible (Figura 8b). Los coliformes totales mostraron una reducción hasta niveles no detectables (<3 NMP/unidad) utilizando concentraciones de 70 ppm o mayores (Figura 8c).

La desinfección en alimentos en fresco como el aguacate y espárrago, se vio dificultada por la presencia de pliegues presentes en la superficie de estos

alimentos y la presencia de material orgánico. En ambos alimentos, los tratamientos de desinfección, mostraron una reducción progresiva en la población de HyL a medida que se fue aumentando la concentración de cloro total disponible (70-200 ppm) alcanzando una reducción máxima aproximada de 2 Log UFC/unidad. Sin embargo, el uso de 300 ppm de cloro disponible total permitió alcanzar una reducción máxima de 1.5-2 Log UFC/unidad en la población microbiana de HyL, para el aguacate y espárrago (Figura 8a).

Tanto para el aguacate como para el espárrago, no se alcanzó la inactivación total de las BMA, sin embargo, la reducción en la población microbiana fue gradual, pues a medida que se aumentaba la concentración de cloro total disponible la población microbiana disminuía, alcanzando una reducción máxima de 3 Log UFC/unidad (Figura 9b). La gráfica 9c muestra que la reducción máxima obtenida de la población de CT se alcanzó a concentraciones mayores a 200 ppm, disminuyendo la población inicial de 1100 NMP/unidad a menos de 3 NMP/unidad.

En la Figura 9 se muestran los tratamientos con AEN con tiempos de exposición de 3 minutos. En la gráfica 9a, se presentan la población sobreviviente de HyL después de los tratamientos con AEN. Con respecto a los tomates, se alcanza una reducción hasta niveles no detectables a partir de una concentración de 70 ppm de cloro total disponible, mientras que en el caso del aguacate, se alcanza la misma reducción a concentraciones de 300 ppm, y para el espárrago, la inactivación total no se alcanzó, pero la máxima reducción fue de 2.3 Log UFC/unidad a 300 ppm.

En la Figura 9b, se muestra la población sobreviviente de BMA después del tratamiento con agua electrolizada. Para el tomate, se observa que un tratamiento con 200 ppm con tiempos de exposición de 3 minutos es suficiente para reducir 5.5 Log UFC/unidad en la superficie del alimento. Sin embargo, para el caso del aguacate, una reducción similar de 4.13 Log UFC/unidad se alcanza a una concentración de 300 ppm.

El caso más contrastante se presentó para el espárrago, pues se observa que ninguno de los tratamientos fue suficientes para inactivar totalmente la población de HyL y BMA en la superficie de los alimentos, cabe destacar que, la máxima reducción alcanzada fue de 2.3 y 1.8 Log UFC/unidad a 300 ppm, respectivamente. La Figura 10c, se aprecia la población de CT, la cual se vio reducida hasta niveles no detectables (<3 NMP/unidad) en tratamientos de 70 ppm con tiempos de exposición de 3 minutos, en todas las superficies de los alimentos

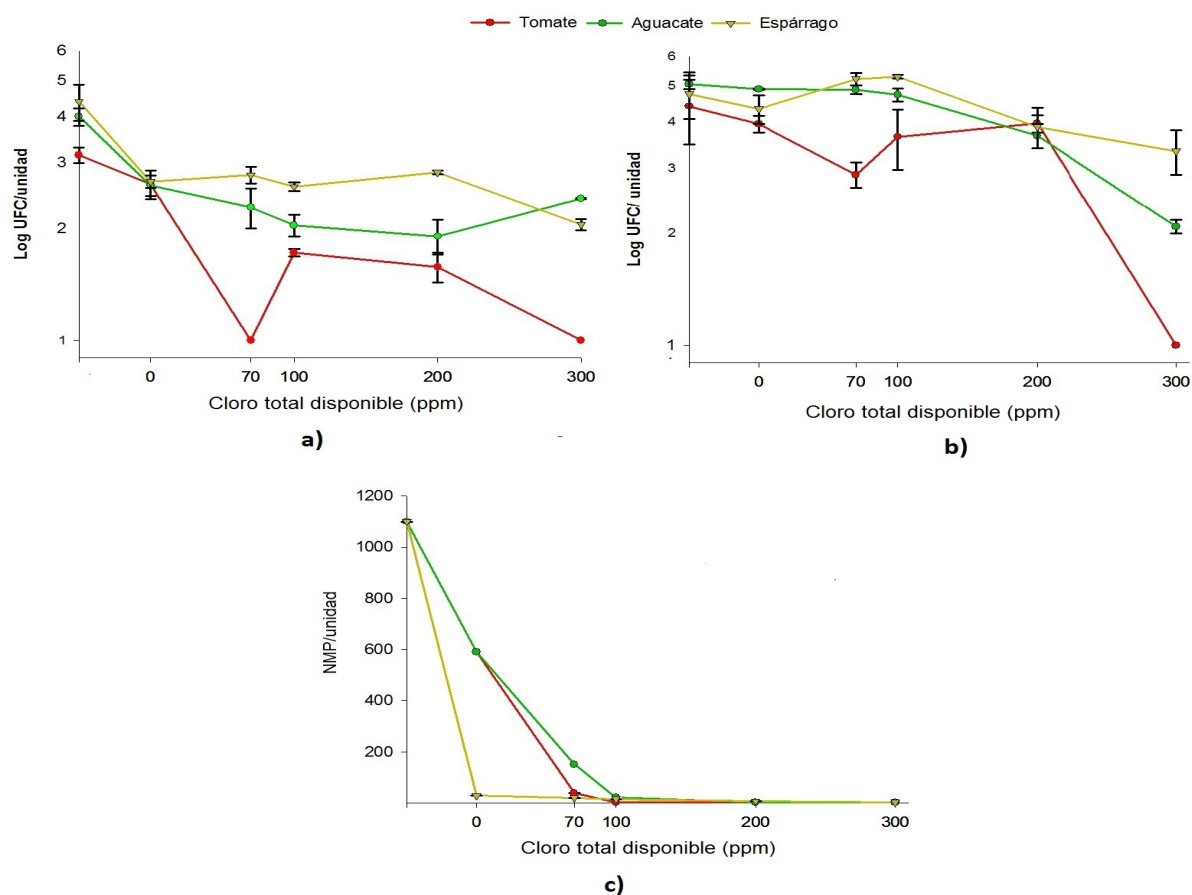


Figura 8. Efecto de los tratamientos de desinfección en un tiempo de exposición de 1 minuto en la inactivación de la microflora a) Hongos y Levaduras, b) Bacterias mesofilas aerobias y c) Coliformes totales presente en la superficie de alimentos en fresco. Los valores son la media de tres replicas y las barras verticales representan la desviación estándar.

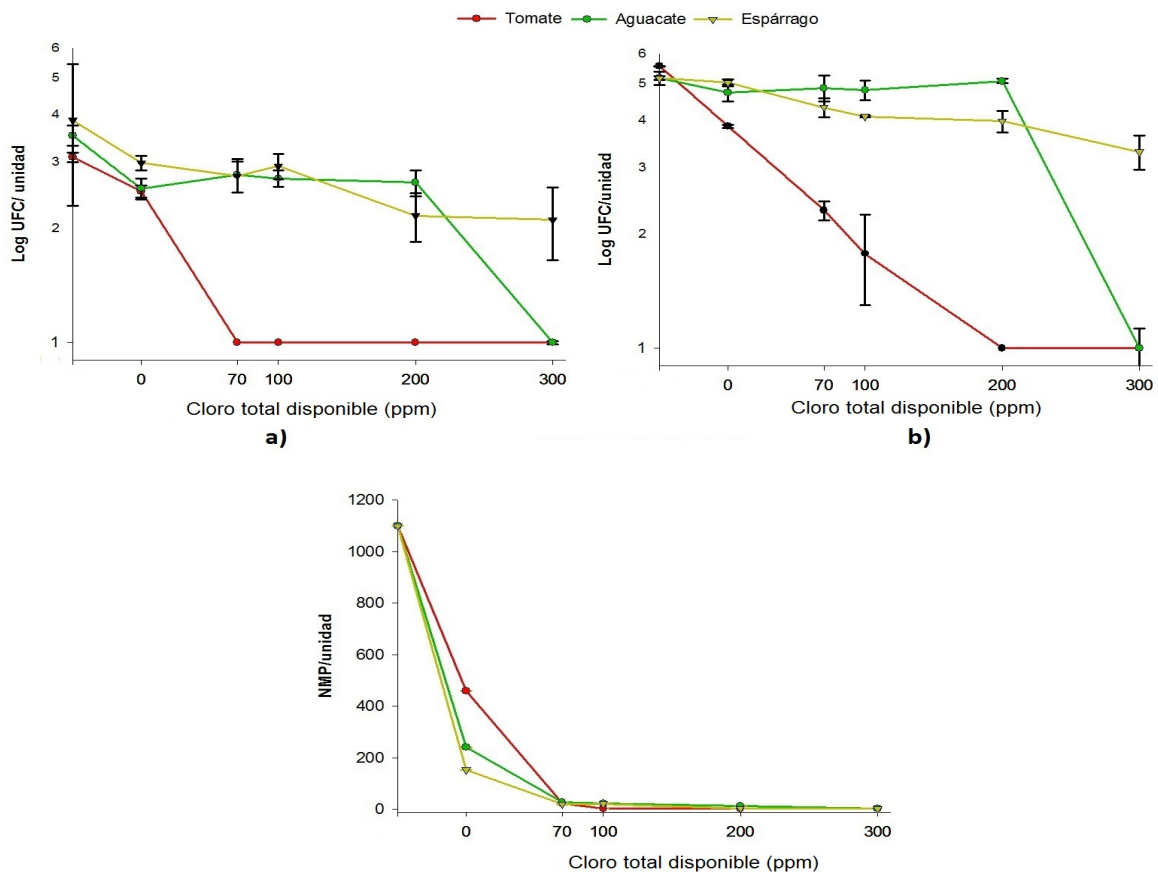


Figura 9. Efecto de los tratamientos de desinfección en un tiempo de exposición de 3 minutos en la inactivación de la microflora a) Hongos y Levaduras, b) Bacterias mesofilas aerobias y c) Coliformes totales presente en la superficie de alimentos en fresco. Los valores son la media de tres replicas y las barras verticales representan la desviación estándar

La Figura 10, muestra los tratamientos de desinfección realizados con AEN con tiempos de exposición de 5 minutos. Se muestra que para el tomate, el tratamiento realizado bajo estas condiciones muestra una inactivación de la población de HyL hasta niveles no detectables a una concentración >70 ppm. Por otro lado, la máxima población inactivada de 1.36 Log UFC/unidad de HyL en la superficie del aguacate se alcanza a concentraciones de 300 ppm de cloro total disponible, y para el caso del espárrago se alcanza la inactivación de 2.2 Log UFC/unidad bajo la misma concentración (Figura 10a).

En la Figura 10b, se estima que los tratamientos con tiempos de contacto de 5 minutos logra la inactivación de BMA en tomate hasta niveles no detectables, logrando inactivar 4.3 Log UFC/unidad a concentraciones de 100 ppm, sin embargo, para el aguacate, la máxima inactivación alcanzada se logra con tratamientos de 300 ppm, con una disminución aproximada en la población de BMA de 2 Log UFC/unidad. Una reducción similar se presentó en los tratamientos realizados con el espárrago, alcanzando una reducción de 1.73 Log UFC/unidad. Para el caso de coliformes totales (Fig. 10c) la inactivación hasta niveles no detectables en la superficie de todos los alimentos, se logró a una concentración de 100 ppm.

Los resultados anteriores demuestran que la característica en cada superficie del alimento juega un papel importante en la capacidad antimicrobiana del AEN. La mayor inactivación se alcanzó a 300 ppm con tiempos de contacto de 5 minutos logrando reducciones mayores a 2 Log UFC/unidad de la microflora natural (BMA) presente en la superficie del alimento.

El análisis del diseño experimental planteado, indica el modelo es significativo, lo que indica que el modelo explica el comportamiento de los tratamientos (Cuadro 7) Mientras que el Cuadro 8, los factores lineales (alimento, tiempo y concentración) son significativos y los factores de interacción doble (alimento*tiempo, alimento*concentración y tiempo*concentración) también son significativos. La interacción triple de alimento*tiempo*concentración es estadística significativa para la reducción de microflora de HyL en productos frescos (Cuadro 8).

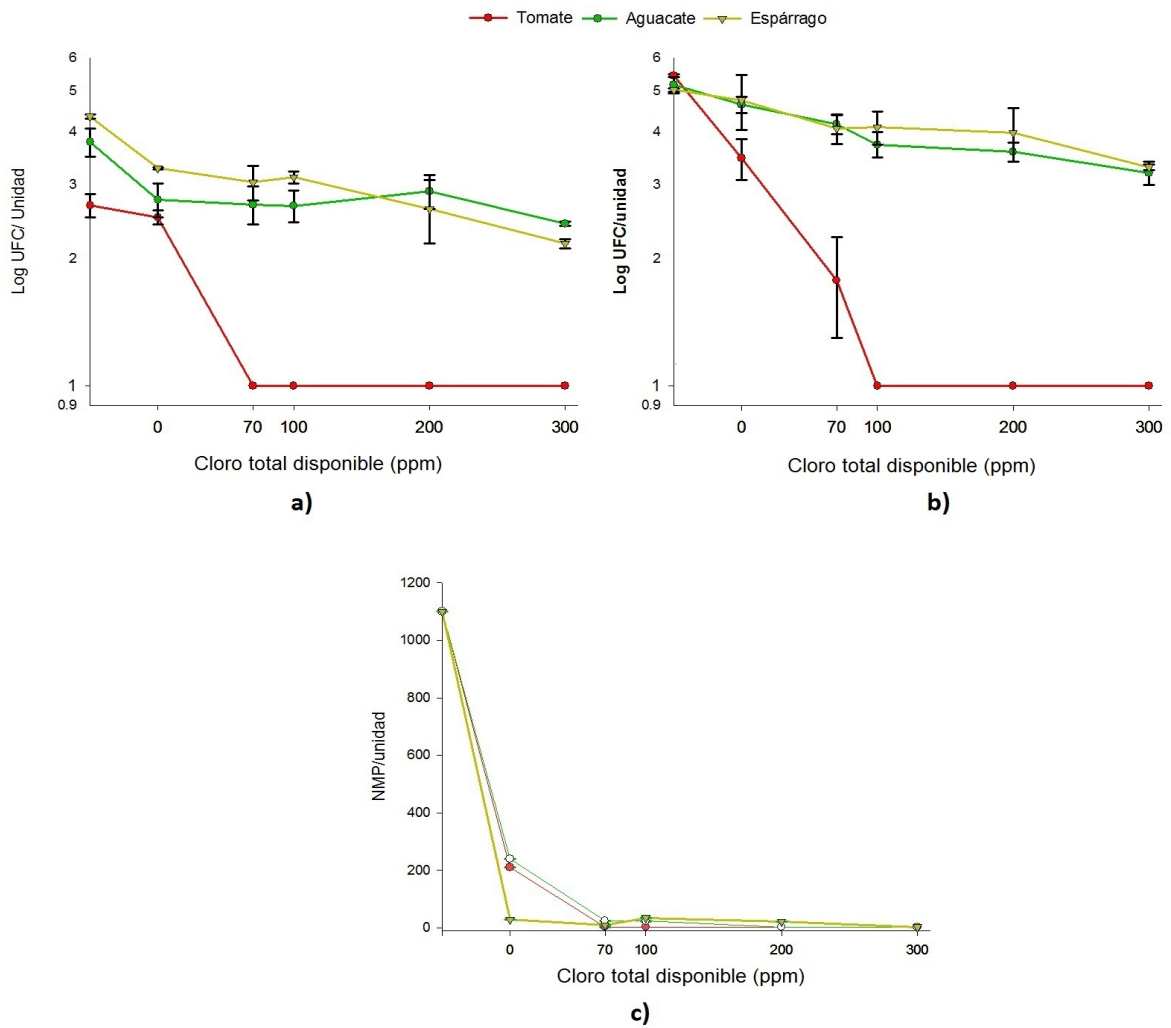


Figura 10. Efecto de los tratamientos de desinfección en un tiempo de exposición de 5 minutos en la inactivación de la microflora a) Hongos y Levaduras, b) Bacterias mesofilas aerobias y c) Coliformes totales presente en la superficie de alimentos en fresco. Los valores son la media de tres replicas y las barras verticales representan la desviación estándar.

Cuadro 7. Análisis de varianza de la reducción de la microflora de HyL en productos frescos a temperatura ambiente ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Fc	Valor p
Modelo	44	64.17	1.45	19.17	<0.001
Error	45	3.42	0.07		
C. total	89	67.59			

Cuadro 8. Factores involucrados que afectan la reducción de la microflora de HyL en productos frescos a temperatura ambiente ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$).

Fuente de variación	DF	Suma de cuadrados	Fc	Prob>F
Alimento	2	11.003	72.31	<0.0001
Tiempo	2	0.21	1.41	0.02538
Alimento*Tiempo	4	9.83	32.29	<0.0001
Concentración	4	16.16	53.12	<0.0001
Alimento*Concentración	8	13.52	22.21	<0.0001
Tiempo*Concentración	8	2.73	4.49	0.0005
Alimento*Tiempo*Concentración	16	10.71	8.79	<0.0001

Para entender mejor, la Figura 11 muestra la interacción de alimento*tiempo*concentración para obtener una reducción de la microflora de HyL. Los tratamientos realizados para el tomate, presentan mayores reducciones en la carga microbiana de HyL utilizando concentraciones mayores de 70 ppm con tiempos de contacto de 3 y 5 minutos. La topografía a su vez, también desempeña un papel muy importante en su desinfección, es decir, que una superficie lisa presente en frutas como el tomate, permite una mayor área contacto entre las bacterias y el AEN.

Mientras que la presencia de pliegues o rugosidades, como en el caso del aguacate, la mayor reducción en la carga microbiana se presenta a concentraciones de 200 ppm de cloro total disponible en un tiempo de contacto de 1 min, sin embargo, resulta interesante que a un mayor tiempo de contacto del desinfectante con el producto en fresco no presenta una diferencia significativa en

la reducción de HyL, a los 5 min a una concentración de 300 ppm se presenta una reducción de 2 Log UFC/unidad, por lo que después de 1 min de contacto, la reducciones obtenidas son de aproximadamente de 1-2 Log UFC/unidad cuando se hace uso de 200 ppm. Los tratamientos de desinfección del espárrago, muestran que concentraciones mayores de 100 ppm se alcanzan reducciones cercanas a 2 Log UFC/unidad, observándose este efecto en tiempos de contacto de 1 min.

