



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

**“Incidencia y comportamiento de *Salmonella* en
alimentos de baja actividad de agua”**

TESIS

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

Presenta:

I.A. Juan Carlos Aguilar Vázquez

Dirigido por:

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

C.U. SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO. DICIEMBRE 2015



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

TESIS

"Incidencia y comportamiento de *Salmonella* en alimentos de baja actividad de agua"

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

Presenta:

I.A. Juan Carlos Aguilar Vázquez

Dirigido por:

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

SINODALES

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Presidente


Firma

Ph.D. Doris D 'Souza
Secretario


Firma

Dr. Gerardo M. Nava Morales
Vocal



Firma


Dra. Sofía Ma. Arvizu Medrano
Suplente


Firma

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar
Suplente


Firma


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


Dra. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre 2015

RESUMEN

El propósito de esta investigación fue determinar el perfil microbiológico de alimentos de baja actividad de agua (A_w) y a su vez conocer el comportamiento de *Salmonella* en estos productos. Frutos secos (nueces y cacahuetes), frutas deshidratadas (pasas y jitomates secados al sol) y muestras de chocolate. Se recolectaron 350 muestras de productos vendidos a granel en mercados de la ciudad de Querétaro. Se cuantificó el contenido de bacterias mesófilas aerobias (BMA), coliformes totales (CT), *Escherichia coli*, hongos y levaduras, así como la detección por métodos convencionales, de *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*. Adicionalmente, se realizó la estandarización de una técnica de detección molecular para norovirus en muestras de cacahuates, nueces, pasas y jitomate secado al sol. Los valores de las medianas de los microorganismos indicadores en los cinco productos oscilaron entre 3.1 a 5.2 Log UFC/g para BMA, 0.6-1.2 Log NMP/g para CT, 0.5-0.9 Log NMP/g para *E. coli*, 1.7-2.4 Log UFC/g para los hongos, 2.0-2.8 Log UFC/g para levaduras levaduras. En ninguna muestra se detectó *S. aureus*. Por el contrario la presencia de *Salmonella* se detectó en cacahuates (31 %), nueces (40 %), pasas (30 %), tomate secado al sol (56 %) y chocolate (26 %). El método que resultó efectivo para la detección de Norovirus Murino (MNV-1) consistió en extracción de RNA seguida por RT-PCR; se lograron detectar concentraciones de 2.6, ~0.6, <1 y <1 Log PFU/g en cacahuates, nueces, tomates secados al sol y pasas.

Palabras clave: frutas, brotes, *Salmonella*, norovirus.

SUMMARY

The purpose of this investigation was to determine the microbiological profile of low water activity food items and to know the surveillance of *Salmonella* in these products. Nuts (pecans and peanuts), dehydrated fruits (raisins and sun-dried tomatoes) and chocolate samples (a total of 350) sold in bulk were collected in city markets. Aerobic Plate Count (APC), Coliforms (TC), *E. coli*, molds and yeasts quantifications and *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* detection were carried out by conventional methods. In addition the standardization of a molecular detection technique for norovirus from peanuts, pecans, raisins and sun dried tomato samples was carried out. For the determination of indicator microorganisms the medians observed for the five products are between the values 3.1-5.2 Log CFU/g for APC, 0.6-1.2 Log MPN/g for TC, 0.5-0.9 Log MPN/g for *E. coli*, 1.7-2.4 Log CFU/g for molds, 2.0-2.8 Log CFU/g for yeasts; there was no detection of positive thermonuclease *S. aureus* in any sample. *Salmonella* spp was detected in all the analyzed products: peanuts 31 %, pecans 40 %, raisins 30 %, sun-dried tomato 56 %, and chocolate 26 %. RNA extraction followed by RT-PCR was able to detect the minimum MNV-1 concentrations: peanuts and pecans up to 2.6 Log PFU/g and up to ~0.6 Log PFU/g, respectively. Sun-dried tomatoes showed detection to <1 Log PFU/g and raisins to <1 Log PFU/g.

Key words: fruits, outbreaks, *Salmonella*, norovirus.

DEDICATORIA

A mis padres, Elvia y Carlos, y a mis hermanas Nadia y Jessica.

AGRADECIMIENTOS

A la vida, por permitirme estar en el tiempo y espacio adecuados.

A mis padres por estar siempre a mi lado, apoyándome incondicionalmente, cuidando de mí a pesar de la distancia. Por enseñarme que siempre hay que luchar y perseverar para cumplir las metas que se proponen; agradezco infinitamente el ser el hijo de personas tan maravillosas.

A mis hermanas Nadia y Jessica, por estar conmigo en todo momento, por apoyarme y hacer más llevaderos los momentos pesados de esta travesía. Gracias por tener siempre las palabras adecuadas, por confiar en mí en todo momento.

A Aranza, Jimena y Emilio, por siempre ver la mejor parte de mí, por ser una gran motivación para crecer día a día.

A Lalo, por compartir tus conocimientos, por tu apoyo en todo momento, paciencia, por las palabras de aliento, por no dejarme caer cuando me doblegaba. Gracias por ser mi compañero en este sinfín de travesías.

A la Dra. Montse, por darme la gran oportunidad de crecer académica y personalmente y ayudarme a descubrir cualidades de mí mismo que aún desconocía. Gracias por su tiempo, paciencia, dedicación, apoyo y confianza en todo momento. Estaré siempre agradecido por la oportunidad de ir más allá de lo que pude imaginar, mil gracias por ese impulso.

A la Dra. Sofy por compartir parte del gran conocimiento que posee. Muchas gracias por ser siempre una persona amable, dispuesta a apoyar siempre con la mejor actitud.

A esas personas que con su amistad hicieron de estos dos años una de las mejores experiencias que he vivido, Omar, Ángel, Adriana, Ivanna. Gracias por su apoyo y compartir y hacer los buenos momentos en Querétaro.

A Mayra, gracias por siempre escuchar y por tus palabras, gracias, mi amiga.

A Ale, Carmen y a la Sra. Martha por su apoyo y por compartir sus conocimientos en todo momento.

A CONACYT por el apoyo económico para poder llevar a cabo este proyecto y la estancia de investigación. A la UAQ por las facilidades para realizar el proyecto.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	2
SUMMARY	3
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABLAS	12
I. INTRODUCCIÓN	13
II. REVISIÓN DE LITERATURA	15
2.1 Consumo de productos hortofrutícolas y los beneficios a la salud.....	15
2.2. Alimentos de baja actividad de agua.....	16
2.2.1. Frutos secos.....	16
2.2.1.1. Descripción de los frutos secos.....	16
2.2.1.2. Composición de los frutos secos.....	17
2.2.1.3. Procesamiento de frutos secos.....	20
2.2.1.4. Producción y comercialización de los frutos secos	21
2.2.2. Frutos deshidratados	24
2.2.2.1. Descripción de los frutos deshidratados	24
2.2.2.2. Composición de los frutos deshidratados	25
2.2.2.3. Procesamiento de frutos deshidratadas.....	26
2.2.3. Chocolate	29
2.2.3.1. Descripción del chocolate	29
2.2.3.2. Composición del chocolate	30
2.2.3.3. Procesamiento del chocolate	30
2.3 Microbiología de los alimentos de baja actividad de agua	33
2.3.1. Microbiología de los frutos secos.....	33
2.3.2. Microbiología de los frutos deshidratados.....	36
2.3.3 Microbiología del chocolate.....	38

2.3.4. Microorganismos patógenos en alimentos de baja actividad de agua.	38
2.3.4.1. <i>Salmonella</i>	38
2.3.4.1.1. Salmonelosis.....	39
2.3.4.1.2. Persistencia de <i>Salmonella</i> en ambientes de cultivo	40
2.3.4.1.3. Prevalencia de <i>Salmonella</i> en frutos secos.....	40
2.3.5. Virus.....	41
2.3.5.1. Epidemiología de enfermedades virales	43
2.3.5.2 Norovirus.....	44
2.4. Brotes de enfermedad asociados a alimentos de baja actividad de agua...	46
III. OBJETIVOS	50
3.1 Objetivo general.....	50
3.2 Objetivos específicos	50
IV. METODOLOGÍA	51
4.1 Materiales	51
4.1.1 Material biológico	51
4.1.2 Soluciones.....	51
4.1.3 Reactivos	51
4.1.4 Medios de cultivo	52
4.2 Equipo.....	53
4.3 Metodología	53
4.3.1 Alimentos y sitios de muestreo.....	53
4.3.2. Análisis microbiológicos.	54
4.3.2.2 Bacterias mesófilas aerobias (BMA).	54
4.3.2.3 Coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF) y <i>E. coli</i>	55
4.3.2.4. Hongos y levaduras	55
4.3.3 Detección de microorganismos patógenos.	55
4.3.3.1. <i>Salmonella</i> spp.....	55
4.3.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	57
4.3.3.3. Desarrollo y estandarización de un protocolo para la detección y cuantificación de virus en alimentos de baja actividad de agua.	58
4.4. Comportamiento de <i>Salmonella</i> en alimentos seleccionados de baja actividad de agua.	62

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
5.1. Microorganismos indicadores en alimentos de baja actividad de agua.....	65
5.2. Incidencia de microorganismos patógenos	71
5.3. Sobrevivencia de <i>Salmonella</i> en productos de baja Aw seleccionados.	75
5.4. Protocolo para la detección de virus en alimentos deshidratados.....	80
VI. CONCLUSIONES	88
VII. LITERATURA CITADA	89
VI. ANEXOS	106
Anexo I. Diagrama de flujo correspondiente al procesado de nuez pecanera (Chow de la Peña, 2007)	106
Anexo I-B. Diagrama general de procesamiento de jitomate. (Hui et al., 2004).	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Diagrama de producción de chocolate	32
2. Porcentaje medio estimado de enfermedades asociadas a alimentos (por grupo de alimentos)	47
3. Porcentaje medio estimado de enfermedades generadas por brotes de norovirus en alimentos.	47
4. Diagrama del procedimiento de extracción de RNA con TRIzol	59
5. Grafica de caja y barras del contenido de bacterias mesófilas aerobias (BMA) en muestras de alimentos de baja Aw recolectadas en mercados de la ciudad de Querétaro	66
6. Gráfica de caja y brazos del contenido de hongos (a) y levaduras (b) en muestras de alimentos de baja Aw obtenidos en mercados de la ciudad de Querétaro	68
7. Comportamiento de cepas de <i>Salmonella</i> en muestras de cacahuete. En el eje de las "X" se presenta el tiempo en horas, en el eje de las "Y" se presenta la concentración bacteriana en log UFC/g. En el inciso a) se presentan cepas de referencia, en el inciso b) cepas aisladas a partir de muestras del producto en etapas previas	76
8. Comportamiento de cepas de <i>Salmonella</i> en muestras de pasas. En el eje de las "X" se presenta el tiempo en horas, en el eje de las "Y" se presenta la concentración bacteriana en log UFC/g. En el inciso a) se presentan cepas de referencia, en el inciso b) cepas aisladas a partir de muestras del producto en etapas previas	79
9. Comportamiento de cepas de <i>Salmonella</i> en muestras de jitomate deshidratado. En el eje de las "X" se presenta el tiempo en horas, en el eje de las "Y" se presenta la concentración bacteriana en log UFC/g. En el inciso a) se presentan cepas de referencia, en el inciso b) cepas aisladas a partir de muestras del producto en etapas previas	80

- 10.** Curvas de disociación de RT-PCR para muestras de alimentos de baja Aw inoculadas con MNV-1. a) Cacahuates, b) Nuez, c) Pasas, d) Jitomate **83**
- 11.** Geles de electroforesis de la amplificación de productos obtenidos mediante RT-PCR de la extracción de ARN. **84**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Composición proximal de nueces comestibles.	19
2. Producción de cacahuete en México	22
3. Producción nacional de nuez correspondiente al año 2010	23
4. Composición aproximada del polvo de cacao.	30
5. Metodologías a emplear para la detección de microorganismos	54
6. Condiciones de PCR para <i>Salmonella</i> spp.	56
7. Iniciadores empleados en las reacciones RT-PCR para MNV-1 (Yoneyama et al., 2007)	61
8. Condiciones de reacción de RT-PCR (por 45 ciclos).	61
9. Iniciadores empleados para la reacción RT-LAMP (Hanaki et al., 2014)	62
10. Población de bacterias mesófilas aerobias (BMA), hongos y levaduras en frutos secos y deshidratados recolectados en mercados de la ciudad de Querétaro.	65
11. Contenido de microorganismos coliformes totales (CT) y <i>E. coli</i> en frutos secos, deshidratados y chocolate recolectados en mercados de la ciudad de Querétaro.	70
12. Incidencia de <i>Salmonella</i> en cacahuates, nueces, pasas, jitomate deshidratado y chocolate recolectados en mercados de la ciudad de Querétaro.	71
13. Brotes de enfermedad asociados al consumo de alimentos de baja Aw en los cuales <i>Salmonella</i> se ha relacionado como agente causal.	73

I. INTRODUCCIÓN

En años recientes los alimentos e ingredientes con actividad de agua (Aw) menor a 0.85, denominados de baja Aw, han sido identificados como vehículos de microorganismos patógenos en brotes de enfermedades. Entre los alimentos implicados se encuentran las almendras, nueces, crema de cacahuete, papas fritas, pimienta negra, leche en polvo, entre otros (Gould *et al.*, 2013). *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 y algunas especies de *Cronobacter* y recientemente algunos virus, tales como virus de la hepatitis A y norovirus han sido los principales patógenos involucrados en brotes (Beuchat *et al.*, 2013). Algunos de estos patógenos pueden sobrevivir desde meses hasta años en alimentos de baja Aw y en ambientes de procesamiento y preparación de este tipo de alimentos dentro de la industria. Desafortunadamente los microorganismos patógenos que pueden estar presentes en los alimentos de baja Aw, frecuentemente muestran un marcado incremento a su tolerancia al calor y a otros tipos de tratamientos que son letales para células en ambientes de alta Aw (Beuchat *et al.*, 2013). En consecuencia, las medidas preventivas deben enfocarse a evitar la contaminación de alimentos de baja Aw.

Actualmente en México no existe información respecto a la incidencia de microorganismos patógenos en alimentos o ingredientes de baja Aw, específicamente cacahuates, nueces, almendras, pasas, jitomate y chocolate. En nuestro país, la principal forma de venta de estos productos en mercados y tiendas de abarrotes es a granel lo cual complica aún más asegurar su inocuidad. Por lo general, tanto los frutos secos como los deshidratados son almacenados en costales, única posible barrera contra la contaminación proveniente del entorno, en el cual la fauna nociva representa una importante fuente de contaminación de microorganismos patógenos. Aunado a esto, generalmente los alimentos mencionados son consumidos sin la aplicación de un tratamiento previo a su consumo que pueda garantizar su eliminación.

Por estos motivos, el primer paso para diseñar medidas preventivas que incidan en la prevención del riesgo asociado a la ingesta de este tipo de alimentos

por consumidores mexicanos, es realizar un diagnóstico de la frecuencia con la que se encuentran los principales patógenos que se han detectado o que hasta ahora han sido involucrados en brotes en otros países, así como la evaluación de la capacidad de sobrevivencia de estos microorganismos ante procesos de desecación que se aplican en la industria.

En la actualidad se cuenta con protocolos bien definidos para la detección de *Salmonella* en alimentos. Sin embargo, en relación a la detección de enterovirus aun no existen métodos diseñados para su detección en alimentos de baja actividad de agua.

En el presente trabajo: 1) Se llevó a cabo la caracterización microbiológica y la detección de *Salmonella* en alimentos de baja actividad de agua (cacahuates, nueces, pasas, jitomate y chocolate) colectados en mercados y supermercados de la ciudad de Querétaro; 2) Se evaluó la capacidad de sobrevivencia de *Salmonella* durante el almacenamiento de alimentos de baja actividad de agua seleccionados; y 3) Se desarrolló un protocolo para la detección de norovirus mediante métodos moleculares en cacahuates, pasas y jitomates deshidratados.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Consumo de productos hortofrutícolas y los beneficios a la salud

En la actualidad en la población existe una tendencia mundial hacia un mayor consumo de frutas y hortalizas, motivado principalmente por la creciente preocupación de tener una dieta más equilibrada, con menor proporción de carbohidratos, grasas y aceites y con una mayor ingesta de fibra dietética, vitaminas y minerales. Esto se fundamenta, en parte, en las menores necesidades calóricas de la vida moderna, derivadas de un mayor confort y sedentarismo. El otro factor que determina esta tendencia es la mayor conciencia de la importancia de la dieta en la salud y longevidad (López, 2003).

Debido a su bajo contenido de materia seca, se considera que nutricionalmente tanto frutas como hortalizas no ofrecen las propiedades nutricionales adecuadas para satisfacer los requerimientos nutricionales diarios. En general, poseen un alto contenido de agua y bajo de carbohidratos, proteínas y lípidos, pero son una buena fuente de minerales y vitaminas. Es sabido que las condiciones de cultivo, variedades, clima y formas de preparación influyen en el contenido de nutrientes de estos alimentos. Adicionalmente las frutas y hortalizas poseen compuestos naturales que benefician a la salud del consumidor. Entre éstos pueden mencionarse a las sustancias antimicrobianas naturales (por ejemplo aceites esenciales, antocianinas, ácido benzoico, benzaldehído) y/o ácidos orgánicos (tales como málico, tartárico y cítrico) que contribuyen a la acidez de las frutas y hortalizas y que generalmente mantienen el pH de la fruta a valores menores a 4.6. Son ricas en fitoquímicos como los terpenos (carotenoides en y limonoides en cítricos), fenoles (cerezas, uvas, berenjenas, berries, manzanas y ciruelas), lignanos (brócoli), y tioles (ajo, cebolla, puerro, en repollos y coles) (López, 2003).