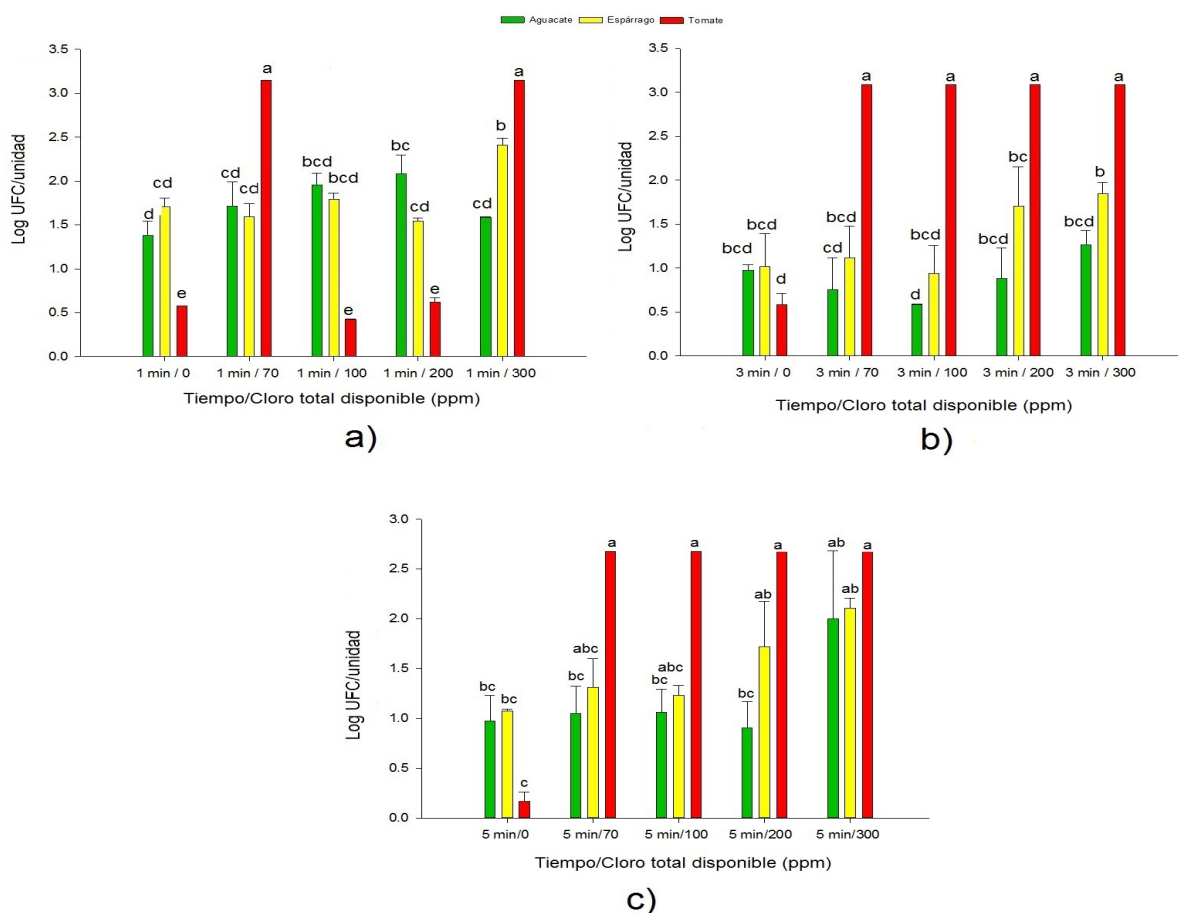


Figura 11. Número de ciclos logarítmicos reducidos en la cuenta inicial de Hongos y Levaduras (HyL) en tiempos de contacto de a) 1 minuto, b) 3 minutos y c) 5 minutos. ^{a-e}Diferentes letras arriba de las barras indican diferencias estadísticamente significativas (p ≤ 0.05). Las barras verticales representan la desviación estándar.

El Cuadro 9 muestra que el modelo explica el efecto del AEN sobre la población de BMA en los alimentos de estudio. La interacción triple es estadísticamente significativa para la reducción de BMA. En la Figura 12 se muestra las interacciones, observándose que para la desinfección de la superficie del tomate, los tratamientos con concentraciones de 300 ppm de cloro total disponible en un tiempo de contacto de 1 min se logra una reducción mayor de 4 Log UFC/g, pero en tiempos de contacto de 3 y 5 minutos se obtienen reducciones similares de la carga microbiana de BMA a concentraciones menores, esto es a 100 y 200 ppm y una reducción similar a una concentración de 70 ppm. Por otro lado, en el caso del aguacate, un tratamiento de desinfección de 1 min a una concentración de 300 ppm de cloro total disponible se obtienen reducciones de 3 Log UFC/unidad, bajo esta misma concentración pero variando el tiempo a 3 minutos se logra la máxima reducción de 5 Log UFC/unidad. Pero tiempos de contacto más prolongados (5min) las reducciones no superan los 2 Log UFC/unidad por lo que se sugiere aquellos tratamientos que sean de corta duración. Mientras que para el espárrago, reducciones similares de aproximadamente 2 Log UFC/unidad se da en tiempos de 1, 3 y 5 minutos a concentraciones de 300 ppm de cloro total disponible. Por lo que la presencia de pliegues y porosidades en la superficie obstaculiza la desinfección de los alimentos.

Cuadro 9. Análisis de varianza de la reducción de la microflora de BMA en productos frescos a temperatura ambiente ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Fc	Valor p
Modelo	44	276.53	6.28	50.67	<0.001
Error	45	5.58	0.1		
C. total	89	282.11			

Cuadro 10. Factores que involucrados en la reducción de la microflora de BMA en productos frescos a temperatura ambiente (23±2°C).

Fuente de variación	DF	Suma de cuadrados	Fc	Prob>F
Alimento	2	104.89	422.89	<0.0001
Tiempo	2	21.49	86.67	<0.0001
Alimento*Tiempo	4	25.91	52.22	<0.0001
Concentración	4	72.99	147.13	<0.0001
Alimento*Concentración	8	15.71	15.83	<0.0001
Tiempo*Concentración	8	12.00	12.10	<0.0001
Alimento*Tiempo*Concentración	16	23.53	11.85	<0.0001

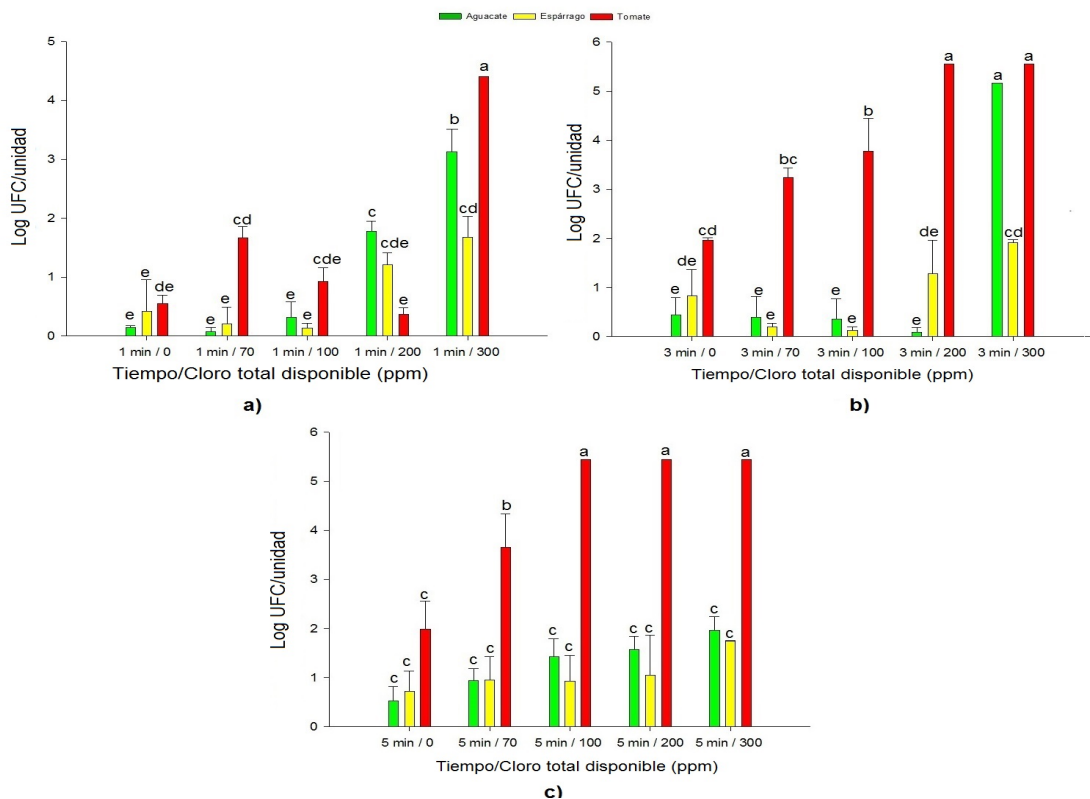


Figura 12. Número de ciclos logarítmicos reducidos en la cuenta inicial de bacterias mesófilas aerobias (BMA) en tiempos de contacto de a) 1 minuto, b) 3 minutos y c) 5 minutos. ^{a-e}Diferentes letras arriba de las barras indican diferencias estadísticamente significativas (p≤0.05). Las barras verticales representan la desviación estándar.

Aunque el modelo no es significativo para el caso de la reducción de CT (Cuadro 11), y los factores lineales así como las interacciones dobles y triples no son significativas (Cuadro 12), la Figura 13 muestra que para el tomate, la desinfección puede lograrse a concentraciones mayores de 70 ppm a cualquier tiempo de exposición, mientras que para el aguacate y espárrago, las mayores reducciones se logran de igual manera a concentraciones mayores de 70 ppm. Por lo que es conveniente, tratamientos con tiempos de exposición cortos (Figura 13).

Cuadro 11. Análisis de varianza de la reducción de la microflora de CT en productos frescos a temperatura ambiente ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Fc	Valor p
Modelo	44	286319.4	6507.26	0.97	0.5398
Error	45	301895	6708.78		
C. total	89	588214.4			

Cuadro 12. Interacciones de los factores involucrados en la reducción de la microflora de la reducción de la microflora de CT en productos frescos a temperatura ambiente ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$).

Fuente de variación	DF	Suma de cuadrados	Fc	Prob>F
Alimento	2	60	0.0045	0.99
Tiempo	2	3046.67	0.22	0.79
Alimento*Tiempo	4	22394.93	0.83	0.51
Concentración	4	87256.51	3.25	0.02
Alimento*Concentración	8	55048.89	1.03	0.43
Tiempo*Concentración	8	17919.89	0.33	0.95
Alimento*Tiempo*Concentración	16	100592.51	0.93	0.54

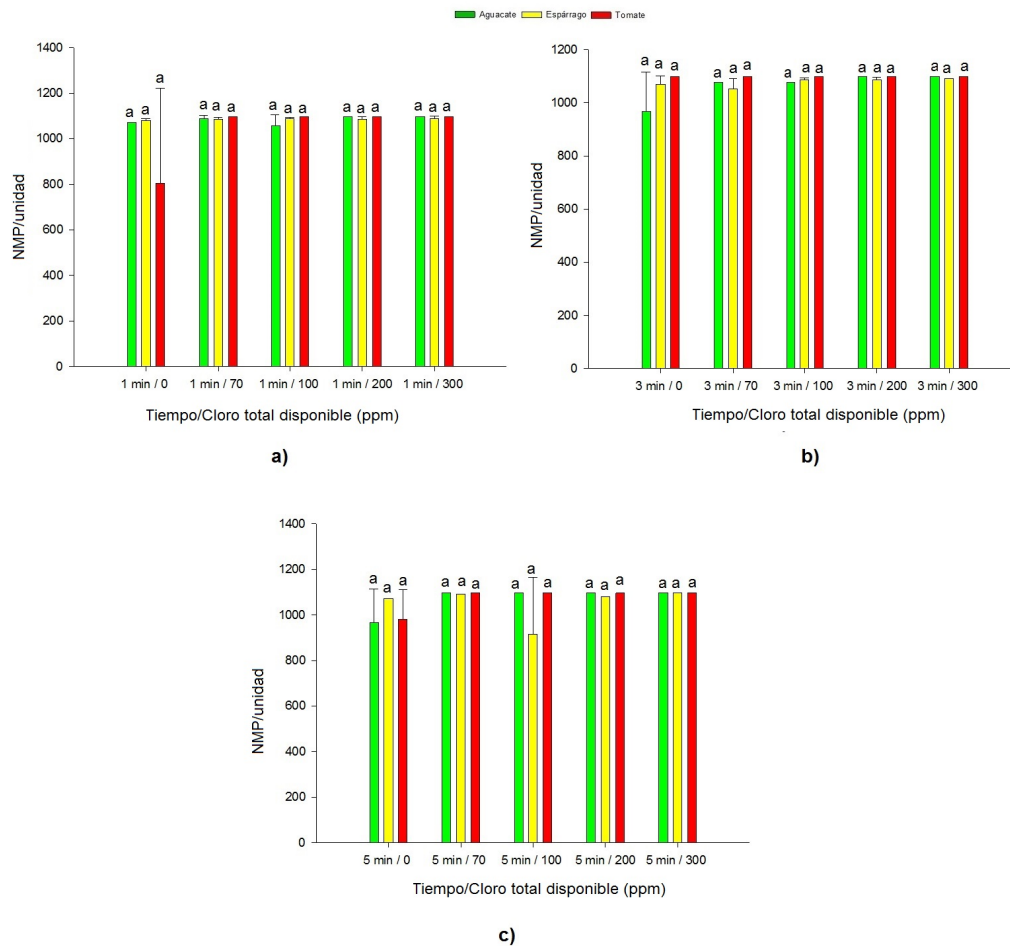


Figura 13. Número de ciclos logarítmicos reducidos en la cuenta inicial de bacterias coliformes totales (CT) en tiempos de contacto d a) 1 minuto, b) 3 minutos y c) 5 minutos. ^{a-c}Diferentes letras arriba de las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). Las barras verticales representan la desviación estándar.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1998), el hipoclorito de sodio debe ser usado a una concentración de 50-200 ppm cloro total disponible a pH 8 y con un tiempo de contacto con los productos en fresco de menos de 1 min. San José y Vanetti, 2012, indican que el grupo de sesoramiento científico de la Agencia de Protección Ambiental en los Estados Unidos (EPA) ha estipulado que cualquier tratamiento que reduzca la carga microbiana en 2 Log sea

significativo y que cualquier desinfectante nuevo o cualquier método presentado deberá compararse con 200 mg/L de cloro como estándar de eficiencia. Siguiendo las recomendaciones antes mencionadas los tratamientos de desinfección a comparar con NaClO (120 ppm) con un tiempo de contacto de 1 minuto, será el AEN con una concentración de 200 ppm con un tiempo de contacto de 1 min.

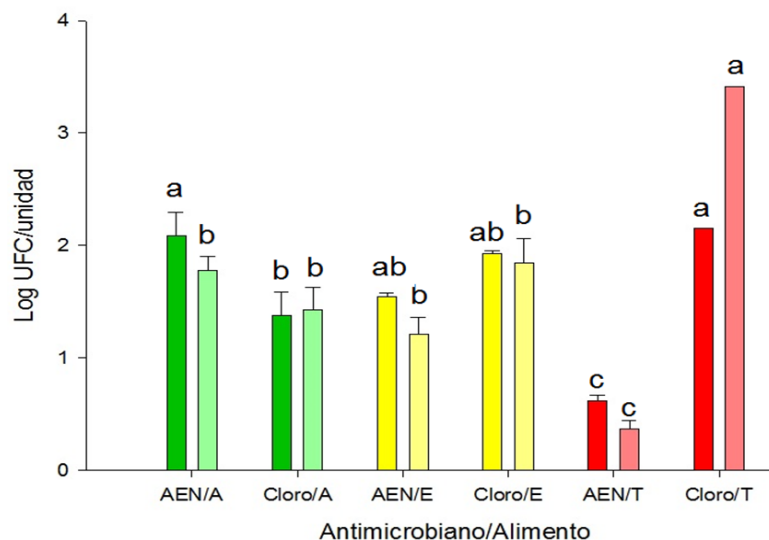


Figura 14. Número de ciclos logarítmicos reducidos en la cuenta inicial de HyL (color oscuro) y BMA (color claro) en A (aguacate), E (espárrago) y T (tomate) con tratamientos de AEN (200 ppm) y NaClO (120 ppm) con tiempos de contacto de 1 minuto.^{a-c}Diferentes letras arriba de las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). Las barras verticales representan la desviación estándar.

En la Figura 14 se observan las comparaciones en el efecto del AEN y el NaClO en las reducciones de la cuenta inicial de HyL y BMA de los tres alimentos (aguacate, espárrago y tomate). Se observa que los tratamientos realizados para la desinfección superficial del aguacate y espárrago, entre NaClO (120 ppm) y AEN (200 ppm) para ambos microorganismos indicadores, HyL y BMA, no hay diferencias significativas en las reducciones. Sin embargo, para el caso de tomate, el NaClO presenta una mayor reducción que el que se observa para el AEN, presentándose las reducciones máximas para las BMA.

Debido a que la mayoría de los alimentos frescos, como el tomate, espárrago y aguacate, son consumidos de manera cruda o mínimamente procesadas, pues no son sometidos a tratamientos térmicos rigurosos como el cocido. Por lo que el AEN ha ganado popularidad como un desinfectante en la industria de los alimentos para reducir o eliminar la población bacteriana en los alimentos (Issa-Zacharia *et al*, 2010; Goodburn y Wallace, 2013).

Los resultados obtenidos en esta investigación, están en conformidad con los reportados, con respecto al lavado de las frutas y hortalizas con agua (Control negativo que no contenía cloro total disponible). El lavado es indispensable, porque puede remover de manera efectiva residuos de tierra e incluso, este procedimiento tiene el potencial de reducir la carga microbiana, sin embargo, no debe confiarse en la completa eliminación de los microorganismos, como bien se vio en esta investigación. El lavado con agua de las frutas y hortalizas, como control, confirma que el lavado tiene poco efecto en la reducción de la población de la superficie del producto, pues reduce de 1-2 Log UFC/g (Tomás-Callejas *et al.*, 2012; Pangloli y Hung, 2013).

Issa-Zacharia *et al.*,(2011) realizaron un estudio cuyo objetivo fue evaluar la eficiencia de desinfección de los vegetales utilizando agua electrolizada ligeramente ácida (AEac), la cual se preparó por electrólisis de una solución de HCl (2%) en una celda electrolítica en ausencia de una membrana que separara el ánodo del cátodo, la solución resultante presentaba una concentración de cloro total disponible de 21.4 ppm. Para comparar la efectividad, se utilizó una solución de NaClO con una concentración de 100 ppm de cloro total disponible. El tiempo de contacto entre el alimento y el desinfectante fue de 5 min. Los alimentos seleccionados fueron 3 vegetales comúnmente consumidos en Japón (rábanos, lechuga y apio). Los resultados mostraron que tanto la AEac, y el NaClO disminuyeron de manera significativa la población de BMA. El lavado con agua presento una disminución de 0.30 Log UFC/g de BMA. Se obtuvieron reducciones con el uso de AEac de 2.70, 2.54 y 2.45 Log UFC/unidad para el apio, lechuga y rábano, respectivamente. Los

resultados obtenidos para el NaClO no fueron estadísticamente diferentes. Por lo que las equivalencias en las reducciones de BMA entre AEac y NaClO sugieren que el AEac puede ser usada como una alternativa de desinfectante al NaClO.