2.2. Alimentos de baja actividad de agua

2.2.1. Frutos secos

2.2.1.1. Descripción de los frutos secos

El término nuez se refiere comúnmente a frutos de cáscara dura, siendo o no auténticas nueces, por ejemplo, el cacahuete (que es una leguminosa). Las nueces comestibles son cultivadas en una amplia variedad de condiciones climáticas, globalmente populares y apreciadas por sus atributos tanto sensoriales, nutricionales y de salud. Dentro de estos frutos, los cacahuates son popularmente consumidos como botanas o ingredientes en la elaboración de varios productos, tales como crema de cacahuete o barras tipo palanqueta. Los cacahuates (*Arachis hypogaea*) y diversas nueces-almendras (*Prunus dulcis*), nueces de la India (*Anacardium occidentale*), nueces de Brasil (*Bertholetia excelssa*), avellanas (*Corylus avellana*), macadamias (*Macadamia integrifolia*), nueces pecaneras (*Carya illinoensis*), piñones (*Pinus pinea*), pistachos (*Pistachiavera*), y nueces de castilla (*Juglans regia*) son los más populares y de mayor relevancia económica a nivel mundial (Venkatachalam y Sathe, 2005).

A diferencia de las nueces, que desarrollan en árboles, los cacahuates fructifican bajo la tierra. Las nueces son frutos de cáscara muy dura que en su interior contienen la porción comestible. En ésta no es común (o en muy bajo nivel) la presencia de microorganismos; su desarrollo se ve limitado por el bajo nivel de Aw del producto (Escartín, 2008).

Las almendras son un tipo de nuez con Aw menor a 0.65 (6 % de humedad) que no permite el desarrollo microbiano. La parte comestible del fruto se encuentra cubierta por una dura cáscara que a su vez está rodeada por una vaina. Así es cosechada y al procesarla se eliminan ambas cubiertas. Por tanto, este fruto seco puede comercializarse de diversas maneras, incluidas polvo, pasta, aceite, entera, rebanada, fraccionada o en extractos tipo leche (Escartín, 2008).

El fruto del cacahuate se cosecha extrayéndolo de la tierra cuando alcanza su madurez. Es una buena fuente de fibra, carbohidratos, grasas no saturadas, vitaminas y minerales.

La contaminación microbiana de interés sanitario en este tipo de productos inicia en la cosecha; la excepción son los cacahuates, considerados dentro del grupo, pero que desarrollan en la tierra, factor por el cual están expuestos a contaminación de origen.

2.2.1.2. Composición de los frutos secos

Los frutos secos contienen un cierto número de esteroides distintos al colesterol, (como el beta-sitosterol) en concentración relativamente alta. Los esteroides vegetales, o fitoesteroides, desempeñan un papel importante en la fisiología corporal ya que contribuyen a reducir la absorción del colesterol presente en el intestino delgado, proveniente de la secreción biliar y de la desintegración de las células descamadas del epitelio intestinal y, en menor proporción, del incorporado con la dieta. Por similitud química entre estos esteroides y el colesterol, fitoesteroides compiten con el último para interactuar con la enzima responsable de la regulación del ritmo y cantidad del colesterol a absorber, la acil-colesterol acil transferasa (ACAT), (Segura, 2001).

Además de su notable contenido en ácidos grasos resistentes a la oxidación, los frutos secos aportan cantidades significativas de sustancias que protegen frente a la oxidación de los radicales libres reduciendo, así, los efectos tóxicos de estos últimos. El contenido en anti-oxidantes de los frutos secos es notable: las almendras y las avellanas muestran una concentración en vitamina E (bajo cuya denominación se incluyen distintos tipos de tocoferoles y tocotrienoles) superior a 20 mg / 100 g, los piñones del orden de los 13-14 mg / 100 g y las nueces y pistachos alrededor de 5 mg / 100 g. De esta forma, los frutos secos poseen un efecto cardiosaludable adicional, debido fundamentalmente a la capacidad de vitamina E presente, la cual protege a las LDL frente a la acción de radicales libres y evita su transformación en una partícula oxidada, la cual resulta

agresiva para la pared arterial y promotora de la degeneración ateromatosa (Segura, 2001).

Los frutos secos contienen también una cierta cantidad de vitaminas del grupo B, entre las que destaca el ácido fólico que en algunos productos (como las avellanas, las nueces o las almendras) alcanza concentraciones del orden de los 100 µg / 100 g (los requerimientos de ácido fólico para una persona adulta son del orden de los 400 µg al día).

También es conveniente tener en cuenta el contenido en minerales "saludables" de estos productos. Así, 100 g de almendras contienen alrededor de 235 mg de calcio, 275 mg de magnesio, 756 mg de potasio y, en cambio, solamente 24 mg de sodio (Segura, 2001).

Los frutos secos contienen una importante proporción de proteínas, entre el 19 % de la almendra y el 14 % de los piñones, las avellanas o las nueces. Las proteínas presentes en estos alimentos están constituidas por glutelinas, prolaminas, albuminas y globulinas. Aunque la proteína de estos productos, como la mayoría de origen vegetal, no tiene la misma calidad que las de origen animal, contiene una elevada proporción de arginina (aminoácido importante en los procesos asociados con la dinámica del sistema cardiovascular). El aminoácido limitante es la lisina. También poseen un elevado contenido de ácidos grasos de tipo cardiosaludable. En la mayor parte de éstos, predomina el ácido oleico, el cual representa el 70 % del total en almendras y avellanas, aproximadamente el 60 % en los pistachos y del 15 al 45 % en nueces y piñones (Segura, 2001).

Venkatachalm y Sathe (2005) realizaron estudios en diez variedades de nueces de venta en la ciudad de Modesto, CA, con el fin de determinar la composición proximal de dichos productos (Tabla 1). Como parte de los resultados, los autores señalaron la importancia de los bajos índices de humedad presentes en estos productos (desde 1.47 % para piñones, hasta 9.51 % para nueces pecaneras), ya que gracias a la baja condición de este factor, las probabilidades de desarrollo microbiano en los mismos también decrecen.

Tabla 1. Composición proximal de nueces comestibles.

Nuez	Humedad	Lípidos	Proteínas	Cenizas	Azúcares
Almendra (<i>Prunus dulcis</i>)	9.51+/- 0.08	43.36+/- 0.62	19.48+/- 0.51	2.48+/- 0.05	2.11+/- 0.11
Nuez brasileña (<i>Bertholetia excelssa</i>)	3.07+/- 0.37	66.71+/- 1.17	13.93+/- 0.40	3.28+/- 0.01	0.69+/- 0.04
Marañón (<i>Anacardium occidentale</i>)	4.39+/- 0.04	43.71+/- 1.13	18.81+/- 0.06	2.66+/- 0.21	3.96+/- 0.08
Avellana (<i>Corylus avellana</i>)	4.19+/- 0.04	61.46+/- 0.57	14.08+/- 0.34	2.03+/- 0.14	1.41+/- 0.05
Nuez de macadamia (<i>Macadamia integrifolia</i>)	2.10+/- 0.12	66.16+/- 0.92	8.40+/- 0.71	1.16+/- 0.04	1.36+/- 0.05
Nuez pecana (<i>Carya illinoensis</i>)	7.40+/- 0.08	66.18+/- 0.53	7.50+/- 0.24	1.88+/- 0.07	1.55+/- 0.04
Piñón (<i>Pinus pinea</i>)	1.47+/- 0.29	61.73+/- 0.55	13.08+/- 0.75	2.50+/- 0.15	1.82+/- 0.07
Pistachos (<i>Pistachia vera</i>)	5.74+/- 0.03	45.09+/- 0.27	19.80+/- 0.49	3.21+/- 0.03	1.52+/- 0.07
Nuez de castilla (<i>Juglans regia</i>)	2.70+/- 0.20	64.50+/- 0.45	13.46+/- 0.47	1.82+/- 0.02	2.06+/- 0.23
Cacahuete Virginia (<i>Arachis hypogaea</i>)	7.09+/- 0.09	42.88+/- 0.13	21.56+/- 0.26	1.60+/- 0.06	0.55+/- 0.02
LSD (p= 0.05)	0.60	2.47	1.62	0.34	0.32

Todos los valores están expresados en gramos por 100 g (n = 3).

La nuez pecanera o encarcelada se caracteriza por tener un porcentaje de almendra que puede sobrepasar el 60 %. En general, la almendra es rica en aceite (65-75 %) constituido principalmente por ácidos grasos insaturados (90.6 %); contiene cantidades importantes de proteínas (8-18 %), de carbohidratos fácilmente digeribles (10 %) agua (2.5 %), fibra dietética (7.5 %), vitaminas y minerales (Santerre, 1994; Worley, 1994). Los azúcares mayormente encontrados en la almendra son sacarosa, fructosa, glucosa e inositol. Las almendras de la nuez pecanera son una buena fuente de minerales como potasio, fósforo, magnesio, calcio, zinc, hierro, cobre, sodio, selenio, nitrógeno, y de vitaminas como tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, ácido pantoténico, ácido ascórbico, tocofeles (vitamina E) y precursores de retinol (Santerre, 1994; Worley, 1994).

La almendra contiene aproximadamente entre 0.70 y 1.71 % de taninos condensados (Polles *et al.*, 1981), que además de ser responsables de la coloración, contribuyen a la textura y al sabor astringente de las almendras. Los ácidos fenólicos presentes en la testa o piel de la almendra son el gálico, gentísico, vainílico, cumárico, p-hidroxibenzoico y fenilacético (Santerre, 1994).

2.2.1.3. Procesamiento de frutos secos

Con el fin de ejemplificar el procesamiento que reciben los frutos secos, a continuación se presenta el procesamiento de la nuez pecanera según el Organismo Americano de los Descascaradores de Nuez (Chow de la Peña, 2007) (Diagrama de flujo en Anexo I).

1. Preparación. Para que la nuez esté preparada para ser quebrada, es necesario humedecerla para que la cáscara se suavice y al momento de quebrarla ésta no se destruya por dentro. La nuez es acondicionada y limpiada al ser humedecida por un lapso de tiempo. Existen dos métodos para este paso.

- A. Método de agua fría. Consiste en mojar la nuez en agua fría clorada por un periodo de hasta 8 horas. Después son secadas en costales o barriles por un lapso de 16 a 18 horas, esto como preparación para ser quebradas en las próximas 24 horas.

- B. Método de vapor a presión. Consiste en exponer la nuez a agua caliente o vapor a presión por un periodo de 6 a 8 minutos e inmediatamente después enfriarse por un lapso de 30 a 60 minutos. El método de vapor a presión es más rápido pero puede causar decoloración de la nuez.

2. Quebrado de nuez. La mayoría de la maquinaria empleada para quebrar la nuez emplea un compartimiento donde encierran la nuez para así poder ser aplastadas por las paredes que se encuentran a los costados. Las nueces son colocadas en un contenedor con un elevador que las levanta de una por una para introducirlas en el compartimiento donde son quebradas.

3. Descascarado. Mediante este proceso se separa la carne de la cáscara por medio de sopladoras o aspiradoras de aire.
4. Separación. Las carnes de nuez pasan rápidamente por una plataforma vibradora con agujeros de diferentes tamaños con el propósito de separar los diferentes tamaños de nuez que se obtuvieron.
5. Empaque y almacenamiento. Las carnes de nuez pasan por la estación de inspección (visual o electrónica) que separa material ajeno a la nuez para posteriormente ser almacenadas en cajas que contienen bolsas de plástico en conjuntos de 10 Kg. La nuez pelada debe ser almacenada a temperaturas bajas para que no pierda sus propiedades, por lo que es necesario un almacén frío (National Pecan Shellers Association, 2007).

2.2.1.4. Producción y comercialización de los frutos secos

En México los frutos secos que presentan mayor porcentaje de producción y consumo son los cacahuates y las nueces, ésta última en las variedades pecanera y de castilla. El cacahuete para México es una especie apreciada por sus cualidades para la alimentación en áreas rurales, resistencia a la sequía, para conservar la fertilidad del suelo al incorporar nitrógeno atmosférico, para asegurar ingresos económicos a familias con economías limitadas y por sus varios usos industriales. La producción de cacahuete ha estado estrechamente relacionada con la superficie cosechada, sufriendo una notable caída después del año 2000. Mientras que en el año mencionado la producción alcanzó 142,216 ton, en el año 2006 llegó hasta 68,243 ton, lo que representó una disminución de 52.0 %. Posteriormente, la producción se recuperó ligeramente, alcanzando en 2009 las 85,502 ton, lo que significa un incremento de 25.3 % respecto al 2006 (Tabla 2) (Financiera Rural, 2011).

Tabla 2. Producción de cacahuete en México

Año	Superficie (Miles Ha)		Producción (Miles Ton)	Rendimiento			Precio Medio Rural (\$)	Valor de la Produc. (Millones \$)
	Sembr.	Cosech.		Riego (R)	Temp. (T)	R+T		
2000	92.7	98.1	142.2	2.43	1.37	1.55	4,774.0	678.9
2001	80.2	79.4	119.5	2.55	1.33	1.51	4,983.3	595.6
2002	64.0	62.0	74.6	2.49	1.03	1.20	4,407.4	329.0
2003	50.7	50.2	91.6	2.95	1.63	1.82	4,672.5	428.1
2004	67.2	65.5	98.9	2.52	1.36	1.51	5,504.7	544.6
2005	65.5	48.0	72.9	2.80	1.23	1.52	5,346.4	389.5
2006	45.7	44.9	68.2	2.77	1.35	1.52	5,680.9	387.7
2007	54.2	52.2	82.8	2.49	1.45	1.59	6,228.9	515.8
2008	53.1	52.0	80.7	2.73	1.39	1.55	6,847.2	552.8
2009	55.5	51.3	85.5	2.87	1.39	1.67	7,958.4	680.5
2010/e	54.2	51.9	86.6	N/D	N/D	1.67	N/D	N/D

Fuente: Con datos de SIAP-SAGARPA. e/Cifras estimadas.

El rendimiento ha crecido gradualmente alcanzando hoy en día un promedio de 1.67 ton por hectárea, lo que representa 428 kg más por unidad sembrada que hace veinte años. Es importante mencionar que el año en que México obtuvo la mayor producción de cacahuete fue en 1983, en que se generaron 170,433 ton, lo cual se debió a la eficiencia alcanzada en la producción promedio en el país, que llegó a 2.04 ton/ha, lo cual hoy en día solo es posible lograr en con la producción de riego (Financiera Rural, 2011).

La balanza comercial del cacahuete presentó entre los años 2000 y 2010 cifras negativas a tasas crecientes, debido a la tendencia a la baja de las exportaciones y al incremento en las importaciones. Por lo anterior, el índice de seguridad alimentaria, medido como aquella parte del consumo aparente que se satisface con la producción nacional, ha disminuido, ya que mientras que en el año 2000 se importó un 37.3 % del consumo, para el año 2010 se importó el 56.9 % (Financiera Rural, 2011).

Por otra parte, el cultivo de nuez pecanera en México es una actividad cuyo crecimiento presenta tendencias positivas, principalmente en estados del norte del país, esto gracias a la basta adaptación climática y edafológica, así como por las condiciones de mercado y atractiva rentabilidad que presenta la cercanía del mercado estadounidense. El estado de Coahuila cuenta con 13 mil hectáreas con el cultivo distribuidas en toda la entidad, siendo así, centro de origen del mismo (Castillo *et al.*, 2013).

El nogal pecanero es originario del sureste de EE.UU. y del norte de México (Gray, 1973). Las primeras plantaciones comerciales iniciaron a partir de 1871. La introducción de plantaciones comerciales en México sucedió en 1904, en el estado de Nuevo León. Medina y Cano (2002) mencionan que los españoles denominaron “nogal” al árbol pecanero y por ende, a su fruto le denominaron “nuez pecanera”. En diferentes regiones del país se le conoce bajo el nombre de “nuez cáscara de papel” (Toole, 1965; Brison, 1985). En EE.UU., las áreas productivas abarcan desde el suroeste de Ohio hasta Kentucky y Alabama. El cultivo rara vez crece en suelos planos mal drenados (Nelson, 1965; Adams y Thielges, 1977; Eliosa- Martínez, 2012); y puede encontrar condiciones favorables en el noreste y parte central de México (Herrera y Clevenger, 1996).

En el estado de Coahuila el cultivo de nogal representa gran relevancia, debido a que la región norte del estado forma parte del centro de origen de esta especie. En la Tabla 3 se presenta la producción de nuez en México a nivel de entidades federativas del año 2010.