Por otro lado, en el 2009, Koide, realizó un estudio usando como desinfectante el AEac (20 ppm) en comparación con el NaClO (150 ppm) en la reducción de BMA, HyL de la col. El tiempo de contacto del tratamiento fue de 2 min. Los resultados obtenidos muestran que el AEac redujo la población de BMA en 1.6 Log UFC/g y el NaClO en 1.5 Log UFC/g. No se encontraron diferencias significativas entre el efecto del NaClO y el AEac. Cuando se compararon las poblaciones de HyL en ambas soluciones desinfectantes se encontró que las reducciones fueron de 1.0 y 1.3 Log UFC/g para el NaClO y el AEac, respectivamente.

Rico *et al.*(2008), realizaron un estudio para determinar la efectividad de diferentes tratamientos basados en el uso de agua electrolizada neutra para la desinfección de lechuga. Las concentraciones de cloro total disponible que se usaron fueron, 12, 60 y 120 ppm, usando como estándar el tratamiento de lavado con una solución de NaClO a una concentración de 120 ppm. Con una carga inicial de 4 Log UFC/g, todos los tratamientos mostraron una reducción significativa en la carga microbiana de BMA (>2 Log UFC/g), mientras que el lavado con agua redujo 0.8 Log. De las concentraciones usadas de AEN, la que mostró mayor reducción en la población de BMA fue 120 ppm de cloro total disponible, al reducir 2.6 Log de la carga microbiana. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre la solución de AEN y la de NaClO.

Los estudios anteriores aunados a los resultados de esta investigación, revelan que no hay diferencias significativas en la extensión de la desinfección en los alimentos con diferentes rugosidades usando agua electrolizada (AE) y NaClO. Los resultados encontrados indican que el AEN tiene un gran potencial para controlar la microflora de las frutas y hortalizas, tal y como lo reporta Bessi, H., *et al.*

en el 2014, pues sus resultados sugieren que el agua electrolizada es capaz de reducir la población de BMA y HyL de los dátiles en un 90% con el uso de concentraciones de 1, 3 y 5% de cloro total disponible con tiempos de contacto de 5 minutos.

Se ha reportado que la efectividad en la desinfección del NaClO depende de la concentración no ionizada del HOCl y la generación de radicales como O_2 y $\cdot OH$ que causan daño letal en los microorganismos. El cloro libre, es la especie de cloro responsable de la inactivación microbiana. La cantidad relativa de cada especie de cloro libre (Cl_2 , HClO y ClO^-) depende del pH y de la temperatura. El anión $HClO^-$ es la especie de cloro principal en una solución de NaClO, dado que el pH es mayor a 9, mientras que la concentración de cloro libre en forma de HClO puede ser menos del 5%. En nuestro estudio, el pH de la solución de NaClO es de 8.64, por lo que puede sugerirse que su capacidad desinfectante haya sido debido a la cantidad de cloro libre (HClO) presente en la solución (Gómez-López et al., 2013).

La disminución en la efectividad del NaOCl, se encuentra estrechamente relacionada con la demanda de oxígeno, definida como la cantidad estimada de materia orgánica, que incrementa durante el lavado, debido a la transferencia de materia orgánica a través de la tierra y exudado de los productos en fresco. Mientras más grande sea la carga de la materia orgánica, más rápido será el consumo de cloro, disminuyendo de esta manera el cloro que se encuentra disponible para entrar en contacto con los microorganismos durante el periodo de exposición. Esta rápida descomposición se debe a la reactividad con ciertas especies orgánicas, usualmente, el mecanismo por el cual se lleva a cabo la descomposición, es a través de la sustitución electrofílica, dependiendo de la estructura molecular de la molécula orgánica. Reacciones con dobles enlaces, alcoholes y cetonas son lentas, mientras que reacciones con aminas alifáticas, aminoácidos y péptidos son rápidas. Además el cloro puede reaccionar con varias especies inorgánicas presentes en el agua, como hierro reducido, arsénico y manganeso. Dado que en esta parte del estudio los vegetales se compraban en un

mercado popular, estos contenían suciedad y antes de ser sometidos al tratamiento de desinfección, estos no eran lavados previo a los tratamiento de desinfección, la carga de materia orgánica podría haber influido en gran manera en la efectividad de ambos agentes desinfectantes, por lo que ésta disminuyo (Gómez-López *et al.*, 2013; Van Haute *et al.*, 2013).

Tal y como Van Haute *et al.*, sugirieron en el 2013, el hecho de que los productos frescos analizados en esta investigación vinieran de origen con residuos de tierra y de materia orgánica, la efectividad del AEN y NaClO, también puede verse dificultada debido a que se adhieren a las partículas del material contaminante, por lo que la penetración del NaClO, puede verse incompleta.

La aplicación de agua electrolizada para la desinfección de frutas y hortalizas frescas ha sido oficialmente aprobada por las agencias de seguridad de alimentos del gobierno en Japón, República de Corea, y de Estados Unidos, con un límite de < 200 ppm de cloro total disponible (FDA, 2013, US EPA product regis n: 82341-1). La concentración de HOCl, el potencial de óxido-reducción (REDOX) y su efecto combinado son conocidos como los mayores contribuidores de la actividad antimicrobiana. Primero el redox, reacciona con la membrana celular dañando la membrana interna y externa e inactivando los mecanismos de defensa de los microorganismos. El HOCl, de esta manera, puede penetrar al interior de la célula y oxidarla. Un potencial >900 mV daña de manera directa e irreversiblemente la pared de la célula. Recientemente el uso del agua electrolizada neutra ha sido destacada debido a que es menos corrosivo con el equipo y causar menos deterioro en el producto que el agua electrolizada ácida (Issa-Zacharia *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2014)

El principal reto de esta investigación fue la comparación del grado de desinfección de las soluciones de NaOCl y la de AEN a diferentes concentraciones para los tres alimentos de empleaods, el aguacate, el tomate y el espárrago. Las limitaciones en la reducción de los microorganismos de la superficie del alimento de

las frutas y hortalizas, pueden estar relacionadas con la presencia de multicapas hidrofóbicas de la cutícula compuesta de cutina y moléculas de cera que cubren la epidermis de las frutas y hortalizas donde la cutícula es altamente repelente.

El espárrago y el aguacate, presentan superficies rugosas y porosas. Esta característica permite que las bacterias, migren al interior del tejido del fruto que los protege del agente desinfectante. Las bacterias suelen migrar a algunos puntos de difícil acceso, como estomas o tejido dañado, a los desinfectantes.

Una superficie lisa y suave como la del tomate permiten un mayor contacto entre las bacterias y el desinfectante, los resultados demostraron que hay una mayor desactivación de células comparada con las reducciones obtenidas en el aguacate y espárrago. Sin embargo, la no completa inactivación de las células bacterianas durante el proceso de desinfección puede ser atribuida al deficiente contacto entre las bacterias adheridas en la superficie del fruto y la solución desinfectante (Keskinen y Annous, 2011, San José y Vanetti, 2012, Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, 2013).

VII.4 Adhesión microbiana

Para este estudio, se escogió *Salmonella* y *L. monocytogenes* debido a las razones que se mencionarán mas adelante. *Salmonella* spp. una bacteria entérica involucrada en brotes a nivel mundial asociada al consumo de frutas y hortalizas frescas, causa síntomas de gastroenteritis y enfermedades crónicas. *Listeria monocytogenes* también puede contaminar las frutas y hortalizas, es un microorganismo psicrótrofo y ubicuo que causa listeriosis, una infección atípica con una alta tasa de fatalidad entre personas de la tercera edad, mujeres embarazadas e individuos inmunocomprometidos (Oliveira *et al*, 2011)

En México, *Salmonella* ha sido aislada de vegetales y frutas crudas como coliflor, pepinos, perejil, cilantro, lechuga, espinaca y pimiento. *Salmonella* y *S. Typhi* son endémicas de México, se han registrado 381, 320 casos de salmonelosis y se han reportado 139 000 casos de fiebre tifoidea entre 2009 y 2011. El aguacate, han sido vinculados a microorganismos patógenos como *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*, sobre todo debido a una contaminación en la cáscara que puede llegar a contaminar la parte comestible cuando es manipulada para la extracción de la pulpa (Rodríguez-García *et al.*, 2011).

Entre 1993 y 2004, once cargamentos de aguacate fueron retirados debido a la posible contaminación con *L. monocytogenes*. Los tomates, han sido asociados con más de 15 brotes de *Salmonella* entre 1990 y 2008. Hay muchos posibles puntos de contaminación de estos frutos con microorganismos patógenos durante la producción, desde el agua de irrigación, fertilizantes a base de estiércol y durante el proceso como el agua de lavado, el manejo de los trabajadores y el contacto con superficies contaminadas (Mahmoud, 2010, Rodríguez-García *et al.*, 2011; Secretaria de Salud, 2012; Bautista de León *et al.*, 2013, Forghani y Oh, 2013.).

VII.4.1 Adhesión de *Listeria monocytogenes* EGDe y *Listeria monocytogenes* Scott A así como *Salmonella Saintpaul*, *Salmonella Oraniemburg* y *Salmonella* E1 en la superficie de tomate y aguacate

La adhesión microbiana de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* en la superficie del tomate y del aguacate para su posterior tratamiento con las soluciones desinfectantes, se realizaron a través de un diseño experimental factorial 3^3 fraccionado (1/3) con tres factores (tiempo de incubación, agitación y tiempo de secado) y tres niveles (1, 3 y 5 minutos para el tiempo de incubación, 150, 300 y 500 rpm para la agitación y 1, 3 y 5 minutos para el tiempo de secado), el cual permitió conocer las condiciones ideales para favorecer la adhesión microbiana a la superficie del tomate.

Para el caso de la adhesión de *L. monocytogenes*, se partió de una suspensión microbiana de 8.61 Log UFC/mL, los resultados se muestran en la Cuadro 13, donde se observa que condiciones como 5 min de tiempo de incubación, 3 minutos de secado y 300 rpm como agitación, propician una mayor adhesión de *Listeria monocytogenes* en la superficie del alimento. Una condición de 5 min de incubación, 3 min de secado y 500 rpm de agitación permite una adhesión similar a la anterior, por lo que se proponen las condiciones para obtener una mayor adhesión del microorganismos a la superficie, esto es de una adhesión aproximada de 5 Log UFC/unidad. Los resultados permitieron observar el efecto antimicrobiano del agua electrolizada neutra.

Cuadro 13. Diseño factorial fraccionado (1/3) 3³ para lograr una mayor adhesión microbiana de *Listeria monocytogenes* en la superficie del tomate.

Tratamientos				
Tiempo de incubación (min)	Agitación (rpm)	Tiempo de secado (min)	Inóculo (Log UFC/mL)	Adhesión (Log UFC/unidad)
1	500	3	8.61±0.03	4.82±0.85 ^{ab}
3	150	3	8.61±0.03	4.75±0.30 ^{ab}
3	500	5	8.61±0.03	4.78±0.02 ^{ab}
5	500	1	8.61±0.03	5.43±0.01 ^a
5	300	3	8.61±0.03	5.15±0.39 ^{ab}
5	150	5	8.61±0.03	4.77±0.07 ^{ab}
1	300	5	8.61±0.03	4.07±0.75 ⁰
3	300	1	8.61±0.03	4.75±0.06 ^{ab}
1	150	1	8.61±0.03	5.59±0.18 ^{ab}

Adhesión microbiana (Log UFC/unidad) están reportadas como la media de las determinaciones por triplicado ± desviación estándar. ^{ab} Valores que no están conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes.

Cuadro 14. Análisis de varianza de los factores involucrados en la adherencia de *L.monocytogenes* en la superficie de tomate a temperatura ambiente (23±2°C).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Fc	Valor p
Modelo	6	2.18	0.36	4.53	0.0149
Error	11	0.88	0.08		
C. total	17	3.05			

Cuadro 15. Factores involucrados en la adherencia de *L.monocytogenes* en la superficie de tomate a temperatura ambiente (23±2°C).

Fuente de variación	DF	Suma de cuadrados	Fc	Prob>F
Tiempo de incubación	2	1.18	7.35	0.0094
Secado	2	0.55	3.48	0.067
Agitación	2	0.44	2.75	0.10

El análisis de varianza (Cuadro 14) indica que el modelo explica el efecto de los factores en la adhesión microbiana. El Cuadro 15 revela que el tiempo de incubación es significativo, lo que revela que ese factor afecta la adhesión microbiana en la superficie del alimento. El tiempo de secado y la agitación no son significativos.

Cuadro 16. Condiciones sugeridas para adhesión microbiana.

Tiempo de incubación (min)	Tiempo de secado (min)	Agitación (rpm)
5	1	500
5	3	300

Por otro lado, el análisis de interacciones indica que tiempos de incubación de 5 minutos permiten una mayor adhesión microbiana a la superficie del alimento,

así como también una agitación de 500 rpm; sin embargo, un tiempo de secado corto permite una mayor adhesión a la superficie en comparación de uno largo.

Los resultados obtenidos muestran que solo dos tratamientos fueron estadísticamente diferentes, esto son, la que permitió una mayor adhesión y la que se obtuvo una menor respuesta. Sin embargo, cabe destacar que entre los tratamientos que no fueron estadísticamente diferentes, la diferencia entre ellos en la población adherida a la superficie no fue mayor de 0.3 Log UFC/unidad y entre réplicas, los resultados no eran muy dispersos. El tratamiento que obtuvo una menor respuesta en la adhesión que corresponde a las siguientes condiciones; tiempo de incubación de 1 min, agitación de 300 rpm y un tiempo de secado de 5 min y los resultados entre las réplicas mostraban mucha dispersión. Por lo que a través del análisis estadístico se concluye que las condiciones ideales para permitir una mayor adhesión, esto es de 5.4 Log UFC/unidad a la superficie del alimento es: tiempo de incubación de 5 min con una agitación de 500 rpm y un tiempo de secado de 1 minuto (Cuadro 16).

Al igual que en la adhesión de *L. monocytogenes*, se inoculó *Salmonella* en la superficie del tomate usando un diseño experimental 3^3 fraccionado, con el objetivo de encontrar las condiciones ideales para favorecer una mayor adhesión del microorganismo patógeno en la superficie del tomate. El inóculo experimental fue de 8.37 Log UFC/mL, los resultados se muestran en la Cuadro 17.

Cuadro 17. Diseño factorial fraccionado $(1/3) 3^3$ para lograr una mayor adhesión microbiana de *Salmonella spp.* en la superficie del tomate.

Tratamientos				
Tiempo de incubación (min)	Agitación (rpm)	Tiempo de secado (min)	Inóculo (Log UFC/mL)	Adhesión (Log UFC/unidad)
1	500	3	8.37±0.04	5.30±0.02 ^a
3	150	3	8.37±0.04	5.43±0.11 ^a
3	500	5	8.37±0.04	5.29±0.02 ^a

5	500	1	8.37±0.04	5.38±0.01 ^a
5	300	3	8.37±0.04	5.17±0.11 ^a
5	150	5	8.37±0.04	5.21±0.04 ^a
1	300	5	8.37±0.04	5.25±0.23 ^a
3	300	1	8.37±0.04	5.28±0.06 ^a
1	150	1	8.37±0.04	5.33±0.09 ^a

Adhesión microbiana (Log UFC/unidad) están reportadas como la media de las determinaciones por triplicado ± desviación estándar.^aValores que no están conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes.

En el Cuadro 18 se muestra que el modelo es significativo, lo que indica que el modelo explica el efecto de los factores en la adhesión de *Salmonella* spp en la superficie del tomate. La prueba de efectos indica que los factores analizados no afectan la adhesión microbiana de la mezcla de *Salmonella* a la superficie del alimento, pues no son significativos, es decir, que independientemente del tiempo de incubación, agitación y tiempo de secado, la adhesión microbiana a la superficie del alimento será de aproximadamente 5.5 Log UFC/unidad (Cuadro 19)

Cuadro 18. Análisis de varianza de los factores involucrados en la adherencia de *Salmonella* spp en la superficie de tomate a temperatura ambiente (23±2°C).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Fc	Valor p
Error puro	44	286319.4	6507.26	0.97	0.5398
Error Total	45	301895	6708.78		

Cuadro 19. Factores involucrados en la adherencia de *Salmonella* spp en la superficie de tomate a temperatura ambiente (23±2°C).

Fuente de variación	DF	Suma de cuadrados	Fc	Prob>F
Tiempo de incubación	2	0.018	0.7852	0.48
Secado	2	0.02	0.8905	0.43
Agitación	2	0.032	1.44	0.277

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, lo que indica que el uso de cualquier tiempo de incubación, velocidad de agitación y tiempo de secado, se obtendrá una adhesión máxima de aproximadamente 5 Log UFC/unidad.

Para la adhesión de la mezcla de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*, en aguacate, se siguió la metodología descrita por Rodríguez-García *et al.*, (2011). Los resultados presentados en el Cuadro 20 indican que la adhesión de *Listeria monocytogenes* a la superficie del aguacate fue de 7.27 ± 0.07 Log UFC/cm² y la adhesión de *Salmonella* fue de 6.17 ± 0.53 Log UFC/cm².

Cuadro 20. Adhesión microbiana de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. en la superficie del aguacate.

Microorganismo	Adhesión (Log UFC/cm²)
<i>Listeria monocytogenes</i>	7.27 ± 0.07
<i>Salmonella</i>	6.17 ± 0.53

Adhesión microbiana (Log UFC/unidad) están reportadas como la media de las determinaciones por triplicado \pm desviación estándar.

La habilidad de los microorganismos patógenos de adherirse a un producto en fresco, como las frutas y hortalizas, depende de factores intrínsecos y extrínsecos incluyendo la movilidad de los microorganismos, su interacción con otros microorganismos y su capacidad para absorber nutrientes de la planta. Algunas cepas de bacterias colonizan de mejor manera las superficies de los alimentos que otras, es decir, que depende del tipo de microorganismos. La formación de biopelículas, tejidos dañados, especie de planta, así como el estado de madurez de la planta y su tasa de maduración influyen la persistencia y la adhesión de los microorganismos a la superficie de las frutas y hortalizas (López-Gálvez, *et al.*, 2009; Goodburn y Wallace, 2013)

Varios factores influyen la transferencia de bacterias a la superficie, incluyendo el tipo de superficie, especie bacteriana, nivel de humedad, tiempo de incubación. Pero la concentración microbiana desempeña un papel importante en muchos sistemas microbianos, como en la biosíntesis de antibióticos, regulación de bioluminiscencia, virulencia, entre otros. En un estudio realizado en el 2003, por Montville y Schaffner, se determinó que el tamaño de inóculo era un factor importante en la tasa de transferencia en la superficie de la lechuga, la cual se inoculó con una suspensión microbiana de una cepa no patógena de *Enterobacter aerogenes* con una población inicial de 9.37 Log UFC/unidad. Los resultados demostraron que existe una conexión estadísticamente significativa entre el tamaño de inóculo y la tasa de transferencia. Cuando el inóculo incrementa de tamaño, el número de bacterias permanece constante. Este mismo estudio sugiere que en el caso de bacterias como *E.coli* O157: H7, *Salmonella* Entérica y *L. monocytogenes*, la transferencia a la superficie aumenta proporcionalmente con el tamaño del inóculo.