Tabla 3. Producción nacional de nuez correspondiente al año 2010

Estado	Superficie cosechada (ha)	Producción (T)	T/ha¹
Aguascalientes	177	342.4	1.93
Coahuila	12,910	10247.5	0.79
Chihuahua	39,420.6	38,764.9	1.01
Durango	4,069.8	3,652.1	0.9
Guanajuato	86	92.6	1.08
Hidalgo	738.7	2,389.2	3.23
Nuevo León	3,807.3	1,679	0.44
San Luis Potosí	122	466	3.85
Sonora	7,437.5	16,102.9	2.16

Tamaulipas	89.5	165.6	1.85
Zacatecas	43	69.8	1.62
Total nacional	69,548.8	76,627	1.1

Fuente: SAGARPA-SIAP, 2012.

En EE.UU., durante el período 1993-2003 la producción de nuez pecanera disminuyó 22.7 % (ERS-USDA-NASS, 2005) observándose así una variación muy pronunciada en dicho periodo. En México, durante ese mismo periodo, la producción aumentó 49.2 % observándose incremento permanente en su producción (SAGARPA-SIACON, 1980-2010). En conjunto, México y EE.UU. aportan 95 % de la producción mundial de nuez pecanera; otros países cuya producción de este fruto es destacable son: Australia, Israel, Perú y Sudáfrica (Johnson, 1997 y USDA-FAS, 2008). Según estudios realizados por el FIRA (1993) en México se presentan problemas de acceso a mercado y precios de venta debido a la poca penetración de mercados y la sobreoferta de nuez. Desde principios de los años noventa, la cadena de comercialización de nuez pecanera incorporó grandes volúmenes de exportación a EE.UU., por lo cual se ha reducido la aglomeración de la nuez en el lugar de origen y se presentan, así, situaciones prolongadas de venta. México se convirtió, en su totalidad, en un país exportador de nuez. En 2002 EE.UU. importó desde México el 98 % de nueces con y sin cáscara (ERS-USDA-NASS, 2005). Se estima que en el mismo año, las nueces exportadas a México desde EE.UU. representaron el 43 % del total, ya que en nuestro país se realiza el proceso mediante el cual la nuez se descascara; de esta forma dichos volúmenes se reexportan a EE.UU. como nueces descascaradas (Sangerman- Jarquín *et al.*, 2009).

2.2.2. Frutos deshidratados

2.2.2.1. Descripción de los frutos deshidratados

La deshidratación es quizá uno de los medios más eficaces para extender la vida útil de alimentos preceaderos. El principal objetivo de la deshidratación es el eliminar la humedad del producto para que así su nivel de A_w sea lo suficientemente bajo (menor o igual a 0.6) para detener el deterioro, el desarrollo de microorganismos patógenos y otras reacciones relacionadas con el deterioro.

La deshidratación reduce de forma significativa los costos de transporte y almacenamiento de los productos dada la significativa reducción de peso y volumen de los productos, además de que la refrigeración se vuelve innecesaria. Este método de conservación resulta eficaz para la preparación de ingredientes alimenticios usado en productos tales como mezclas secas de sopas, platillos congelados, alimentos infantiles y productos lácteos, o directamente como mezclas en condimentos (Somogyi y Luh, 1988).

El secado al sol se ha empleado desde la antigüedad en la producción de alimentos deshidratados. Resulta un método barato pero se basa en las condiciones climáticas y tiempos de exposición largos. De igual forma se ha trabajado en el desarrollo de métodos que permitan acortar los tiempos de secado así como el costo que pudieran representar. La opción más apropiada entre los procesos depende de los atributos deseados de los productos finales, la forma de suministro de energía en el lugar de procesamiento, los tipos de materias primas empleadas para el secado y el capital y costos operativos de dichos sistemas (Hui *et al.*, 2004).

2.2.2.2. Composición de los frutos deshidratados

Durante la desecación de la fruta fresca, su contenido en agua se reduce, lo que da lugar a la concentración de los nutrientes. El valor calórico de las frutas desecadas es elevado (desde las 163 calorías cada 100 g de las uvas secas a las 264 calorías de las uvas pasas) por su abundancia en hidratos de carbono simples. Son muy buena fuente de potasio, calcio, hierro y de provitamina A (beta-caroteno) y niacina. La vitamina C se pierde en mayor cantidad en la fruta fresca durante el proceso de secado. Representan una excelente fuente de fibra soluble e insoluble, lo que le confiere propiedades saludables para mejorar el tránsito intestinal. El aprovechamiento del calcio proveniente de estos alimentos es menor que el que procede de los lácteos u otros alimentos fuente de este mineral. (Fundación Eroski, 2014).

El potasio es necesario tanto para transmitir como para generar el impulso nervioso, para una actividad muscular normal, y además interviene en el equilibrio de agua dentro y fuera de la célula. La vitamina A (proveniente del beta-caroteno) es esencial para la visión, el buen estado de la piel, cabello, mucosas, huesos y para el buen funcionamiento del sistema inmunológico, además de tener propiedades antioxidantes. El magnesio se relaciona con el funcionamiento de intestino, nervios y músculos, con la formación de huesos y dientes, además de poseer un efecto laxante moderado. La vitamina B3 (niacina) interviene en diferentes etapas del metabolismo y de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos, entre otras sustancias (Fundación Eroski, 2014).

2.2.2.3. Procesamiento de frutos deshidratadas

El secado es una de las tecnologías de preservación disponibles para mantener la frescura de frutas durante largos periodos de tiempo sin que éstas presenten cambios detectables a simple vista; sin embargo, este proceso puede propiciar cambios en las frutas tanto a nivel físico como a nivel bioquímico, ocasionando encogimiento y cambios de color, textura, sabor, entre otros. Si la actividad de agua se reduce a niveles apropiados (dependiendo de la variedad de la fruta y su contenido de azúcar), el producto deshidratado puede tener una vida de anaquel mayor a un año si es correctamente empacado. Las frutas se pueden secar enteras (uvas, bayas, albaricoque, ciruela, etc.), en rebanadas (plátano, mango, papaya, kiwi, etc.) o en forma de puré (mango, albaricoque, etc.); la selección del método y equipo para realizar el proceso de secado de la fruta depende de la geometría de la misma (Ratti y Mujumdar, 2005).

Los pasos a los cuales se someten las frutas frescas en procesos de producción de frutas de alta humedad (FAH) y frutas de humedad intermedia (FHI) tienen un alto impacto en la flora de la fruta fresca, ya que algunos de estos procedimientos remueven o inactivan muchos de los microorganismos que posiblemente puedan estar presentes, sin embargo, otros pueden tener un efecto opuesto. Por tanto, mientras que el proceso de lavado puede remover muchos

organismos superficiales, otras operaciones como el pelado y el cortado pueden causar la exposición de fluidos tisulares internos al ambiente externo, otorgando así nuevas formas de entrada a microorganismos y demás contaminantes (Tapia de Daza *et al.*, 1995).

La protección contra la contaminación, el control del desarrollo microbiano antes y durante el proceso de desecación deben ser rigurosos. La selección del método de desecación es fundamental, ya que un proceso de secado al sol, en general, tiene una demora de varias horas, por lo cual se puede propiciar en algún grado el desarrollo de actividad microbiana. Una ventaja del procesamiento mecánico es la manipulación tanto de temperatura como tiempo de exposición del producto.

Como parte del proceso algunas frutas se exponen a SO₂ con lo cual se previene el daño por oscurecimiento enzimático y a su vez se inhibe la población microbiana no esporulada. Los productos que no han sido tratados con SO₂ son más susceptibles a propiciar el crecimiento de hongos. En el caso particular de higos se ha reportado el hallazgo de aflatoxinas (10-165 mg/Kg) en una proporción de 1-29% de las unidades examinadas (ICMSF, 1998).

El jitomate deshidratado se puede categorizar en: pasta de jitomate y derivados, jitomate en polvo y jitomate deshidratado. La pasta de jitomate es considerado un producto semi-terminado ya que comúnmente es empleado como ingrediente en otros productos tales como la pizza o pastas. Además, este producto se emplea como ingrediente en la elaboración de salsa de jitomate y jitomate en polvo. Los jitomates totalmente deshidratados usualmente se rehidratan antes de su uso o simplemente se añaden en recetas que incluyen agua con lo cual se suavizan. Los jitomates semideshidratados están ganando popularidad como vegetales gourmet; son empleados principalmente como ingredientes en saladas, pastas y pizzas o se ofertan como "jitomates rostizados". Estos productos son producidos a partir de jitomates frescos que se someten a un secado variando el contenido de humedad de un aproximado del 35 % a un 10 % para jitomates completamente deshidratados (Hui *et al.*, 2004).

En la actualidad, los jitomates sometidos a secado al sol han ganado gran aceptación dentro del segmento de servicios alimentarios así como en la industria alimentaria al emplearlos como ingrediente; sin embargo, las industrias que emplean el secado al sol se enfrentan a dificultades al querer producir jitomates secos de calidad consistente (Latapi y Barrett, 2006). El secado al sol requiere de 7 a 12 días y como resultado se obtiene un producto de sabor robusto y con un contenido de humedad de entre 12 a 24 %. Estos productos tienden al oscurecimiento durante el almacenamiento, lo cual es típico dentro de los 9 a 12 meses (Ecom, 1997). En países en vías de desarrollo, uno de los principales objetivos del secado al sol es la reducción de las pérdidas post cosecha (Olorunda *et al.*, 1990), mientras que en países desarrollados, los jitomates secados al sol se consideran como un ingrediente “gourmet” (Sloan, 1999). El jitomate puede ser deshidratado ya sea empleando energía solar o sistemas mecánicos. El secado al sol es un proceso lento en comparación a otros métodos, sin embargo, se dice que esta forma de secado es la que le otorga su distintiva calidad. Este procesamiento permite la concentración de sabores previniendo pérdida de compuestos volátiles y la caramelización de azúcares presentes en el jitomate de forma natural, evitando así un retrogusto dulce o quemado y la indeseable coloración café que pudieran ser efectos secundarios del empleo de otros métodos (TDF, 1999; Valley Sun, 2000); además, aumenta tanto el buen color como la textura inicial, así como la traslucidez y el brillo (Mrak *et al.*, 1946). Al igual que otros productos provenientes de la agricultura, los jitomates son alimentos perecederos y deben ser consumidos casi inmediatamente pero dado a que no todos los jitomates frescos se pueden consumir inmediatamente a la cosecha, los procesos de conservación ofrecen un mercado más amplio, con lo cual los consumidores tienen la opción de comprar el producto durante todo el año.

A manera de ejemplificar el procesamiento que reciben los jitomates, se presenta su procesamiento según Hui *et al.*, 2004 (Diagrama de flujo en Anexo I-B).

2.2.3. Chocolate

2.2.3.1. Descripción del chocolate

Los granos de cacao son semillas del árbol *Theobroma cacao*. Cada semilla se conforma por dos cotiledones recubiertos por cáscara. Los cotiledones almacenan los nutrientes necesarios para el desarrollo de la planta y dar así, lugar a las primeras hojas en la etapa de germinación de la semilla. El almacenamiento de nutrientes se realiza en forma de manteca de cacao, (casi la mitad del peso seco de la semilla). La cantidad de grasa y sus propiedades (punto de fusión y dureza) dependen de la variedad de cacao y de las condiciones ambientales a las cuales se expone la semilla (Food-Info, 2014).

El proceso de fermentación causa diversos cambios químicos tanto en la pulpa que las rodea como dentro de las mismas. Dichos cambios conducen al desarrollo del sabor a chocolate y al cambio de color de las semillas. Posteriormente las semillas se someten a secado y se envían a la planta de procesamiento como materia prima para la producción de masa de cacao, cacao en polvo y manteca, entre otros productos.

La grasa o manteca de cacao puede ser extraída del grano de diversas formas. La manteca pura se extrae a partir de la masa de cacao mediante prensas horizontales. La manteca de cacao obtenida por presión de los granos presenta entre sus propiedades: fácil fracturamiento por debajo de 20 °C, punto de fusión cercano a los 35 °C con suavización de textura alrededor de los 30 – 32 °C (Food-Info, 2014). El polvo de cacao se forma también a partir de la masa de cacao. Se emplean prensas específicas para remover parte del contenido graso y obtener el material sólido denominado pasta de cacao prensada. Dicha pasta es triturada para obtener el polvo de cacao. El proceso puede dar como resultado polvo de cacao de diversas composiciones y con diferentes niveles de grasa (Food-Info, 2014).

2.2.3.2. Composición del chocolate

Se debe considerar que la composición del producto varía según el tostado, la alcalinización y el tipo de prensado elegido (Tabla 4).

Tabla 4. Composición aproximada del polvo de cacao.

Característica	Contenido
Porcentaje de humedad	3.0
pH (suspensión al 10 %)	5.7
% Cenizas	5.5
% Cenizas solubles en agua	2.2
% Alcalinidad de cenizas solubles en agua en el cacao original, expresado como K ₂ O	0.8
% Fosfato (expresado como P ₂ O ₅)	1.9
% Cloro (expresado como NaCl)	0.04
Cenizas insolubles en HCl 50 %	0.08
% Cáscara (calculado a partir de granos sin cáscara no alcalinizados)	1.4
Nitrógeno total	4.3
% Nitrógeno (corregido por alcaloides)	3.4
Proteína	
% Nitrógeno corregido por alcaloides x 6.25	21.2
% Teobromina	2.8

Fuente: Food-Info, 2014.

2.2.3.3. Procesamiento del chocolate

Los granos de cacao tienen un sabor ácido, por lo que para obtener cacao con color y sabor chocolate, éste se debe someter a procesos de fermentación, tostado y secado. Durante la fermentación participan microorganismos presentes de forma natural en los granos, las levaduras son los primeros microorganismos en actuar. Posteriormente actúan las bacterias lácticas y, finalmente, bacterias acéticas, del género *Bacillus* y del género *Enterobacteriaceae*. Esta fermentación es de suma importancia, ya que modifica los granos, se elimina el mucílago y se prepara el grano para las enzimas encargadas de modificar su color, sabor y olor puedan interactuar con él y se produzcan así compuestos de sabor. La

fermentación es una etapa del procesamiento del grano de cacao, que requiere de mucha más investigación, ya que sigue siendo bastante empírica. (Wacher, 2011).

Los microorganismos fermentan la pulpa, la cual contiene glucosa, fructosa y sacarosa y un pH entre 3.3 y 4.0, dado el contenido de ácido cítrico. La pulpa es altamente viscosa dado su contenido en pectina y polisacáridos que dificultan la difusión del aire. El proceso puede ser natural o espontáneo, ya que no se añaden microorganismos a los granos. De ocurrir, la contaminación se da con microorganismos provenientes de las superficies con las que entran en contacto: utensilios y manos de manipuladores del cacao (Wacher, 2011). En la Figura 1 se describen los distintos procesos de manejo del cacao para la producción de chocolate según la casa productora “Cortés Chocolate”, 2014.

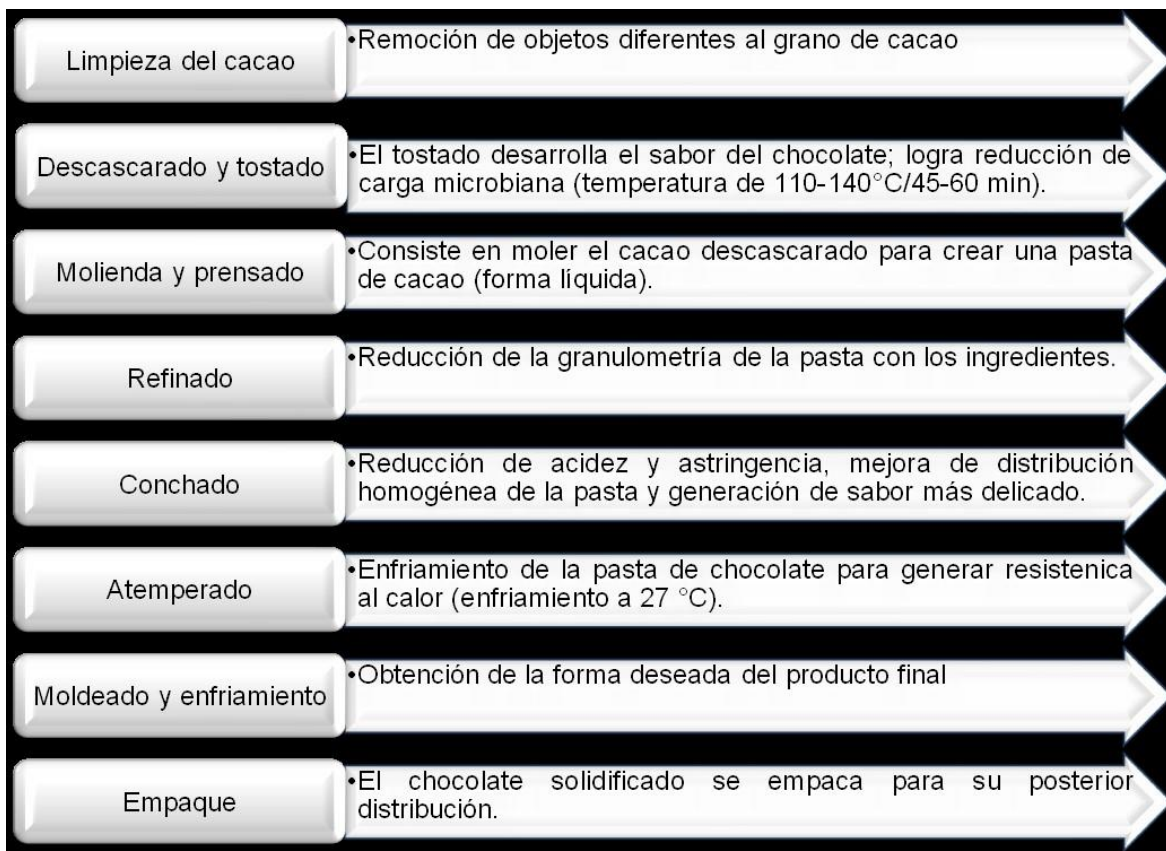


Figura 1. Diagrama de producción de chocolate

2.2.3.4. Producción y comercialización del chocolate.

México ocupa el décimo primer lugar en el mundo como productor de cacao con 2.45 % del total mundial, siendo nuestro país un importador neto. En la década de los noventa acumuló importaciones por un total equivalente a 31 mil toneladas de grano (62 millones de dólares), por otro lado, las exportaciones alcanzaron las 15 mil 500 toneladas de grano de cacao y productos derivados, (26.3 millones de dólares) (González, 2005).