Patel y Sharma (2010), estudiaron la adhesión de *Salmonella* a superficies dañadas e intactas de col y lechuga, el estudio se enfocó para entender las fases iniciales de adhesión a varios tejidos de plantas, para una intervención efectiva y proponer estrategias de mitigación. Se realizó una suspensión microbiana correspondiente a una población de 6 Log UFC/ml y se inocularon por inmersión a diferentes intervalos de tiempo (0, 1, 4 y 24 h). Los resultados indican que *Salmonella* se adhirió fuertemente a las superficies de los alimentos después de 5 min (Tiempo 0), adhiriéndose de 4.44 y 4.68 Log UFC/ cm² para col, lechuga, respectivamente. Sin embargo, *Salmonella* se adhirió en altos números preferentemente a superficies dañadas en todos los productos estudiados. La adhesión de *Salmonella* a la superficie de los alimentos después de 24 h fue de 5.10 y 5.84 Log UFC/cm². Estos resultados son similares a los realizados en esta investigación donde se encontró que la adhesión de *Salmonella* spp. era de 5.5 y 6.17 Log UFC/unidad para el tomate y el aguacate, respectivamente. En el caso del tomate, independientemente del tiempo de incubación se obtuvo una buena

adhesión, a pesar de que 5 minutos era el tiempo más prolongado, incluso, comparando nuestro estudio con el de Patel y Sharma, se obtienen una adhesión similar a la superficie a la que ellos obtuvieron después de 24 h. Los resultados encontrados en ambos estudios indican que una fuerte adhesión microbiana puede llevarse a cabo incluso con tiempos de contacto cortos, por ejemplo de 5 min, entre las bacterias y la superficie.

Un estudio realizado por Ells y Hansen (2006) con el género *Listeria* y sus etapas iniciales de adhesión a las superficies de alimentos, como la col. Se inocularon con una suspensión microbiana de 10^6 UFC/mL en diferentes intervalos de tiempo (0, 1, 4 y 24 h). Se encontró que la adhesión de *Listeria* spp. en la superficie del alimento fue de 1 Log UFC/cm² a los 5 min y a las 24 h se observó una adhesión de 6.5 UFC/cm², resultados similares se obtuvieron en este estudio pero a tiempos de incubación de 5 min en el tomate y 1 h en el aguacate. Cabe destacar, que números significativos de *Listeria monocytogenes* se adhieren dentro de 5 min de contacto a la superficie de los alimentos. De esta manera, se demostró que *L. monocytogenes* se adhiere de manera eficiente a la superficie de varios tipos de alimentos en tiempos cortos. Otros estudios, reportan que de 2-3 Log UFC/g de *Listeria monocytogenes* se adhiere en los primeros 5 min. Se ha observado que las células bacterianas se adsorben rápidamente en la superficie de los alimentos, por ejemplo, en el caso de la papa, durante tiempos tan cortos como de 5 min.

VII.5 Efecto del agua electrolizada neutra e hipoclorito de sodio sobre *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp.

VII.5.1 Células libres

El efecto del AEN en la inactivación de células libres de *L. monocytogenes* se evaluó usando diferentes concentraciones de cloro total disponible en el AEN y NaClO (0, 5, 7, 9 y 12 ppm) a distintos tiempos de contacto (0, 1, 3 y 5 minutos). Partiendo de un inóculo experimental de 9.8 Log UFC/mL, se realizó el tratamiento

con agua destilada como tratamiento control, es decir, 0 ppm de cloro total disponible logrando disminuir aproximadamente 1 Log, el uso de una concentración de 5 y 7 ppm por un minuto logran disminuir 5 Log de la población inicial; sin embargo, un tratamiento de 5 ppm después de 3 y 5 minutos solo reducen la población microbiana en alrededor de 3 Log, mientras que el uso de 7 ppm por un tiempo de exposición de 3 minutos logra disminuir la población hasta niveles no detectables, mientras que en tiempos de exposición de 5 minutos se alcanzan reducciones mayores a 3 Log. Se observa también, que los tratamientos con NaClO sobre las células libres de *Listeria* spp tienen poco efecto en su inactivación cuando son tratados a concentraciones bajas (5-12 ppm) incluso con tiempos de contacto que van desde 1 a 5 min, en comparación con el AEN, la inactivación de las células libres se alcanza a 9 ppm con tiempos de contacto de 1 min., sin embargo, estadísticamente, no hay diferencias significativas entre el uso de esta concentración si se usa a tiempos de contacto de 1 a 5 min, mientras que para el NaClO, se alcanza un efecto similar usando 10 veces la concentración de AEN (90 ppm) y triplicando el tiempo de contacto (3 min). Se observa que las mayores reducciones en la población de *Listeria* spp. se lograron al usar concentraciones mayores a 7 ppm, esto es, a 9 y 12 ppm usando cualquier tiempo de exposición, ya sea, 1, 3 y 5 minutos. Se observó un efecto letal en las células bajo estas concentraciones, logrando reducir la población inicial hasta niveles no detectables. Mientras que el uso de concentraciones de 5-12 ppm, no existe un efecto significativo, pues la población de *Listeria* spp. permaneció constante durante el tratamiento independientemente del tiempo de contacto con el desinfectante. Un efecto letal del NaClO en las células bacterianas, se observó con el uso de concentraciones de 90 ppm a partir de un minuto de contacto. Mientras a concentraciones por debajo de estas, el efecto no es letal, las reducciones máximas alcanzadas bajo estas condiciones es de aproximadamente 6 Log UFC/mL (Cuadro 21).

Cuadro 21. Células sobrevivientes de *Listeria* spp. después de tratamientos con AEN y NaClO a varias concentraciones y tiempos de contacto.

Células sobrevivientes (Log UFC/mL)			
Tiempo (min)	Concentración (ppm)	AEN	NaClO
1	0	8.33±0.015 ^a	9.35±0.043 ^a
	5	4.80±0.089 ^{bc}	>8 ^g
	7	4.56±0.211 ^b	>8 ^g
	9	N.D ^g	>8 ^g
	12	N.D ^g	>8 ^g
	50	N.D ^g	2.7 ^e
	70	N.D ^g	2.7 ^e
	90	N.D ^g	N.D ^f
3	0	8.22±0.055 ^a	9.33±0.031 ^a
	5	5.98±0.048 ^c	>8 ^g
	7	N.D ^g	>8 ^g
	9	N.D ^g	>8 ^g
	12	N.D ^g	>8 ^g
	50	N.D ^g	3.86±0.275 ^d
	70	N.D ^g	2.7 ^e
	90	N.D ^g	N.D ^f
5	0	8.32±0.035 ^a	9.10±0.053 ^a
	5	6.13±0.049 ^d	>8 ^g
	7	6.16±0.068 ^e	>8 ^g
	9	N.D ^g	>8 ^g
	12	N.D ^g	>8 ^g
	50	N.D ^g	5.25±0.043 ^b
	70	N.D ^g	5±0.235 ^c
	90	N.D ^g	N.D ^f

Células sobrevivientes (Log UFC/unidad) están reportadas como la media de las determinaciones por triplicado ± desviación estándar.^{a-g} Valores que no están conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes. N. D. No Detectable (Miles-Misra < 1.7 Log UFC/mL)

Con un inóculo inicial de aproximadamente 10 Log UFC/mL, de *Salmonella* spp., el Cuadro 22 indica las células sobrevivientes después del tratamiento realizado para su inactivación a diferentes concentraciones y tiempos de exposición de dos diferentes desinfectantes, AEN y NaClO.

Se aprecia que el tratamiento con agua destilada (0 ppm) logra reducir 2 Log UFC/mL, y que la aplicación de concentraciones de 9 ppm de AEN y con tiempos de contacto cortos, la población del microorganismo patógeno se reduce hasta niveles no detectables (<1.7 Log UFC/mL, por la técnica de Miles-Misra). Para el caso de NaClO, aplicar el tratamiento a una concentración de 90 ppm en tiempos de contacto de 5 min logra la inactivación de las células hasta niveles no detectables. El Cuadro 22 muestra el comportamiento de *Salmonella* spp. durante el periodo que tarda los tratamiento, encontrándose que la aplicación de 12 ppm inactiva las células bacterianas, independiente del tiempo de contacto, sin embargo, es preferible el uso de tiempos cortos. El uso de 5 ppm, disminuye hasta 2 Log UFC/mL.

Cuadro 22. Células sobrevivientes de *Salmonella* spp. después de tratamientos con AEN y NaClO a varias concentraciones y tiempos de contacto

		Células sobrevivientes (Log UFC/mL)	
Tiempo (min)	Concentración (ppm)	AEN	NaClO
1	0	8.13±0.078 ^a	9.35±0.033 ^a
	5	5.24±0.037 ^d	>8 ^h
	7	5.21±0.015 ^d	>8 ^h
	9	5.14±0.046 ^d	>8 ^h
	12	N.D ^e	>8 ^h
	50	N.D ^e	4.28±0.026 ^{cd}
	70	N.D ^e	4.25±0.336 ^d
	90	N.D ^e	N.D ^g
3	0	8.18±0.01 ^a	9.26±0.047 ^a
	5	6.13±0.04 ^b	>8 ^h

	7	N.D ^e	>8 ^h
	9	N.D ^e	>8 ^h
	12	N.D ^e	>8 ^h
	50	N.D ^e	4.62±0.128 ^{cd}
	70	N.D ^e	3.51±0.130 ^e
	90	N.D ^e	2.69±0.01 ^f
5	0	8.32±0.044 ^a	9.33±0.075 ^a
	5	6.07±0.191 ^{bc}	>8 ^h
	7	6.09±0.0205 ^c	>8 ^h
	9	N.D ^e	>8 ^h
	12	N.D ^e	>8 ^h
	50	N.D ^e	5.63±0.018 ^b
	70	N.D ^e	5.075±0.502 ^c
	90	N.D ^e	N.D ^g

Células sobrevivientes (Log UFC/unidad) están reportadas como la media de las determinaciones por triplicado ± desviación estándar.^{a-h} Valores que no están conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes. N. D. No Detectable (Miles-Misra < 1.7 Log UFC/mL).

Con respecto a los tratamientos con NaClO, el Cuadro 22, se aprecia que concentraciones pequeñas, que van de un rango de 5-12 ppm, no presentan un efecto antimicrobiano, al no encontrarse disminuciones en la carga inicial de *Salmonella* spp. El aumento de las concentraciones, aumenta las reducciones en la población adherida, sin embargo, concentraciones de 50 y 70 ppm, no reduce la población hasta niveles no detectables. No es hasta que el aumento de la concentración a 90 ppm cuando se presenta la reducción de la población hasta niveles no detectables, pero también el aumento del tiempo de contacto permite este efecto.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, se procedió a determinar la concentración bactericida (CB) de AEN y NaClO para la inactivación de células libres de *Listeria* spp. y *Salmonella* spp. En las Figuras anteriores se muestra que la disminución en la población de *Listeria* spp. y *Salmonella* spp. se ve favorecida por el aumento en la concentración y en algunos caso del aumento en el tiempo de

contacto de AEN y de NaClO. Se estableció que una concentración de 9 ppm de cloro libre total en el AEN a 1 min de contacto corresponde a la CB para la inactivación de células libres de *Listeria* y para el NaClO, la CB se encontró a 90 ppm en un tiempo de contacto de 3 min. Para el caso de *Salmonella* spp. se estableció la CB para el AEN en 12 ppm por un tiempo de contacto de 1 min y para el NaClO, 90 ppm por un tiempo de contacto de 5 min (Cuadro 23).

Cuadro 23. Concentración bactericida de AEN y NaClO en células en estado libre de *Listeria* spp. y *Salmonella* spp.

Microorganismo	Tratamiento	
	AEN	NaClO
<i>Listeria</i> spp.	9 ppm/1 min	90 ppm/3 min
<i>Salmonella</i> spp.	9 ppm/1, 5 min	90 ppm/5 min

Las consideraciones tomadas en las estrategias de desinfección es el control de la subpoblación microbiana más resistente a los tratamientos de desinfección, es decir, la destrucción de la mayoría de los microorganismos más resistentes, para lo que se necesita el uso de tiempos de contacto y concentraciones del desinfectante para alcanzar la completa destrucción o eliminación.

En el 2008, CDC, realizó una guía titulada “Guía para la desinfección y esterilización en lugares para tratamientos de la salud”, donde se discute la resistencia de los microorganismos a agentes desinfectantes. Los diferentes tipos de microorganismos varían en su respuesta a los desinfectantes, debido a la diferencia en su estructura celular, composición y fisiología. De acuerdo, con estas diferencias, las bacterias Gram negativas son mas resistentes que las Gram +.

Los resultados obtenidos en esta investigación indican que *Salmonella* spp. resulto ser más resistente que *Listeria* spp. esto al ver que para la eliminación o inactivación hasta niveles no detectables, se requiere de mayor concentración para

el caso de la solución de NaClO, o aumentar el tiempo de contacto del agente desinfectante con las bacterias para el caso de AEN.

Gómez-López, en el 2013, realizaron un experimento en la que desactivaron células de *Escherichia coli* O157:H7 a través de electrolisis. Los resultados obtenidos muestran que las curvas de inactivación exhiben un patrón sigmoidal. En la primera parte de la curva, se da la inactivación más grande. También se observa una etapa denominada “hombro” que indica que el daño infringido a las células microbianas durante el tiempo de tratamiento no ha sido el suficiente para causar la inactivación, esta parte de la curva no existe si el daño fuera lo suficientemente grande para causar la inactivación completa. Curvas similares se obtienen en nuestra investigación en los tratamientos de inactivación de células de *Listeria* spp. y *Salmonella* spp. usando las dos soluciones desinfectantes (AEN y NaClO), concentraciones bajas de 5 a 7 ppm para el AEN independientemente del tiempo de contacto, no causa el suficiente daño para inactivar a las células bacterianas. Y en el caso de NaClO, concentraciones menores a 70 ppm, se observa un efecto similar.

En un estudio realizado por Fux, *et al.* (2005) demostraron que las bacterias se adaptan rápidamente al estrés del medio logrando adaptarse a dichas condiciones. Por otro lado, Saha *et al.* (2009), indican que las bacterias son capaces de adaptarse rápidamente a las condiciones nuevas ambientales como la presencia de un antimicrobiano, y como consecuencia, incrementar la resistencia. La susceptibilidad a un germicida varía entre microorganismos; algunos pueden ser inactivados desde el primer contacto con el germicida y otros pueden sobrevivir y desarrollar resistencia a los germicidas. Estos resultados sugieren que el efecto antimicrobiano de los desinfectantes no solo son dependientes de los distintos tipos de desinfectante sino también de la concentración. Nuestros resultados al igual que los obtenidos por Saha (2009) demuestran que algunos desinfectantes a concentraciones bajas pueden ser bactericidas y bacteriostáticos, se confirma el hallazgo observado con el uso de concentraciones bajas.

Daved y O'Toole (2000) mencionaron que debido a que las bacterias adheridas y las que se encuentran en forma de biopelícula, les brinda características especiales a las bacterias que se encuentran en esta forma un microorganismo asociado a ésta es 100 a 1000 veces más resistente a los desinfectantes que las formas libres. La industria ha reconocido que los microorganismos que se encuentran adheridos a una superficie son más resistentes a los desinfectantes que los que se encuentran en suspensión, debido a que las bacterias en forma libre en comparación con las biopelículas no se encuentran protegidas por el exopolímero, éstas se encuentran más expuestas a las sustancias oxidantes presentes en el AEN (HClO , ClO^- , ClO_2 y O_3).

En un estudio realizado por Yang *et al.* (2013), se realizaron estudios en células en suspensión o en células libres de *E.coli* O157:H7, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* con el objetivo de investigar el efecto de distintos desinfectantes y evaluar la efectividad de estos mismos en la inactivación de estos microorganismos patógenos. Los desinfectantes probados incluían agua electrolizada con una concentración de cloro total disponible de 50 ppm (mg/L), encontrándose que bajo esta condición y con un tiempo de contacto de 30s, se logra una reducción de las células suspendidas de *E. coli* de al menos 5 Log UFC/mL. La prueba también se realizó con una concentración mayor, esta fue de 100 ppm, no se detectaron células sobrevivientes. Para las células de *Salmonella*, la exposición con una concentración de 50 ppm logra la reducción de 3 Log UFC/mL y con 100 ppm, no se detectaron sobrevivientes. *Listeria monocytogenes*, fue susceptible a ambas concentraciones de agua electrolizada, causando reducciones mayores a los 5 Log UFC/mL. Nuestros resultados, el uso de concentraciones mucho menores, tiene un efecto similar al disminuir mas de 5 Log UFC/mL y también se revela que *Listeria monocytogenes* resultó ser más sensible que *Salmonella*, pues requiere de un tiempo más corto para inactivarse.

López-Galvéz *et al.*(2009), seleccionaron las dosis efectivas de cuatro agentes desinfectantes comerciales, entre ellos el NaClO, basadas en su capacidad para eliminar *Escherichia coli*. Las concentraciones usadas de NaClO fueron 10, 20, 40 y 60 ppm. Se encontró que concentraciones de 40 y 60 ppm redujeron la población del microorganismo patógeno hasta niveles no detectables (inóculo inicial de 10^5 UFC/mL).

En el 2008, Abadías *et al.*, realizaron un ensayo en células libres de *E.coli*, *Salmonella* y *Listeria* con una población inicial de 8 Log. Para su inactivación usaron AEN con una concentración de cloro libre total de 281 ppm, pH de 8.74 y un ORP de 721 mV. Los resultados indicaron que a una concentración de 48 ppm por 1 minuto de contacto se logra una reducción de más de 5 Log UFC/cm² para todos los patógenos. Para el caso del NaClO, una concentración de 118 ppm logra un efecto similar, es decir, inactiva > 5 Log UFC/ ml.

Los resultados anteriores y los reportados por la literatura, demuestran que el uso de concentraciones pequeñas son capaces de inactivar las células libres de microorganismos patógenos. El estudio de López-Galvéz *et al.* también demuestran que *L. monocytogenes* resulto ser el microorganismos más sensibles que las bacterias Gram negativos que fueron objeto de estudio, y que esta diferencia en tiempos de contacto entre la bacteria y el agente desinfectante, puede ser debida a la diferencia que hay entre la composición de la membrana celular, permitiendo que las bacterias Gram negativas sean más resistentes que las bacterias Gram positivas, pues son menos permeables a los agentes desinfectantes.

VII.6 Efecto antimicrobiano del AEN y NaClO en la población adherida de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes* en la superficie de tomates y aguacate.

Los resultados obtenidos anteriormente con respecto a la reducción de la microflora de los alimentos modelos y la información obtenida con las concentraciones usadas para inactivar células libres y la determinación de los antimicrobianos AEN y NaClO en la inactivación de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes*, permitieron saber que concentración usar para la reducción de microorganismos patógenos adheridos a la superficie del alimento.

Soni *et al.* (2010), reportan que la concentración requerida en un alimento comparado con un medio de cultivo suele ser de 2 a 100 veces más grande que la determinada en el concentración mínima bactericida (MIC). Esto brinda una perspectiva sobre la concentración a usar en el tomate y el aguacate para reducir la carga de microorganismos patógenos. Sin embargo, es sumamente importante recordar que la aplicación de agua electrolizada para la desinfección de frutas y hortalizas frescas puede ser aplicada con un límite de < 200 ppm de cloro total disponible y con respecto al hipoclorito de sodio, éste debe ser usado a una concentración de 50-200 ppm de cloro total disponible, con un tiempo de contacto con los productos en fresco de menos de 1 min.