Tomando en cuenta las importaciones de cacao respecto del consumo, la agrocadena de valor del cacao en México presenta limitantes para su competitividad. Actualmente se importa cerca del 50 % del consumo de cacao en diversas formas (golosinas, bebidas, polvo, etc.) (González, 2005).

El cacao mexicano, no puede competir en el mercado internacional ya que existe desabasto interno y mayoritariamente, el grano no cuenta con la calidad requerida por normas internacionales; además, los costos de producción son elevados comparando con otros ofertantes. (González, 2005). La industria en México está conformada por 213 empresas, de las cuales, ocho dominan el mercado de volumen. La mayoría, se encuentran afiliadas a la Asociación Nacional de Fabricantes de Chocolate, Dulces y Similares, en conjunto, anualmente procesan 67 mil 231 toneladas de cacao, sin embargo, por su capacidad de molienda, dominan tres: INCATABSA, AMSA y Nestlé (González, 2005).

2.3 Microbiología de los alimentos de baja actividad de agua

2.3.1. Microbiología de los frutos secos

En general, se considera que los alimentos con una baja actividad de agua, como es el caso de los frutos secos presentan un bajo riesgo de transmisión de enfermedades, ya que el valor de éste parámetro es demasiado pequeño como para sustentar el crecimiento microbiano. El porcentaje de humedad de la almendra y de nueces recién cosechadas varía entre 15 y 20 %; éste valor disminuye hasta 3 o 4 % después del secado, dicho proceso proporciona un nivel de actividad de agua (A_w) en las almendras de 0.7 o menos. Por debajo de este valor se puede prevenir el crecimiento microbiano (Douglas y Lindsay, 1992). Esto puede llevar a la idea equívoca de que bajos niveles de bacterias patógenas en frutos secos no representan un problema desde el punto de vista de la inocuidad microbiana. Sin embargo, la nuez es muy susceptible a una diversidad de microorganismos dada su riqueza en nutrientes, Según datos obtenidos por la FAO (2012), se han reportado cada vez más casos en los que patógenos transmitidos por los alimentos, entre ellos *Salmonella* y *Escherichia coli* enterohemorrágica, han causado enfermedades cuando están presentes en niveles muy bajos, esto es, para que se produzca una enfermedad no es necesario que ocurra un crecimiento microbiano; además, una vez ingeridos, el

alto índice de grasa de los frutos secos puede proteger a los patógenos de los ácidos gástricos lo que permite el paso de organismos viables al intestino.

Por la naturaleza y prácticas de manejo durante su distribución y comercialización, este tipo de alimentos está expuesto a diversas condiciones que favorecen la contaminación microbiana, tales como condiciones climáticas, polvo, animales, temperatura y condiciones inadecuadas de almacenamiento. Todos estos factores afectan la calidad microbiológica de las nueces. Los dos grupos microbianos que contaminan y que eventualmente pueden ocasionar deterioro en este tipo de alimentos son hongos y bacterias (Vázquez, 1998).

El número de microorganismos presentes en los frutos secos depende principalmente de las condiciones de cosecha, transporte, procesamiento, almacenamiento y comercialización. Douglas y Lindsay (1992) reportaron que las almendras de nueces de cáscara dura presentan mayores cargas microbianas que las de cáscara blanda. La contaminación microbiana puede disminuir controlando los factores que la favorecen; una medida extrema es la eliminación de las nueces contaminadas.

Bajo condiciones normales, la contaminación de las almendras por bacterias no representa grandes problemas, ya que éstas no son capaces de crecer en los bajos niveles de actividad de agua de estos productos. Sin embargo, se tienen registros de la presencia y eventual ataque por bacterias en las nueces, desde el momento en que éstas comienzan a desarrollar y madurar en el árbol, hasta el momento en que son consumidas. Los géneros predominantes son: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Xanthomonas*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* (Chiple y Heaton, 1971; Marcus y Amling, 1973; Beuchat y Heaton, 1975).

Varios son los géneros de hongos que pueden invadir las nueces desde primeras etapas de desarrollo en el árbol hasta el momento de su procesamiento y consumo. Estos microorganismos pueden contaminar, desarrollar o permanecer en las nueces causando diversos daños al reducir su viabilidad y afectar su

calidad nutricional, comercial y sanitaria. Este último efecto se asocia con la producción de sustancias tóxicas para el hombre y los animales. Estas sustancias, conocidas como micotoxinas generan intoxicaciones resultantes a su consumo, micotoxicosis (Vázquez, 1998). Cabe mencionar que tratamientos que resultan efectivos al disminuir significativamente los niveles de aflatoxinas (solución de bisulfito de sodio al 1 % con 0.2 % de peróxido de hidrógeno, o exposición a 2 g/Kg de SO₂ más 0.2 % de peróxido de hidrógeno y calentamiento a 65 °C) a nivel laboratorio, no se han encontrado aplicaciones industriales generalizadas (Escartín, 2008).

Hanlin *et al.*, en la Universidad de Georgia (citados por Vázquez, 1998) realizaron, en los años 70's, un trabajo sobre la micología de las nueces. En dicho trabajo encontraron que los frutos jóvenes de nuez son invadidos por una variedad de hongos tan pronto comienzan su desarrollo en el árbol. Los hongos que encontraron en la almendra fueron muy similares a los que encontraron en la cáscara, lo que sugiere que la invasión de la semilla se lleva a cabo mientras la almendra está aún en el ruezno (corteza exterior), de manera que los hongos están presentes en la almendra de la nuez, en la cáscara y el ruezno a lo largo del desarrollo del fruto. Beuchat (1994) reportó que en los frutos maduros, cerca del 100 % de las almendras contienen hongos.

Los géneros de *Phoma*, *Alternaria* y *Pestalotia* son los hongos más comunes en el ruezno. Las especies prevalentes en la cáscara son *Pestalotia*, *Fusarium* y *Cladosporium*, mientras que *Cladosporium*, *Fusarium* y *Penicillium* predominan en las almendras. En nuez pecanera recién cosechada, las especies de *Penicillium* fueron las más comunes, seguidas por especies de *Aspergillus*, *Pestalotia*, *Rizhopus* y *Fusarium* (Joffe, 1969; Chipley y Heaton, 1971; Beuchat, 1975; Beuchat y Heaton, 1980; King y Schade, 1986). Estos hongos son representativos de la microflora normal en la nuez pecanera. Después del almacenamiento, las muestras de nuez obtenidas del mercado contienen *Aspergillus* como el género dominante, seguido de *Penicillium*; a estos hongos comúnmente se les denomina hongos de almacén (Christensen, 1976).

Se estima que existen diversas fuentes de contaminación de *Salmonella* y *E. coli* enterohemorrágica en frutos secos; la contaminación ocurre principalmente en los huertos. En el caso de la nuez, muchos frutos se recolectan directamente del suelo después de que los árboles se sacuden (mecánica o manualmente), o al ser cortados manualmente del árbol y tirados al suelo o al caer de manera natural desde el árbol, lo que da lugar a su contacto con el suelo y restos vegetales. Como consecuencia los contaminantes recogidos en la cosecha pueden propagar a las partes comestibles antes o durante el descascarillado. La humedad puede representar un importante factor para aumentar el efecto de los contaminantes, por ejemplo, en caso de que el producto recolectado o seco no esté protegido del agua de riego o lluvias. Se considera al agua empleada como un factor relevante, ya que se puede usar directamente en la manipulación pos cosecha de algunos tipos de frutos, para eliminar las cáscaras o ablandarlas antes de romperlas. La difusión de contaminantes se puede producir cuando los frutos están expuestos a agua reciclada sin tratar (FAO, 2012).