Tomando en cuenta a lo indicado por la EPA, se decidió usar la concentración de 200 pm de cloro total disponible de AEN contra 200 ppm de cloro total disponible de NaClO, debido a que se ha establecido que un tratamiento que reduzca la carga microbiana en 2 Log sea significativo y que cualquier desinfectante nuevo o cualquier método presentado deberá compararse con 200 mg/L de cloro como estandar de eficiencia (WHO, 1998, FDA, 2013, US EPA product regis n: 82341-1, San José y Vanetti, 2012).

Debido a las razones anteriores, los retos microbianos que se presentan a continuación se realizaron con una concentración de 200 ppm del AEN con un tiempo de contacto de 1 min para compararse con el efecto producido por una solución de NaClO a esas mismas condiciones.

Una población inicial adherida de aproximadamente 5 Log UFC/unidad de *L. monocytogenes* spp. en la superficie del tomate, fue sometida a un proceso de desinfección con el objetivo de disminuir la carga microbiana inicial. La Figura 15 muestra el efecto del AEN y del NaClO, así como el efecto del lavado en la inactivación del patógeno. Los resultados indican que no hay diferencias significativas en el efecto antimicrobiano del AEN y del NaClO ($p > 0.05$). Ambos tratamientos inactivan aproximadamente 3 Log UFC/unidad del microorganismo patógeno. El tratamiento control, agua destilada, utilizado para inactivar *L. monocytogenes* en la superficie del tomate representa el lavado, etapa de gran importancia que logra reducir cerca de 1.5 Log UFC/unidad del microorganismos patógeno adherido a la superficie del alimento.

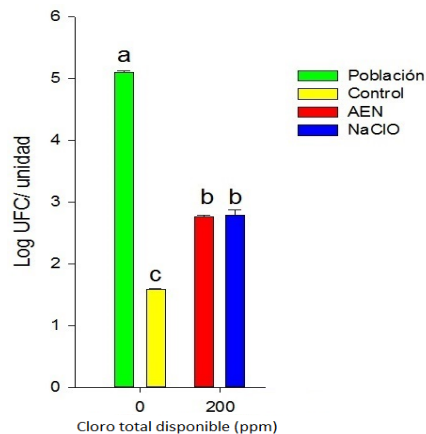


Figura 15. Número de ciclos logarítmicos reducidos en la cuenta inicial de *Listeria monocytogenes* adherida a la superficie del tomate con tratamientos de AEN y NaClO (200 ppm) con tiempos de contacto de 1 minuto. ^{a-c}Diferentes letras arriba de las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). Las barras verticales representan la desviación estándar

La siguiente Figura 16, presenta el efecto del AEN y del NaClO en la población adherida de *Salmonella* (5.4 Log UFC/unidad), al igual que en caso anterior, los tratamientos con ambos antimicrobianos no presentan una diferencia significativa entre ellos, las reducciones obtenidas para ambos tratamientos resultan en 2 Log UFC/unidad. Para el caso del control con agua destilada, la disminución lograda es menos de 1 Log UFC/unidad del microorganismo patógeno.

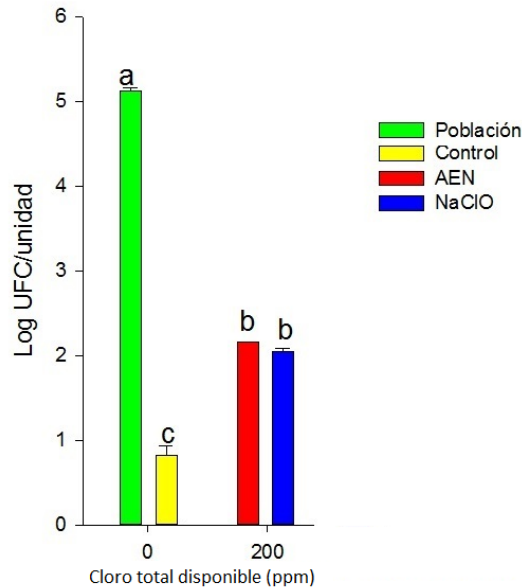


Figura 16. Número de ciclos logarítmicos reducidos en la cuenta inicial de *Salmonella* spp. adherida a la superficie del tomate con tratamientos de AEN y NaClO (200 ppm) con tiempos de contacto de 1 minuto. ^{a-c}Diferentes letras arriba de las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). Las barras verticales representan la desviación estándar

El reto microbiano para determinar el efecto del AEN y NaClO, se realizó de igual manera en una superficie que presentó pliegues y rugosidades. Para esto, se inocularon aguacates y la concentración usada fue de 200 ppm para ambos desinfectantes con un tiempo de contacto de 1 min. Los resultados se presentan a continuación.

Debido a las características de la superficie del aguacate, la adhesión lograda fue mayor que la obtenida en el tomate. Para el caso de *L. monocytogenes*, la población adherida fue de 7.27 Log UFC/cm². El efecto en la reducción de la población de los dos antimicrobianos indican que no hay diferencias significativas ($p>0.05$), ambos antimicrobianos alcanzan reducciones similares de aproximadamente 2.5 Log UFC/cm². Por otro lado, el lavado no logra reducir 1 Log UFC/cm² (Figura 17).

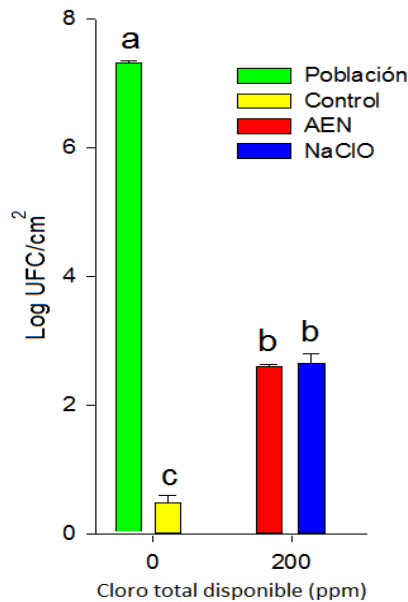


Figura 17. Número de ciclos logarítmicos reducidos en la cuenta inicial de *L. monocytogenes* adherido a la superficie del aguacate con tratamientos de AEN y NaClO (200 ppm) con tiempos de contacto de 1 minuto. ^{a-c}Diferentes letras arriba de las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p\leq 0.05$). Las barras verticales representan la desviación estándar

Para el caso de *Salmonella* spp. la población adherida a la superficie del aguacate fue de 6.17 Log UFC/cm², para estos tratamiento, el AEN resulto ser más eficaz al reducir la carga microbiana de *Salmonella* spp, en comparación con el NaClO, ambos efectos antimicrobianos son estadísticamente diferentes. El control, indica que con sólo el lavado se reduce la población en menos de 1 Log UFC/cm² (Figura 18).

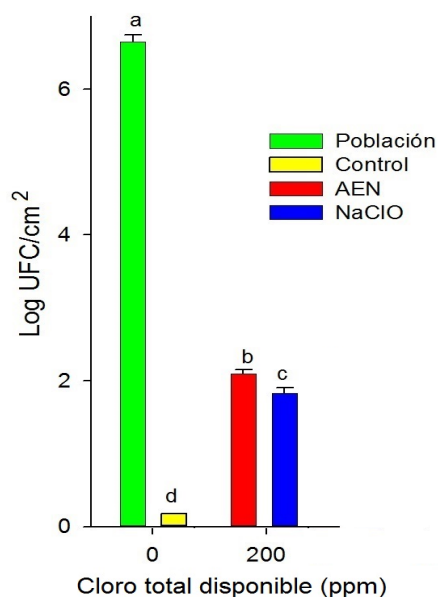


Figura 18. Número de ciclos logarítmicos reducidos en la cuenta inicial de *Salmonella* spp adherida a la superficie del aguacate con tratamientos de AEN y NaClO (200 ppm) con tiempos de contacto de 1 minuto. ^{a-c}Diferentes letras arriba de las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). Las barras verticales representan la desviación estándar

De acuerdo con algunos estudios, se ha reportado que a pesar de que el lavado es una etapa importante, debido a que remueve la suciedad y remueve algunos microorganismos de la superficie del producto, no logra removerlos completamente y sobre todo inactivarlos. Se ha reportado que la sola etapa de lavado muestra reducciones insignificantes de las bacterias adheridas en la superficie e incluso pueden lograr hasta una reducción máxima de 2 Log, es decir, puede remover hasta cierto grado los microorganismos de la superficie de los alimentos (Ruiz-Cruz *et al.*, 2007; Issa-Zacharia *et al.*, 2011; Rodríguez-García *et al.*, 2011; Francis *et al.*, 2012; Van Haute *et al.*, 2013).

Nuestros resultados sobre la etapa de lavado se encuentran en conformidad con lo reportado, pues las reducciones logradas dependen del tipo de producto, por ejemplo, para el caso del aguacate las reducciones alcanzadas fueron mínimas, 0.6

y 0.17 Log UFC/cm² para *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp, respectivamente. Y en el tomate las reducciones fueron mucho mayores que las que se obtuvieron en el aguacate, 1.8 y 1.9 Log UFC/unidad, para *Salmonella* y *L. monocytogenes*, respectivamente. Dos de los factores más importantes que afectan el grado de desinfección de los antimicrobianos es la rugosidad de la superficie de los alimentos y el tipo de microorganismos, pues *Salmonella* resultó ser más resistente a los retos con los desinfectantes que *L. monocytogenes* y esto se ve reflejado, pues en ambas superficies, una lisa representada por el tomate y una con pliegues y rugosidades que representó el aguacate, y aunque en el aguacate las reducciones fueron más pequeñas que las obtenidas en el tomate, las tendencias fueron las mismas. Sin embargo, a pesar de los resultados obtenidos, cabe señalar que el proceso de lavado aplicado a los productos en fresco tienen el potencial de reducir la contaminación de la superficie del producto.

Tomás-Callejas *et al.*, (2012) realizaron un estudio cuyo objetivo fue evaluar el proceso de desinfección y remoción de microorganismo patógenos (*Salmonella* y *E. coli* O157:H7) adheridos a la superficie del rábano con una solución de NaClO con una concentración de 6%. Para el caso de la reducción de *Salmonella*, el lavado con el desinfectante, alcanzó una reducción de 1.5 Log UFC/g y para *E. coli* la reducción fue de 2.80 Log UFC/unidad.

Bari *et al.*, (2003) evaluaron la efectividad del NaClO bajo la misma concentración (200 ppm) con tiempos de contacto de 1 min, sobre la inactivación de *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis y *L. monocytogenes* en la superficie del tomate. De una población adherida de 7.85 Log UFC/unidad de *E. coli*, se logró una reducción de 4.31 Log UFC/unidad. Para el caso de *Salmonella*, la población inicial adherida fue de 7.36 Lo UFC/unidad y el tratamiento logró inactivar 4.54 Log UFC/unidad. Los resultados para determinar la efectividad del sanitizante en la eliminación de *L. monocytogenes* indican que el uso de NaClO a una concentración de 200 ppm con un tiempo de contacto de 1 min, inactivaron 2.54 Log UFC/unidad. Al igual que este estudio, la investigación de los tratamientos de desinfección con

NaClO se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones (200 ppm, y con un tiempo de contacto de 1 min) sobre la superficie del tomate y sobre todo de la inactivación de *Salmonella* y *L. monocytogenes*, aunque la adhesión es menor que la reportada por estos investigadores, las reducciones fueron mayor a los 3 Log UFC/unidad. Los resultados de ambas investigaciones dejan en claro que los tratamientos de desinfección no logran inactivar completamente a los microorganismos adheridos a la superficie,

Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, en el 2013, realizaron un estudio en la que escogieron tres diferentes productos en fresco para estudiar el grado de desinfección, escogiendo por lo tanto, una lechuga que representaba los productos que son hojas verdes, un tomate que representa una superficie suave y lisa y una zanahoria que representaba una superficie porosa. Estos productos fueron inoculados con *E.coli* y desinfectados con soluciones de diferentes concentraciones NaClO (50, 100 y 200 ppm). Los resultados obtenidos indican que a una concentración de 100 ppm con un tiempo de contacto de 15 min. logró inactivar 3.5 Log de *E.coli*, adherida a la superficie de la lechuga y la inactivación completa en el tomate se logró a una concentración de 200 ppm con un tiempo de contacto de 15 min y para el caso de la zanahoria, una reducción de 3.5 Log se alcanzó a los 15 min con una concentración de 200 ppm. Estos resultados dejan en claro, que para obtener reducciones mayores a 3 Log UFC/ unidad, los tratamientos deben tener una duración de al menos 15 min. En la investigación presente, tiempos de contacto de 1 min, se logran reducciones de 3 Log UFC/unidad para *L. monocytogenes*, el microorganismo que resulto tener menor resistencia.

Cabe destacar que de acuerdo con algunos reportes, se ha indicado que el lavado con agua con NaClO de los productos en fresco reduce menos de 2 Log o en algunos casos las reducciones no alcanzan siquiera el 1 Log. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación dejan en claro que la efectividad del desinfectante dependerá del método de inoculación (inmersión, gotas) la

concentración de la solución desinfectante, tiempo de contacto, la topografía del alimento y la bacteria que es objeto de eliminación.

Es bien sabido que el NaClO es mucho más efectivo para la inactivación de microorganismos patógenos que se encuentran en suspensión en agua que remover los microorganismos de la superficie del producto y esto se comprobó con los resultados obtenidos en la sección de efecto de AEN y NaClO en células libres, donde las concentraciones de 90 ppm con tiempo de contacto de 1 min son aproximadamente 2.2 veces más pequeñas que las requeridas para inactivar células adheridas a una superficie, donde puede existir desde interacciones célula-alimento, hasta anclaje de flagelos o producción de exopolisacáridos. En algunos estudios las reducciones obtenidas con el NaClO son equivalentes a las obtenidas con el tratamiento de lavado con agua. En general, este desinfectante es usado a muy altas concentraciones para tener una alta tasa de inactivación, porque a estas concentraciones, es difícil para los microorganismos sobrevivir. Pero, el uso de altas concentraciones incrementa el riesgo de formación de productos potencialmente peligrosos o la producción de sabores y olores extraño. Sin embargo, los microorganismos que sobrevivan a este tratamiento a bajas concentraciones, puede no causarle el suficiente daño para lograr inactivarlos, por lo que estas células pueden reparar el daño y recuperarse. Esto es una apreciación de un daño subletal (Keskinen y Annous, 2011; Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, 2013; Van Haute *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos sugieren que, de acuerdo con Van Haute *et al.*, (2013) la efectividad antimicrobiana del NaClO puede ser afectada por el estado fisiológico de los microorganismos, afectando el sistema respiratorio y el transporte activo de glucosa y aminoácidos. La destrucción de la membrana o la pérdida de la integridad de la pared celular no es necesaria, en realidad, la principal acción del HClO, no es la superficie celular sino el interior de la célula. La diferencia en resistencia entre *L. monocytogenes* y *Salmonella* puede ser dependiente, principalmente, de la diferencia en la resistencia a la transferencia de masa del

cloro a través de la capa de la superficie, es decir, en el grosor de la capa de peptidoglicano debido a la diferencia en el espacio de las capas así como la diferencia en la composición de la membrana celular de las bacterias. Debido a estas razones presentadas. Los tratamientos con cloro incrementan la permeabilidad de la célula. Además el ácido hipocloroso (HClO) tiene una alta actividad antimicrobiana y tiene una alta habilidad de difusión a través de la membrana si se compara con el ión hipoclorito (OCl⁻).

Park, *et al.*, (2009), reportan que el agua electrolizada ácida con una concentración de 37.5 ppm, pH 2.06, tiene una fuerte actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, y *L. monocytogenes*, después de un tratamiento de 15s, 30 s, 1, 3 y 5 min las reducciones de los tres microorganismos patógenos hasta debajo del nivel de detección, esto equivale a una reducción >5 Log UFC/g cuando estos están inoculados en cebollas y tomates. Los resultados que esta investigación obtuvo, los tratamientos de desinfección fueron por 1, 3 y 5 min con AEN, sobre poblaciones adheridas de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en dos superficies con rugosidades distintas, aguacate y tomate. Las reducciones no alcanzaron los 5 Log UFC/unidad con el uso de concentraciones de 200 ppm. Las diferencias entre estas investigaciones es el tipo de agua electrolizada utilizada, mientras que el agua electrolizada ácida, el pH, desempeña un papel importante en la desestabilización de la membrana celular permitiendo el paso del HClO al interior de la célula, el AEN con un pH neutro, y un potencial REDOX y un gran contenido de cloro total disponible, permite que éste puede ser usado en superficies de alimentos controlando de esta manera la calidad microbiológica, sin dejar de lado la calidad organoléptica del alimento.

En un estudio realizado por Rodríguez-García *et al.*, (2011), reportaron reducciones de aproximadamente 2 Log UFC/cm², de *L. monocytogenes* inoculado en aguacate al ser lavados con agua destilada. El uso de AEN con una concentración de 75 ppm y con un tiempo de contacto de 90 s, se observaron reducciones de 4.9 Log UFC/cm², y con respecto al uso de NaClO con la misma

concentración que el AEN y usado el mismo tiempo, no se observaron reducciones significativas con respecto al lavado con agua destilada. En el caso de *Salmonella*, la reducción causada por el AEN fue de 4.2 Log UFC/cm², y para el hipoclorito tampoco se observaron reducciones significativas a las observadas con el agua destilada. En la investigación presente los resultados obtenidos con los dos agentes antimicrobianos, indican que las reducciones observadas en la población de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* adheridos en la superficie del tomate y del aguacate, indican que pueden ser un efecto antimicrobiano real de estos sanitizantes y no solamente debido al efecto del solo lavado con agua destilada, tal y como destaca, Rodríguez-García *et al.*

De acuerdo con Abadias *et al.*, 2008 no hay diferencias significativas en la eficiencia entre la aplicación de AEN a 89 ppm y NaClO a 100 ppm en la reducción de *Listeria monocytogenes* en la superficie de la lechuga. Los resultados obtenidos en este estudio, al igual que los obtenidos en el nuestro, muestra que la eficiencia entre ambos sanitizantes son similares y tienen una actividad desinfectante equivalente. Por lo que esto da pauta para que el AEN pueda ser utilizado como una alternativa al uso de NaClO en la industria de productos en fresco.

Por otro lado, Issa-Zacharia, uso agua electrolizada ligeramente ácida (AEac) y el uso de 20 ppm durante 5 minutos, logró disminuir 1.68 Log UFC/cm² de una población original de 8 Log UFC/cm² de *Salmonella* inoculadas en fresa.

Las diferencias en las reducciones obtenidas entre el tomate y aguacate en este estudio y los reportados en otros vegetales y frutos por otros autores, pueden ser atribuidos a las diferencias entre métodos de inoculación (inmersión y por gota) y la preparación de las muestras y el método de la aplicación de las soluciones sanitizantes, así como también el tipo de alimento a desinfectar. Algunos reportes indican, que los tratamientos son más efectivos cuando la inoculación se realiza por gota que por inmersión, ya que, las bacterias pueden penetrar más fácil en las

irregularidades del alimento cuando la inoculación se realiza por inmersión (Abadias *et al.*, 2008; García *et al.*, 2011).

Xiong *et al.*, 2010, reportan que el uso de AEN como agente antimicrobiano, es eficiente debido al daño que sufren las estructuras funcionales en las células. Los radicales libres OH[·], atacan la membrana celular y destruyen la morfología por lo que ésta se vuelve permeable, lo que causa la fuga de iones como K⁺ y Mg²⁺. Por lo que se puede concluir que una ventaja de la desinfección electroquímica, como el uso de AEN, es que el daño producido en las células bacterianas es más severo que el producido por la desinfección química con el NaClO (Virto *et al.*, 2005)

Varios factores pueden afectar la efectividad del agua electrolizada. En los productos en fresco, los sanitizantes se usan en presencia de materia orgánica (aminoácidos y proteínas, que reaccionan con el cloro libre y lo cambia a forma combinada), como suciedad, residuos, y microorganismos presentes en la superficie del producto. La efectividad también dependerá de la variedad de los microorganismos que contaminan el producto. Algunos estudios reportan que no hay diferencias significativas en la reducción entre *E.coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* y *L. monocytogenes*. Otro factor importante, en la efectividad del agua electrolizada, es la adhesión de las bacterias a partículas de materia orgánica y su estabilización en estructuras bacterianas por la materia orgánica presente en el agua. Un factor, quizás uno de los mas importantes, es la rugosidad, que interfiere en la habilidad del AEN, y de cualquier agente desinfectante, de alcanzar a los microorganismos patógenos en la superficie del alimento (López-Gálvez *et al*, 2012).

El alto potencial redox en el AEN, indica una alta reactividad química que resulta en la inactivación de microorganismos debido a somete a procesos de óxido-reducción a los microorganismos, y el cambio de la estructura del agua debido a la electrólisis, permite la entrada del agua electroactivada, este cambio

esta relacionado directamente con una mejor penetrabilidad e interacción de los iones microbicida. El efecto del potencial redox consiste en reaccionar la membrana celular dañándola e inactivando los mecanismos de defensa de los microorganismos. Una vez que la membrana se encuentra dañada, ésta se vuelve permeable y el HClO puede penetrar al interior de la célula y oxidarla, esta habilidad esta relacionada con la fuga de protones lo que incrementa el uso de energía usada para que la célula pueda mantener la homeostasis, de acuerdo a lo mencionado por Issa-Zacharia *et al.*, en el 2011.

Cabe destacar, que las características entre distintas aguas electrolizadas y su actividad antimicrobiana pueden variar debido a los parámetros usados en el sistema de electroactivación, como menciona Aider *et al.*, en el 2012, depende del voltaje, el flujo y contenido de la alimentación el reactor (mineralización 0.1-120 g/L de NaCl), la duración del sistema, la estabilidad de los electrodos, etc.

A través de este estudio, se demostró que el efecto antimicrobiano del AEN, se encuentra estrechamente relacionado con la cantidad de HClO presente y su alto potencial redox. Por último, el estudio demostró que el lavado con la adición de una acción mecánica y física, removerán a los microorganismos patógenos que se encuentran adheridos en la superficie del alimentos y junto con la adición de un agente desinfectante podrá ayudar a mejorar la inocuidad del producto.

VII.6.1 Mantenimiento de la calidad microbiológica del tomate inoculado con *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*

Este experimento se realizó con el objetivo de analizar el efecto residual de las soluciones desinfectantes cuando son usados en los productos en fresco, ya que de acuerdo con Abadias *et al.*, (2011), los productos en fresco no reciben ningún tratamiento letal que elimine los microorganismos patógenos antes de su consumo. Por lo tanto, cualquier microorganismo patógeno introducido al alimento en cualquier etapa del procesamiento estará presente cuando el producto sea consumido.

La eficiencia de los métodos de desinfección se ve reflejada en la reducción microbiana obtenida y, aún más importante, en el mantenimiento de esta reducción durante el almacenamiento (Goodburn y Wallace, 2013).

Por lo que esta investigación se enfocó en la búsqueda de un sanitizante alternativo, en este caso el AEN, que asegure la calidad microbiológica de los alimentos y su capacidad para mantener la población de microorganismos patógenos en niveles bajos a lo largo de 21 días a temperaturas de refrigeración (4°C). La efectividad se comparó con agua destilada y con NaClO, como estándar, a una concentración de 200 ppm.

En la Figura 19, se observa el efecto residual de las soluciones desinfectantes en una población adherida de aproximadamente 4.5 Log UFC/unidad durante el almacenamiento del tomate a 4°C, observándose, en primera instancia que el lavado del tomate con agua destilada en el día 0 ocasiona una reducción de alrededor de 1 Log UFC/unidad, sin embargo, los días posteriores, la población se mantiene constante en aproximadamente 3.5 Log UFC/unidad, pero al día 21, la población incrementa hasta al nivel inicial, esto es a 4.5 Log UFC/unidad. Por otro lado, el efecto antimicrobiano del NaClO se observa durante los primeros 7 días de almacenamiento, pues se observa un descenso en la población de *L.*

monocytogenes de alrededor de 2 Log UFC/unidad. Los días 14 y 21 la población aumenta en aproximadamente 1 Log UFC/unidad para alcanzar una población final de 2.5 Log UFC/unidad. Un efecto antimicrobiano más acentuado durante el almacenamiento fue el que presentó el AEN sobre la población de *L. monocytogenes*, manteniendo la población constante y en niveles cercanos al nivel de detección (1 Log UFC/unidad), sin embargo al acercarse a los 21 días de almacenamiento se observa un ligero aumento en la población. La reducción máxima (4.3 Log UFC/unidad) se alcanzó a los 14 días de almacenamiento.

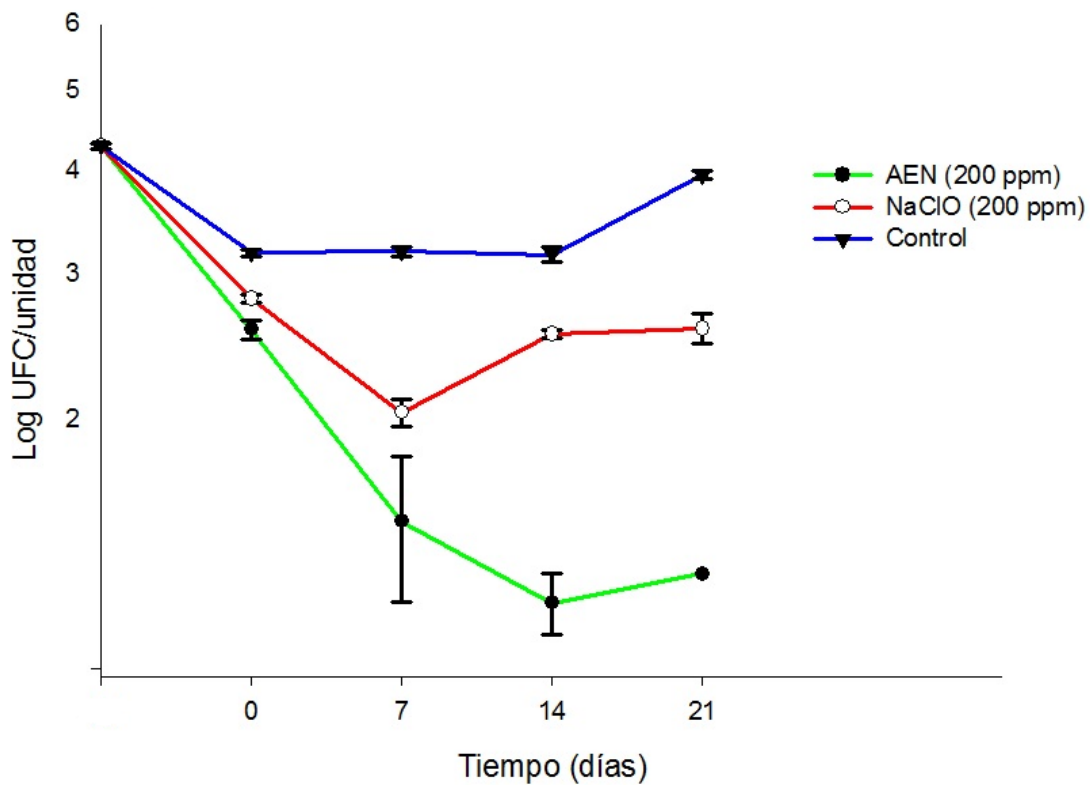


Figura 19. Efecto de los tratamientos de desinfección con control (agua destilada: 0 ppm), AEN, y NaClO (200 ppm) en una población adherida de *Listeria monocytogenes* en la superficie del tomate durante el almacenamiento en refrigeración (4°C) por 21 días. Los valores son la media de tres réplicas y las barras verticales representan la desviación estándar.

El efecto de las soluciones desinfectantes, AEN y NaClO, sobre la población de *Salmonella* spp. adherida a la superficie del tomate y almacenados a 4°C por 21 días, se observa en la Figura 20. Se observa el comportamiento de la población de los microorganismos patógenos adheridos después de que éste fue sometido a un lavado con agua destilada como control, la población muestra al inicio la reducción de <1 Log UFC/unidad, posteriormente, a los 7 días después del almacenamiento la población disminuye cerca de 1.5 Log UFC/unidad y se mantiene sin cambios durante los siguientes 7 días, aumentando ligeramente al día 21.

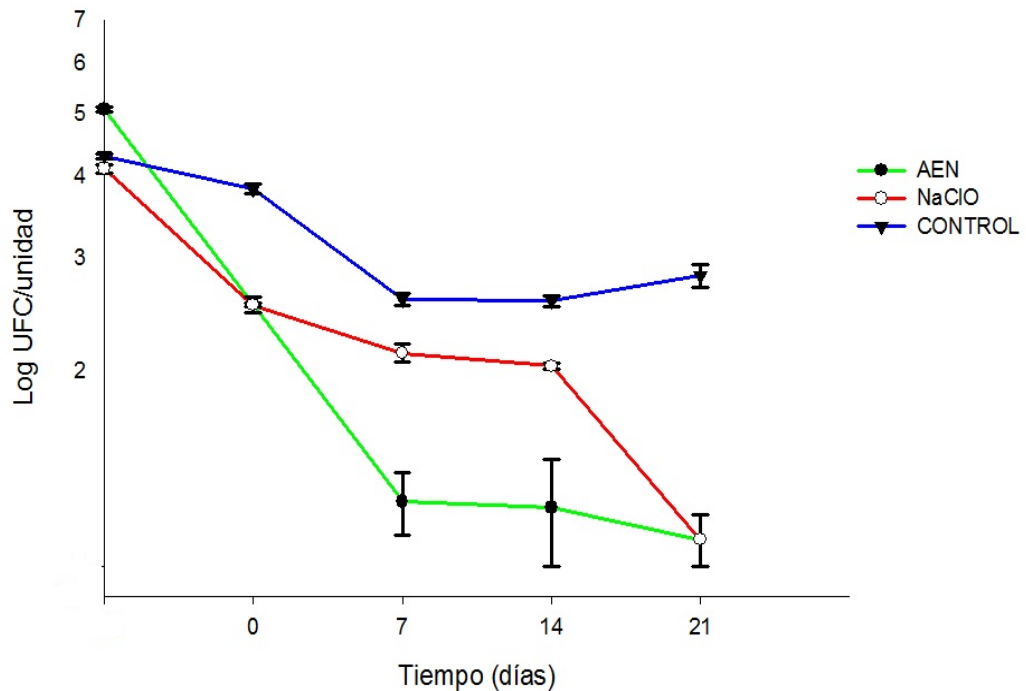


Figura 20. Efecto de los tratamientos de desinfección con control (agua destilada: 0 ppm), AEN, y NaClO (200 ppm) en una población adherida de *Salmonella* spp. en la superficie del tomate durante el almacenamiento en refrigeración (4°C) por 21 días. Los valores son la media de tres réplicas y las barras verticales representan la desviación estándar.

Con respecto al efecto del NaClO, el día 0, hay una reducción en la población de 1.5 Log UFC/unidad. Los días posteriores, la población disminuye

gradualmente. Al día 21, la población cae drásticamente hasta niveles no detectables. Un efecto similar, pero más drástico se observa con el uso del AEN, a una concentración de 200 ppm, la población disminuye 4.8 Log UFC/unidad y al finalizar el periodo de almacenamiento, la población de *Salmonella* disminuye hasta niveles no detectables. El NaClO, presenta un efecto similar al del AEN en la reducción de la población del patógeno, sin embargo, para alcanzar los mismos niveles de reducción se requiere de 21 días de almacenamiento, cuando el AEN requiere de 7 días. Estadísticamente no se encuentran diferencias entre el efecto residual de ambas soluciones en la reducción de la población de los microorganismos en el día 21 de ambos tratamientos. Los tratamientos realizados para la reducción de la población de ambos microorganismos patógenos indican que estadísticamente, a partir del día 14, no se encuentra una diferencia significativa entre el efecto antimicrobiano del AEN y NaClO.

Los resultados anteriores muestran que solo la población de *Listeria monocytogenes* no pudo reducirse hasta niveles no detectables, debido al carácter psicrótrofo de este microorganismos que le permite sobrevivir y crecer a esta temperatura que resultaba ser una barrera más que desempeñaba un papel importante en el mantenimiento de la población microbiana. Goodburne, C., y Wallace, C. en el 2013, atribuyen que la no completa inactivación de los microorganismos después de un tratamiento de desinfección y almacenamiento puede ser debido a que algunas cepas de las bacterias colonizan mejor una superficie que otras, tejidos dañados producido después del tratamiento y la madurez de la hortaliza o fruta. Durante el almacenamiento los microorganismos pueden colonizar y formar biopelículas que las protege de algún efecto residual o de las condiciones de almacenamiento (tiempo y temperatura).

Como es mencionado por Gómez-López *et al.*, en el 2008, uno de los propósitos de los tratamientos de desinfección de las frutas y hortalizas frescas es reducir la población inicial del producto. Asumiendo que la población microbiana

que se encuentra después de la descontaminación, presentará una misma tasa de crecimiento o más lenta comparada con los productos que no fueron tratados, por lo que la vida de anaquel será prolongada, al menos desde el punto de vista microbiológico.

Un estudio realizado por Koseki y Itoh, (2001) desinfectaron lechuga y col con agua electrolizada y almacenaron los productos a 5°C. la mayoría de las bacterias tratadas con agua electrolizada mostraron una tasa de crecimiento rápido y una fase lag más corta comparadas con las que fueron tratadas solo con agua destilada. Un efecto similar ocurrió en el caso de *L. monocytogenes*, que al finalizar el periodo de almacenamiento, hubo un aumento en la población, de acuerdo con estos autores, esto puede ser atribuido a que durante el tratamiento de desinfección se produjo algún daño a la integridad del producto lo que permitió que hubiera un fácil acceso a nutrientes y a sitios de protección. De esta manera, el proceso de desinfección no sólo resulta inútil, sino contraproducente para la inocuidad y estabilidad del producto.

Es posible que las condiciones de almacenamiento como la temperatura desempeñe un papel importante en el éxito de los tratamientos de desinfección. Los tratamientos realizados con AEN y NaClO no pudieron reducir hasta niveles no detectables la población de *L. monocytogenes* en comparación con la población de *Salmonella* que su población se redujo hasta niveles no detectables. Se ha reportado que temperaturas de almacenamiento entre 1 y 4°C pueden mantener la población bacteriana en cuentas bajas comparadas con el control. Mientras que temperaturas de 5 y 8°C puede incrementar las cuentas bacterianas que las del control. En general, se puede sugerir que las bajas temperaturas son un factor muy importante para evitar que la población bacteriana en productos tratados con los agentes desinfectantes alcancen cuentas altas comparadas con el control, como en el caso de *Salmonella*.

VIII. CONCLUSIONES

El lavado con agua destilada tiene un mínimo impacto en la microflora natural y en la población de microorganismos patógenos al disminuir como máximo 2 Log UFC/unidad. Sin embargo, este paso es indispensable porque puede reducir la población microbiana.

Las células libres o planctónicas son mucho menos resistentes que las células adheridas, siendo estas hasta 100 veces más resistentes.

El efecto desinfectante de AEN sobre tomate, aguacate y espárrago a una concentración de 200 ppm y de NaClO (120 ppm), aplicados por 1 min de contacto, son equivalentes en su efecto antimicrobiano reduciendo 3 Log.

El efecto antimicrobiano del AEN y NaClO sobre *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* bajo las mismas condiciones (200 ppm aplicado por 1 min) son equivalentes.

Con respecto a la vida de anaquel del tomate almacenado por 21 días, se observó que la temperatura desempeñó un papel importante en la reducción de la población del microorganismo patógeno. El AEN fue capaz de mantener la población de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* con cuentas bajas por debajo del nivel de detección (1 Log) por 21 días a 4 °C, mientras que el NaClO no mostró este efecto.

Para todos los experimentos, a excepción de vida de anaquel, se observó que *Salmonella* spp. es más resistentes que *Listeria monocytogenes*.

Se demostró que el AEN puede ser una buena alternativa al uso del hipoclorito de sodio para la desinfección de frutas y hortalizas en fresco.

Se requieren más estudios para determinar si el AEN tiene efecto adversos en la calidad visual y de textura en los productos en fresco.

Esta investigación permitirá el estudio de nuevas tecnología emergentes que combinen el AEN con otros desinfectantes u otros métodos alternativos que permitan aumentar la capacidad de alcanzar mayores reducciones microbianas, así como, el uso de detergentes que permitan remover de manera más fácil los microorganismos patógenos con el propósito de mantener la inocuidad de estos productos.

VIII. ANEXOS

Cuadro A1 Reducciones en la población de la microflora de productos en fresco tratadas con NaClO 120 ppm a temperatura ambiente (23±2°C)

		Tomate	Aguacate	Espárrago
Tiempo (min)	Microorganismo Indicador	Reducción (Log UFC/unidad)	Reducción (Log UFC/unidad)	Reducción (Log UFC/unidad)
1	HyL	2.15±0 ^a	1.38±0.01 ^b	1.94±0.02 ^{ab}
3		1.68±0 ^a	1.92±0.33 ^b	2.38±0.4 ^b
5		1.62±0 ^a	0.92±0.33 ^a	1.38±0.35 ^a
1	BMA	3.41±0 ^a	1.97±0.01 ^{bc}	1.960±0.5 ^b
3		4.25±0.30 ^a	0.06±0.27 ^c	0.83±0.83 ^{bc}
5		4.29±0.15 ^a	1.73±0.06 ^b	1.67±0.04 ^{bc}
1	CT	1097±0 ^a	950±0 ^a	1079 ^a
3		1097±0 ^a	1089±0 ^a	1097 ^a
5		1097±0 ^a	1089±0 ^a	1077 ^a

Reducción (Log UFC/unidad) están reportadas como la media de las determinaciones por triplicado ± desviación estándar. ^{abc} Valores que no están conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes, según la prueba de Tukey con p<0.05.

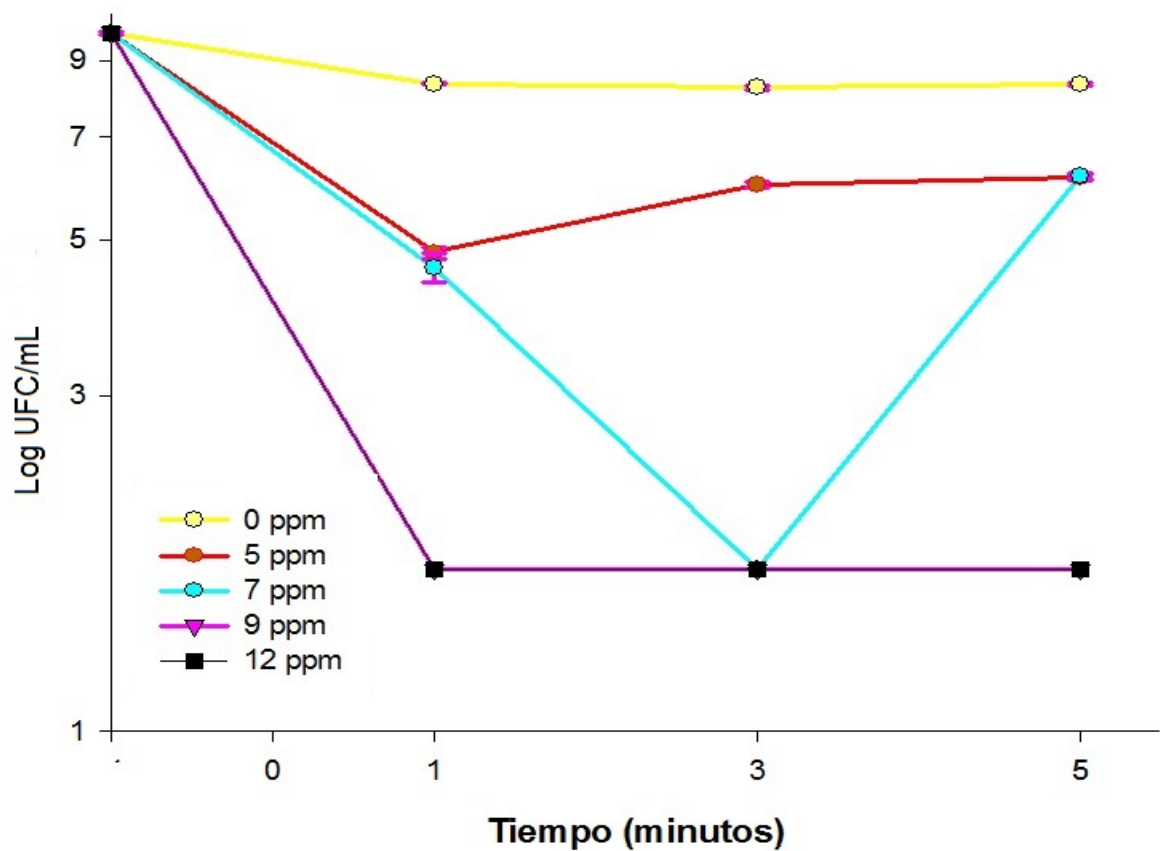


Figura A1. Células viables libres de *L. monocytogenes* después del tratamiento con diferentes concentraciones y tiempos de exposición de AEN. Los valores son la media de tres replicas y las barras verticales representan la desviación estándar.

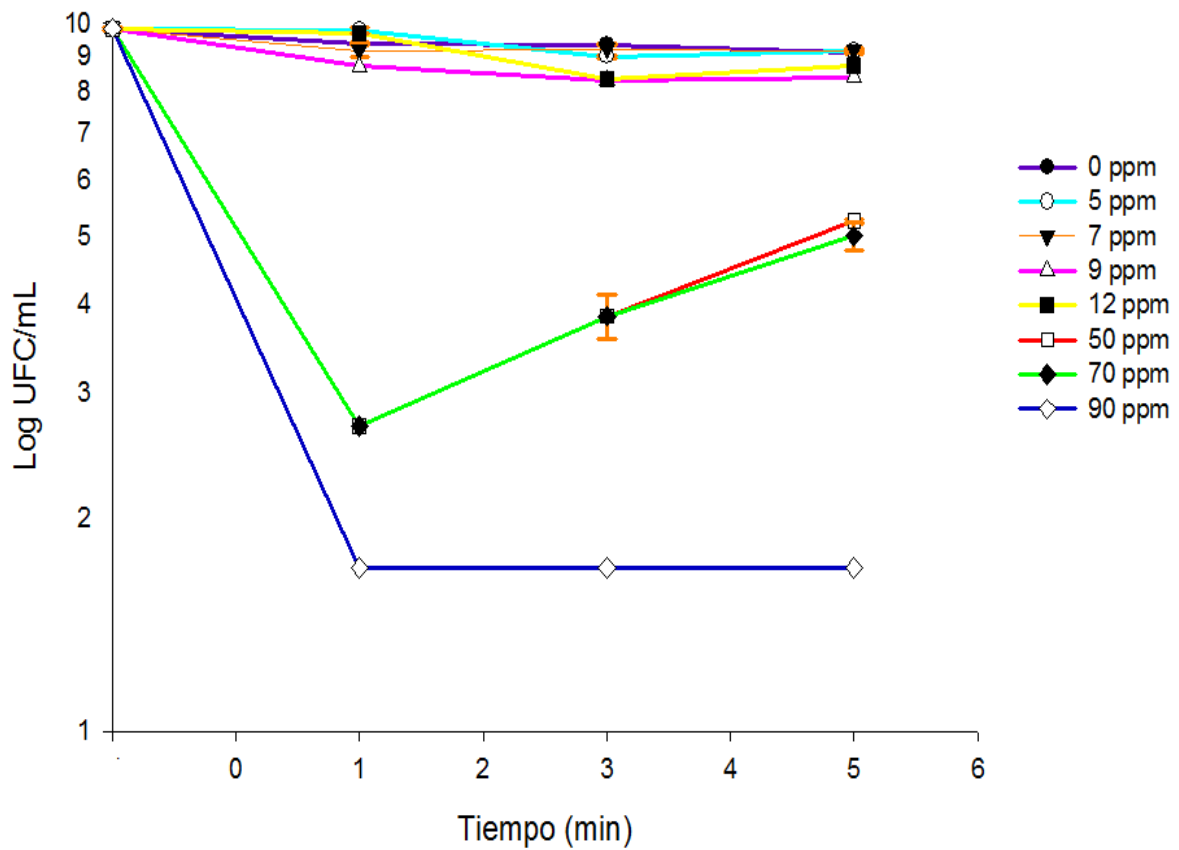


Figura A2. Células viables libres de *L. monocytogenes* después del tratamiento con diferentes concentraciones y tiempos de exposición de NaClO. Los valores son la media de tres replicas y las barras verticales representan la desviación estándar.

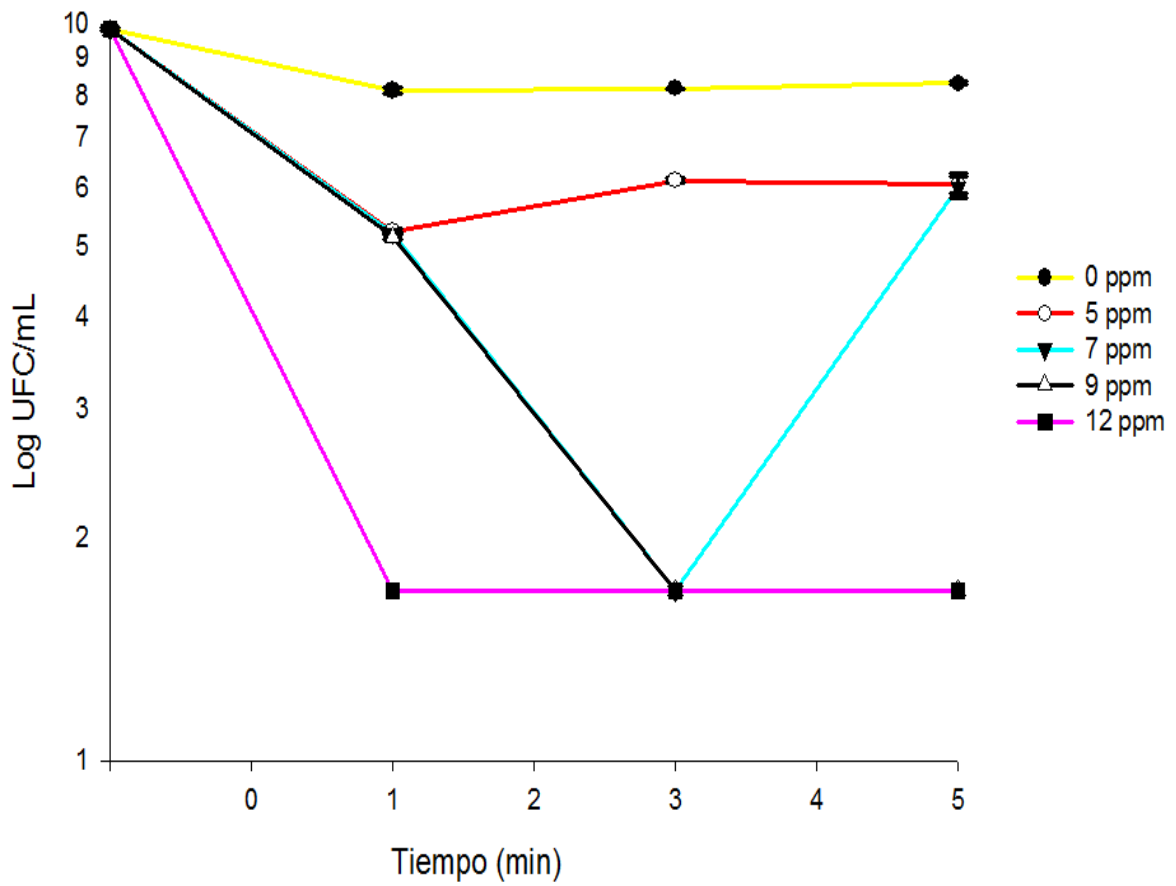


Figura A3. Células viables libres de *Salmonella* spp. después del tratamiento con diferentes concentraciones y tiempos de exposición de AEN. Los valores son la media de tres replicas y las barras verticales representan la desviación estándar.

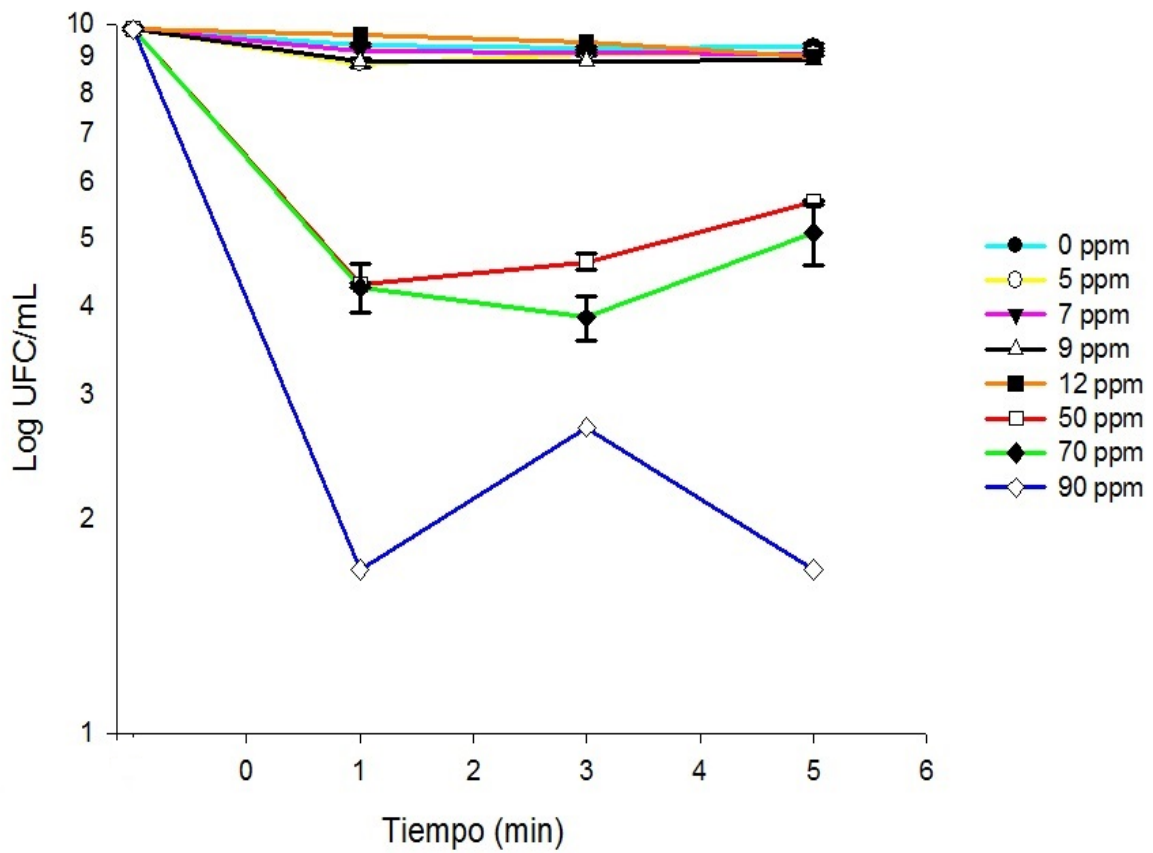


Figura A4. Células viables libres de *Salmonella* spp. después del tratamiento con diferentes concentraciones y tiempos de exposición de NaClO. Los valores son la media de tres replicas y las barras verticales representan la desviación estándar.

IX. BIBLIOGRAFIA.

- Abadias, M., Usall, J., Oliveira, M., Alegre, I., Viñas, I. 2008. Efficacy of neutral electrolyzed water (NEW) for reducing microbial contamination on minimally-processed vegetables. *International Journal of Food Microbiology*. 123: 151-158.
- Abadias, M., Usall, J., Torres, R., M., Viñas, I. 2011. Evaluation of alternative sanitizers to chlorine disinfection for reducing foodborne pathogens in fresh-cut apple. *Postharvest Biology and Technology*. 59: 289-297.
- Aider, M., Gnatko, E., Benali, M., Plutakhin, G., Kastyuchik, A. 2012. Electro-activated aqueous solutions: Theory and application in the food industry and biotechnology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 15: 38-49.
- Allende, A., McEvoy, J., Tao, Y., Luo, Y. 2009. Antimicrobial effect of acidified sodium chlorite, sodium chlorite, sodium hypochlorite, and citric acid on *Escherichia coli* O157:H7 and natural microflora of fresh-cut cilantro. *Food Control*. 20: 230-234.
- Allende, A., Selma, M., López-Gálvez, F., Villaescusa, R., Gil, M. 2008. Role of commercial sanitizers and washing systems on epiphytic microorganisms and sensory quality of fresh-cut escarole and lettuce. *Postharvest Biology and Technology*. 49: 155-163.
- Aranceta B. y Pérez-Rodrigo C. 2006. *Frutas, verduras y salud*. Editorial Elsevier. Barcelona, España. Pp.1-11.
- Artés F., Gómez P., Aguayo E., Escalona., Artés-Hernández F. 2009. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. *Postharvest Biology and Technology*. 51: 287-296.
- Aycicek, H., Oguz, U y Kari, K. 2006. Determination of total aerobic and indicator bacteria in some raw eaten vegetables from wholesalers in Ankara, Turkey. *International Journal Of Hygiene and Environmental Health*.
- Barbosa-Cánovas G., Fernández-Molina J., Alzamora S., Tapia M., López-Malo A., Welti-Chanes J. 2003. *Handling and preservation of fruits and vegetables by combined methods for rural areas*. Technical manual. FAO Agricultural services Bulletin. Roma, Italia. Pp. 1-10

- Bautista de León, H., Gómez-Aldapa, C., Rangel-Vargas, E., Vázquez-Barrios, E., Castro-Rosas, J. 2013. Frequency of indicator bacteria, *Salmonella* and diarrhoeagenic *Escherichia coli* pathotypes on ready-to-eat cooked vegetables salads from México restaurants. *Letters in Applied Microbiology*. 56: 414-420.
- Berger, C.N., Shaw, R.K., Brown, D.J., Mather, H., Clare, S., Dougan, G., Pallen, M.J., Frankel, G., 2009. Interaction of *Salmonella enterica* with basil and other salad leaves. *ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* 3: 261-265.
- Bérmudez-Aguirre D., Barbosa-Cánovas G. 2013. Disinfection of selected vegetables under nonthermal treatments: chlorine, acid citric, ultraviolet light and ozone. *Food Control*. 29: 82-90.
- Bessi, H., Debbabi, H., Grissa, K., Bellagha, S. 2014. Microbial reduction and quality of stored date fruits treated by electrolyzed water. *Journal of Food Quality*. 37: 42-49
- Betts, R. 2011. Microbial update fresh produce. *International Food Hygiene*. Volume 22 Number 3.
- Beuchat L. 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a Review. *World Health Organization. Food Safety Team*. 98: 21-49.
- Beveridge, T. 1999. Structure of Gram negative cell walls and their derived vesicles. Review. *Journal of Bacteriology*. 181: 4725-4733.
- Bialka, K. L., Demirci, A., Knabel, S. J., Patterson, P. H., Puri, V. M. 2004. Efficacy of electrolyzed oxidizing water for the microbial safety and quality of eggs. *Poultry Science* 83: 2071–2078
- Bohaychuk, V., Bradbury, R., Dimock, R., Fehr, M., Gensler, G., King, R., Rieve, R., Barrios, R. 2009. A microbiological survey of selected Alberta-grown fresh produce from farmers' markets in Alberta, Canada. *Journal of Food Protection*. 72: 415-420.
- Bonez, P., Alves, C., Dalmolin, T., Ageryy, V., Mizdal, C., Flores, V., Marques, J., Santos, R., De Campos, M. 2013. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. *American Journal of Infection Control*. 41: 199-122.
- Brandt, A.L, Castillo, A., Harris, K.B., Keeton, J.T., Hardin, M.D. y Taylor, T.M. 2010. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food antimicrobials applied singly and in combination. *Journal of Food Science*. 75: M557-M563.

- Casadiago, P., Cuartas, R., Mercado, M., Díaz, M., Carrascal, A. 2005. Effectiveness of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Listeria monocytogenes* in lettuce. *Universitas scientiarum. Revista de la Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.* 10: 97-108.
- Chmielewski, R. A. N., Frank, J. F. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2: 22-32.
- Codex Alimentarius. 2007. Frutas y Hortalizas Frescas. Primera Edición. Organización Mundial de la Salud. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. Pp. 147-192.
- Daved, H. M., O'Toole, G. A. 2000. Microbiological biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* Vol. 64(4): 847-867.
- Delcour, A. 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1794:808-816.
- Deza, M. A., Araujo, M., Garrido, M. J. 2003. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes* on the surface of tomatoes by neutral electrolyzed water. *Letters in Applied Microbiology.* 37:482-487
- Ells, T., Hansen, L. 2006. Strain and growth temperature influence *Listeria* spp. Attachment to intact and cut cabbage. *International Journal of Food Microbiology.* 111: 34-42.
- Erickson, M.C., Webb, C.C., Diaz-Perez, J.C., Phatak, S.C., Silvoy, J.J., Davey, L. Payton, A.S., Liao, J., Ma, L., Doyle, M.P., 2010. Infrequent internalization of *Escherichia coli* O157:H7 into field-grown leafy greens. *Journal of Food Protection.* 73: 500-506.
- FDA. 2013. Food additive status list.
- Fernández, E.E. 2008. Microbiología e inocuidad de los alimentos. 2da edición., Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro: 220-225, 235-238
- Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO) and World Health Organization (WHO). 2008. Microbiological hazards in fresh fruits and vegetables. Meeting Report. Microbiological Risk Assessment Series.

- Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO). 2006. Fichas técnicas de productos frescos y procesados.
- Forghani, F., Oh, D. H. 2013. Hurdle enhancement of slightly acidic electrolyzed water antimicrobial efficacy on Chinese cabbage, lettuce, sesame leaf and spinach using ultrasonication and water wash. *Food Microbiology*. 1-6
- Francis, G., Gallone, A., Nychas, J., Sofos, J., Colelli., Amodio, M., Spano, G. 2012. Factors affecting quality and safety of fresh-cut produce. *Critical Reviews in Foods Science and Nutrition*. 52: 595-610.
- Fux, C., Costerton, J., Stewart, P., Stoodley, P. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*. 13: 34-40
- Gandhi, M., Chikindas, L. M. 2006. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 113: 1-15
- García-Almendárez, B. E., Cann, I. K. O., Martin, S. E., Guerrero, L. I., Regalado, C. 2008. Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*. Vol. 19: 670-680.
- Gemmell, M.E., Schmidt, S., 2011. Microbiological assessment of river water used for the irrigation of fresh produce in a sub-urban community in Sobantu, South Africa. *Food Research International*. 47: 300-305
- Gil M., Selma M., López Galván F., Allende A. 2009. Fresh-cut product sanitation and water disinfection: Problems and solution. *International Journal of Food Microbiology*. 134: 37-45.
- Gómez-López V., Ragaert P., Debevere J., Devlieghere F. 2008. Decontamination methods to prolongate the shelf-life of minimally processed vegetables, state of the art. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. *Food Science and Nutrition*. 48: 487-495
- Gómez-López, V., Gobet, J., Selma, M., Gil, M., Allende, A. 2013. Operating conditions for the electrolytic disinfection of process wash water from the fresh-cut industry contaminated with *E.coli* O157: H7. *Food Control*. 29: 42-48.
- Goodburn C., and Wallace C. 2012. The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review. *Food Control*. 32: 418-427.

- Graca A., Abadías M., Salazar M., Nunes C. 2011. The use of electrolyzed water as a disinfectant for minimally processed apples. *Postharvest Biology and Technology*. 61: 172-177.
- Hanning I., Nutt, J., Ricke, S. 2009. Salmonellosis outbreak in the United State due to fresh produce: Source and potential intervention measures. *Foodborne Pathogens and Disease*. 6: 635-648.
- Hao J., Qiu S., Li H., Chen T., Liu H., Li L. 2012. Roles of hydroxyl radicals in electrolyzed oxidizing water (EOW) for the inactivation of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*. 155: 99-104
- Harris, L.J., Farber, J.N., Beuchat, L.R. Parish, M.E., Suslow, T.V., Garrett, E.H., y Busta, F.F. 2003. Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2: 78-141.
- Holah, J., Dawson, D., Hall, K. 2002. Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 111-120.
- Hricova, D., Stephan, R., Zweifel, C. 2008. Electrolyzed water and its application in the Food Industry. *Journal of Food Protection* Vol. 71, No. 9, 2008: 1934-1947.
- Hsu, S. Y. 2005. Effects of flow rate, temperature and salt concentration on chemical and physical properties of electrolyzed oxidizing water. *Journal of Food Engineering* 66: 171–176.
- Huang, Y. R., Hung, Y. C., Hsu, S. Y., Huang, Y. W., Hwang, D. F. 2008. Application of electrolyzed water in the food industry. *Food Control*.19: 329-345.
- Hung Y., Tilly P., Kim C. 2010. Efficacy of Electrolyzed Oxidizing (EO) water and chlorinated water for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on strawberries and broccoli. *Journal of Food Quality*. 33: 559-577.
- Issa- Zacharia, A., Kamitani, Y., Muhimbula, H., Iwasaki, K. 2010. Antimicrobial effect of slightly acidic electrolyzed water for inactivation of *Salmonella* spp. And *Escherichia coli* on fresh strawberries (*Fragaria* L.). *African Journal of Microbiology Research*. 4: 2174-2180.

- Issa-Zacharia A, Kamitani Y., Miwa N., Muhimbula H., Iwasaki K. 2011. Application of slightly acidic electrolyzed water as a potential non-thermal food sanitizer for decontamination of fresh ready-to-eat vegetables and sprouts. *Food Control*. 22: 601-607
- Issa-Zacharia, A., Kamitani, Y., Muhimbula, H., Ndabikunze. 2010. A review of microbiological safety of fruits and vegetables and the introduction of electrolyzed water as an alternative to sodium hypochlorite solution. *African Journal of Food Science*. 4: 778-789.
- Jay, J. 2005, Loesner, M., Golden, D. 2005. Parámetros intrínsecos y extrínsecos de los alimentos que afectan al crecimiento microbiano. *Microbiología moderna de los alimentos*. 5ta edición. Editorial Acribia. Pp. 35-52.
- Joshi K., Mahendran, R., Alagusundaram, K., Norton, T., Tiwari B. 2013. Novel disinfectant for fresh produce. *Trends in Food Science and Technology*. 34:54-61.
- Keskinen, L., Annous, B. 2011. Efficacy of adding detergents to sanitizers solutions for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on Romaine lettuce. *International Journal of Food Microbiology*. 147: 157-161.
- Kim, D., Day, D. 2007. A biocidal combination capable of sanitizing raw chicken skin. *Food Control*. 18: 1272-1276.
- Koide, S., Takeda, J., Shi, J., Shono, H., Atungulu, G. 2009. Disinfection efficacy of slightly acidic electrolyzed water on fresh cut cabbage. *Food Control*. 20: 294-297.
- Koseki, S., Itoh, K. 2001. Prediction of microbial growth in fresh-cut vegetables treated with acidic electrolyzed water during storage under various temperature conditions. *Journal of Food Protection*. 64: 1935-1942.
- Lamikanra O. 2002. *Fresh-cut Fruits and Vegetables*. Science, Technology and Market. CRC press. United States of America.
- Lee, N., Kim, N., Jang, I., Jang, S., Lee, S., Hwang, I., Rhee, M. 2014. Decontamination efficacy of neutral electrolyzed water to eliminate indigenous flora on a large-scale of cabbage and carrot both in the laboratory and on a real processing line. *Food Research International*. 64: 234-240.

- Liu, Y., Yang, S., Yong, L., Xu, H., Qin, L., Tay, J. 2004. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. *Journal of Biotechnology*. 110: 251-256.
- López- Gálvez, F., Allende, A., Selma, M., Gil, M. 2009. Prevention of *Escherichia coli* cross-contamination by different commercial sanitizers during washing of fresh-cut lettuce. 133: 167-171
- López-Camelo, A. 2003. Manual para la preparación y ventas de frutas y hortalizas del campo al mercado. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Balneario, Argentina. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/y4893s/y4893s00.htm>. Septiembre, 2013.
- López-Gálvez, F., Posado-Izquierdo, G., Selma, M., Pérez-Rodríguez, F., Gobert, J., Gil, M., Allende, A. 2012. Electrochemical disinfection: An efficient treatment to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in process wash water containing organic matter. *Food Microbiology*. 30: 146-156.
- Mahmoud, B. 2010. The effects of X-ray radiation on *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Shigella flexneri* inoculated on whole Roma tomatoes. *Food Microbiology*. 27: 1057-1063
- Magalhães, L. y Nitschke, M. 2013. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. *Food Control*. 29: 138-142.
- Mangalappalli-Illathu, A., Vidovic, S., Korber, D. 2008. Differential adaptive response and survival of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis planktonic and biofilm cells exposed to benzalkonium chloride Antimicrobial Agents and chemotherapy. 52: 3669-36680.
- McDonnell, G., Russell, D. 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 147-179.
- Moltz, A. G., y S. E. Martin. 2005. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *Journal of Food Protection*. Vol. 68: 92–97.
- Montville, R., Schaffner, D. 2003. Inoculum size influences bacterial cross contamination between surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 7188-7193

- Mukhopadhyay S. and Ramaswamy R. 2012. Application of emerging technologies to control *Salmonella* in foods: A review. Food Research International. 45: 666-677.
- Niemira B., Cooke P. 2010. *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation on Romaine lettuce and Spinach leaf surface reduces efficacy of irradiation and sodium hypochlorite washes. Journal Food of Science. 75: 270-277
- Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.
- Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995. Productos y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*.
- Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- Olaimat, A., Holley, R. 2012. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. Food Microbiology. 32:1-19
- Oliveira, M., Souza, V., Bergamini, A., Martinis, E. 2011. Microbiological quality of ready to eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. Food Control. 22:1400-1403.
- Ongeng D., Devlieghere F., Debevere J., Coosemans J., Ryckeboer.2006. The efficacy of electrolised oxidising water for inactivating spoilage microorganisms in process water and on minimally processed vegetables. International Journal Of Food Microbiology. 109: 187-197.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2011. Panorama ante la Inseguridad Alimentaria y Nutricional en América Latina y el Caribe. Altos Precios de los Alimentos: Retos y Oportunidades.

- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2012. Análisis de la Cadena de valor de Hortalizas con énfasis en Seguridad Alimentaria y Nutricional. Pp. 47-58.
- Oulé, M., Azinwi, R., Bernier, A., Kablan, T., Maupertuis, A., Mauler, S., Nery, R., Dembélé, K., Forbes., Diop, L. 2008. Polyhexamethylene guanidine hydrochloride-based disinfectant: a novel tool to fight meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and nosocomial infections. *Journal of Medical Microbiology*. 57: 1523-1528.
- Pangloli P., Hung Y. 2013. Reducing microbiological risk on blueberries through innovatives washing technologies. *Food Control*. 32: 621-625.
- Park E., Alexander E., Taylor G., Costa R., Kang D. Effect of electrolyzed water for reduction of foodborne pathogens on lettuce and spinach. 2008. *Food Microbiology and Safety*. 73: 268-272.
- Park, E., Alexander, E., Taylor, G., Costa, R., Kang, D. 2009. Te decontamination effects of acidic electrolyzed water for *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on green onions and tomatoes with differing organic demands. *Food microbiology*. 26: 386-390.
- Patel, J., Sharma, M. 2010. Differences in attachment of *Salmonella enterica* serivars to cabbage and lettuce leaves. *International Journal of Food Microbiology*. 139: 41-47.
- Postharvest technology. University of California. Produce facts sheets. Disponible en: <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/> . Última actualización el día Marzo 16, 2014
- Rahman S., Ding T., Oh D. 2010. Inactivation effect of newly development low concentration electrolyzed water and other sanitizer against microorganisms on Spinach. *Food Control*. 21: 1383-1387.
- Ramos, B., Miller, F. Brandao, Teixeira, P., Silva, C. 2013. Fresh fruits and vegetables. An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 20: 1-15

- Riazi S., Matthews K. 2011. Failure of foodborne pathogens to develop resistance to sanitizers following repeated exposure to common sanitizers. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 65: 374-378
- Rico, D., Martín-Diana, A., Barry-Ryan, C., Frías, J., Henehan, G., Barat, J. 2008. Use of electrolyzed water (EW) for quality maintenance and shelf-life extension of minimally processed lettuce. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 9: 37-48.
- Rodríguez-García, O., González-Romero, V., Fernández-Escartín, E. 2011. Reduction of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* with electrolyzed water on inoculated Hass Avocado (*Persea Americana* var. Hass). *Journal of Food Protection*. 74: 1552-1157.
- Ruiz-Cruz, S., Acedo-Félix E., Díaz-Cinco, M., Islas-Osuna, M., González-Aguilar, G. 2007. Efficacy of sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* population on fresh-cut carrots. *Food Control*. 18: 1383-1390.
- Rutala, W., Weber, D., and The Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. 2008. *Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities*. 2008.
- Saha, A., Haque, M., Karmaker, S., Mohanta, M. 2009. Antibacterial effects of some antiseptics and disinfectants. *Journal of Life and Earth Science*. 3: 19-21.
- Saldaña, Z., Xicohtencatl-Cortes, J., Puente, J., Girón, J. 2011. Surface structure in plant stomata and leaf colonization by Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7. *Frontiers in Microbiology*. 2: 1-9.
- San José, J. y Vanetti, M. 2012. Effect of ultrasound and commercial sanitizers in removing natural contaminants and *Salmonella enterica typhimurium* on cherry tomatoes. *Food Control*. 24: 95-99.
- Sapers G. 2001. Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetables prodlogs. *Food Technology and Biotechnology*. 39: 3005-311.
- Sapers G., Gorny J., Yousef A. 2006. *Microbiology of Fruits and Vegetables*. CRC PRESS. United States of America

- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2012. Boletín de Exportaciones del Sector Agroalimentario. Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios. Disponible en: http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/boletin_mensual/boletin_x.pdf. Mayo, 2013.
- Secretaría de Salud. 2012. Enfermedades infecciosas y parasitaria del aparato digestivo. Boletín de Epidemiología México. Disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/boletin.htm>. Acceso 19 de agosto de 2014.
- Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SIAP-SAGARPA). 2012-2013. Cierre de la producción agrícola por estado. Disponible en: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351
- Soni, K., Nannapaneni, R., Schilling, M., Jackson, V. 2010. Bactericidal activity of lauric arginate in milk and Queso Fresco cheese against *Listeria monocytogenes* cold growth. *Journal of Dairy Science*. 93: 4518-4525.
- Srey S., Kabir I., Ha S. 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*. 31: 572-585
- Sun, S., Kim S., Kwak, S., Yoon, K. 2012. Efficacy of sodium hypochlorite and acidified sodium chlorite in preventing browning and microbial growth on fresh-cut produce. *Preventive Nutrition and Food Service*. 17: 210-216.
- Tomás-Callejas E., Martínez-Hernández G., Artés F., Artés-Hernández. 2011. Neutral and acidic electrolyzed water as emergent sanitizer for fresh-cut mizuna baby leaves. *Postharvest Biology and Technology*. 50: 298-306.
- Torlak, E. 2014 Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in aqueous suspension and on apples by neutral electrolyzed water. *International Journal of Food Microbiology*. 185: 69-72
- Tresse, O., Shannon, K., Pinon, A., Malle, P., Vialette, M., y Midelet-Bourdin, G. 2007. Variable adhesion of *Listeria monocytogenes* isolates from food-processing

- facilities and clinical cases to inert surfaces. *Journal of Food Protection*. 70: 1569-1578.
- Van Haute, S., Sampers, I., Holvoet, K., Uyttendaele, M. 2013. Physicochemical quality and chemical safety of chlorine as a reconditioning agent and wash water disinfectant for fresh-cut lettuce washing. *Applied and Environmental Microbiology*. 79: 2850-2861.
- Venkitanarayanan, K. S., Ezeike, G. O., Hung, Y. C., Doyle, M. P. 1999. Efficacy of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, y *L. monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 4276-4279.
- Vicente M. Gómez-López, Peter Ragaert, Johan Debevere & Frank Devlieghere. 2008. Decontamination Methods to Prolong the Shelf-life of Minimally Processed Vegetables, State-of-the-art. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48: 487-495
- Virto, R., Mañas, P., Álvarez, I., Condon, S., Raso, J. 2005. Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in absence and presence of chlorine demanding substrate. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 5022-5028.
- Warriner, K., Huber, A., Namvar, A., Fan, W., Dunfield, K., 2009. Recent advances in the microbial safety of fresh fruits and vegetables. *Advances in Food Nutrition Research*. 57: 155-208.
- Woolf, A.B., Cox, K.A., White, A., Ferguson, I.B., 2003. Low temperature conditioning treatments reduce external chilling injury of 'Hass' avocados. *Postharvest Biology and Technology*. 28: 113-122.
- World Health Organization, Food Safety Unit 1998. Food safety issues: Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. Geneva: World Health Organization. WHO/FSF/FOS/98.2
- Xiong, K., Liu, H., Liu, R., Li, L. 2010. Differences in fungicidal efficiency against *Aspergillus flavus* for neutralized and acidic electrolyzed oxidizing water. *International Journal of Food Microbiology*. 137: 67-75.

Yang, H., Feirtag, J., Diez-González. 2013. Sanitizing effectiveness of commercial “active water” technologies on *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. Food Control. 33: 232-238

X. ABREVIATURAS

Unidades de medición y del Sistema Métrico

cm: centímetros

cm²: centímetros cuadrados

g: gramo

h: horas

ha: hectárea

L: litros

mg; miligramos

min: minutos

mL: mililitros

mm: milímetros

nm: nanómetros

°C: grados centígrados

s: segundos

ton: toneladas

µm: micrómetro

Log: Logaritmo

mg/L: miligramos por litro

mM: miliMolar

mV: milivolts

Ppm: partes por millón (mg/L)

rpm: revoluciones por minuto

ton/ha: toneladas por hectárea

v/v: volumen/volumen

Fórmulas químicas e iones

Aniones

Cl⁻: Cloruro 1-

ClO⁻: Hipoclorito 1-

OH⁻: Hidroxi 1-

Cationes

H⁺: Hidrógeno 1+

K⁺: Potasio 1+

Mg²⁺:Magnesio 2+

Na⁺: Sodio 1+

Compuestos químicos

Cl₂: Cloro

HCl: Ácido clorhídrico

HClO: Ácido hipocloroso

K₂HPO₄: Fosfato de potasio dibásico

NaCl: Cloruro de sodio

NaClO: Hipoclorito de sodio

NaOH: Hidróxido de sodio

O₂: Oxígeno

O₃: Ozono

AE: Agua electrolizada

AEA: agua electrolizada ácida

AEAc: Agua electrolizada alcalina

AEac: Agua electrolizada ligeramente ácida

AEN: Agua electrolizada neutra

ATP: Adesin trifosfato

BMA: Bacterias mesofílicas aerobias

CB: Concentración bactericida

CCI: Centro de Comercio Internacional

CDC: Centro de Control y prevención de Enfermedades (por su siglas en inglés:
Centers for Disease Control and Prevention)

CIDETEQ: Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico del Estado de
Querétaro

CT: Coliformes totales

DNA: Ácido desoxirribonucleico (por su siglas en inglés: Deoxyribonucleic acid)

EC: Medio de cultivo *E. coli*

EPA: Agencia de Protección Ambiental (por sus siglas en inglés: Environmental Protection Agency)

ETA's: Enfermedades transmitidas por alimentos

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura (por su siglas en inglés: Food and Agriculture Organization of the United Nations)

FDA: administración de alimentos y medicamentos (por si siglas en inglés: Food and Drug Administration)

HyL: Hongos y Levaduras

LB: Medio de cultivo Luria Bertani

N.D: No detectable

NEW: Neutral electrolyzed water

NMP: Número más probable

OMS: Organización Mundial de la Salud (WHO por su siglas en inglés: World Health Organization)

Redox: potencial de óxido-reducción.

RNA: Ácido Ribonucleico

SAGARPA: Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

SH: Sodium hypochlorite

SIAP-SAGARPA: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

TLCAN: Tratado de Libre comercio de América del Norte

UFC: Unidad formadora de colonias

UFC/mL: Unidades formadoras de colonia por mililitro

UV: ultravioleta

XLD: Medio de cultivo Xilosa-Lisina-Desoxicolato