2.3.2. Microbiología de los frutos deshidratados

El bajo pH y la naturaleza del ácido orgánico presente en el fruto, seleccionan el crecimiento de los microorganismos ácido tolerantes, tales como hongos y levaduras (predominantemente hongos) y bacterias lácticas. Las levaduras, si bien están presentes en gran número junto con los hongos sobre la superficie de frutas frescas, no poseen los mecanismos necesarios para invadir los tejidos de las plantas, por lo tanto se convierten en agentes secundarios de deterioro (Alzamora *et al.*, 1995). Diversos hongos producen micotoxinas en las frutas antes y después de la cosecha (por ejemplo patulina), las bacterias patógenas no pueden proliferar en las frutas debido a su bajo pH, pero pueden sobrevivir durante tiempo suficiente para causar enfermedad. Algunas enfermedades ocasionales causadas por patógenos o toxinas bacterianas en frutas (salmonelosis, hepatitis A, botulismo infantil, listeriosis) han sido adjudicadas, en mayor parte, a la contaminación por exposición del alimento a desechos animales o humanos o a agua de irrigación contaminada (FAO, 2004).

La procedencia de la fruta y sus condiciones de crecimiento determinan la microbiota del producto, los patógenos que pueden causar enfermedad durante el crecimiento, su incidencia y también el deterioro pos cosecha. Como las superficies expuestas de la fruta se contaminan a través del suelo, agua, aire, animales, insectos, excrementos, etc., y luego a través del contacto con el equipo de procesamiento, deben también considerarse a los microorganismos provenientes de dichas fuentes.

Los procesos de secado son agresivos para las formas vegetativas de los microorganismos, sin embargo, no garantizan la obtención de productos libres de riesgos. Los microorganismos detectados con mayor frecuencia en verduras desecadas son: bacterias ácido lácticas, *Enterococcus faecalis*, estafilococos, esporas de *Bacillus* spp., levaduras y hongos (*Penicillium*, *Aspergillus*) (Escartín, 2008).

En el caso particular del jitomate la presencia de hongos resulta un importante indicador de baja calidad del producto en fresco manipulado en la planta procesadora. Según estudios realizados (Battilani *et al.* 1995), las especies de hongos asociadas con mayor frecuencia a jitomates deteriorados son *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Geotrichum candidum*, *Phoma lycopersici*, *Rhizoctonia solani* y *Rhizopus nigricans*. En estudios llevados a cabo previamente (Yeong *et al.*, 1996) observaron el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la calidad del jitomate y concluyeron que al mantener la temperatura de almacenamiento en un rango de 0 a 10 °C se puede minimizar el desarrollo de hongos, de igual forma demostraron que a 15, 20 y 25 °C el jitomate es susceptible a la contaminación por hongos. Existen reportes de varios brotes de gastroenteritis asociados al consumo de jitomates frescos contaminados con *Salmonella javiana* y *Listeria monocytogenes* (Ho *et al.*, 1986; Wood *et al.*, 1991).

La información previamente presentada refleja estudios realizados con jitomate fresco, sin embargo, en nuestro país se carece de información sobre la incidencia y/o comportamiento de patógenos en jitomate deshidratado a pesar de

ser un producto cuya venta se realiza en tiendas de autoservicio y tiendas de alimentos *gourmet*.

2.3.3 Microbiología del chocolate

El riesgo clave durante la elaboración del chocolate es *Salmonella*. Como se ha mencionado, en el chocolate, a pesar de ser un producto relativamente seco y con baja A_w , se ha demostrado la sobrevivencia de *Salmonella* por periodos más largos que incluso los presentados por otras matrices alimentarias, de hecho, se han reportado periodos de sobrevivencia hasta de varios años (Cordier, 1994).

Se han reportado brotes en los cuales se detectó la presencia de *Salmonella* en chocolate, por lo general en bajas concentraciones. Se tiene la hipótesis de que la parte lipídica del chocolate actúa como protección para las células del patógeno durante su paso por el ambiente ácido del estómago, permitiendo así la colonización de la parte baja del tracto gastrointestinal (D'Aoust, 1977). La contaminación del chocolate por *Salmonella* puede darse desde el procesamiento del mismo, a través de materia prima o por inadecuadas prácticas de higiene en la fábrica o en puntos de venta (Beckett, 2009).

2.3.4. Microorganismos patógenos en alimentos de baja actividad de agua.

2.3.4.1. *Salmonella*

El género *Salmonella* consiste de células que predominantemente son móviles en forma bacilar, gram negativas, no formadoras de esporas, pertenecientes al género *Enterobacteriaceae* y que pueden desarrollar en medio anaerobio o aerobio. En la naturaleza podemos encontrar a las bacterias de éste género en animales tanto de sangre fría como de sangre caliente, en los seres humanos y en el medio ambiente por lo general, incluido el suelo y el agua (D'Aoust, 1989). *Salmonella* spp. presenta un rango de pH para su desarrollo de 4 a 9, y un pH óptimo de 7 a 7.5. Puede desarrollar en un rango de temperaturas de 5 a 45 °C con un rango óptimo de crecimiento de 35 a 43 °C. El desarrollo es lento a temperaturas menores a 10 °C, y la mayoría de las cepas presenta dificultad

para su desarrollo a temperaturas por debajo de los 10 °C. Los frutos secos caen dentro de este rango óptimo de pH. *Salmonella* spp. se clasifica de acuerdo al serotipo; se han descrito más de 2,400 serotipos para el género (Almond Board of California, 2012). Dado que *Salmonella* spp. son bacterias vegetativas, no son tan resistentes al calor como aquellas formadoras de esporas. En condiciones favorables, *Salmonella* spp. puede crecer en el rango Aw de 0.94 hasta más de 0.99, siendo 0.99 el Aw óptimo para el crecimiento.

2.3.4.1.1. Salmonelosis

Se considera que todos los serotipos de *Salmonella* son patógenos a humanos. Sin embargo, la gravedad de la enfermedad varía en función de la virulencia de la cepa involucrada y de la susceptibilidad del huésped. La salmonelosis es una de las causas principales de enfermedades transmisibles por alimentos en los EE.UU., en donde en el 2008 se reportaron 16.2 casos por cada 100,000 habitantes según datos del Centro de Prevención y Control de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) (CDC, 2009a). La salmonelosis es una infección que consiste en síntomas como diarrea, dolor abdominal, escalofríos, fiebre, náuseas, vómitos, deshidratación y dolor de cabeza (D'Aoust, 1989). Entre las poblaciones susceptibles se encuentran los bebés, seguidos por los ancianos y personas inmunocomprometidas, y finalmente, la población en general. Los síntomas generalmente aparecen dentro de las 12 a 36 horas con un rango de 5 a 72 horas después de la ingesta del alimento contaminado. Los síntomas en personas saludables generalmente se manifiestan dentro de los 2 a 5 días, por lo general, la enfermedad es autolimitante. En un pequeño porcentaje de casos, pueden surgir complicaciones, incluidas la infección sistémica y la artritis reactiva, que pueden tener efectos discapacitantes a largo plazo. En general, el índice de mortalidad en los seres humanos por salmonelosis es bajo (< 1 %) pero puede ser tan alto como el 20 % dependiendo de la cepa. La dosis infectante depende de ciertas variables, entre ellas la cepa de *Salmonella* spp. ingerida, la susceptibilidad de la persona y el tipo de alimento consumido. Sin embargo se ha

demostrado que pequeñas cantidades como 20 células, causan enfermedad en humanos (FDA, 2009).

2.3.4.1.2. Persistencia de *Salmonella* en ambientes de cultivo

Uesugi *et al.* (2007) y Danyluk *et al.* (2007a) demostraron que *Salmonella* Enteritidis fagotipo 30 puede persistir en un solo almendral hasta por 5 años y que el mismo organismo puede crecer y persistir en el suelo de un almendral por extensos periodos de tiempo. Por otra parte, *Salmonella* es capaz de sobrevivir por semanas en ambientes acuáticos, incluyendo el agua de riego que se utiliza para los cultivos. Winfield Groisman (2003) demostraron que el organismo puede sobrevivir por meses en el suelo y en sedimentos. *Salmonella* Enteritidis fagotipo 30 puede crecer rápidamente a niveles altos en la cáscara de la almendra húmeda y en las lechadas de cáscara y puede sobrevivir al secado de las cáscaras, lo cual se puede convertir en una fuente de recontaminación durante el procesamiento de la almendra si no se controla adecuadamente (Uesugi y Harris, 2006). Se ha encontrado que *Salmonella* spp. coloniza y persiste en las cintas transportadoras (dependiendo del material de la cinta) y en varios tipos de telas por semanas (Stock *et al.*, 2007; Wilkoff *et al.*, 1969).

Se han encontrado diferentes serotipos de *Salmonella* en el entorno de producción de una planta de procesamiento de harinas oleaginosas, incluyendo el piso en donde se lleva a cabo el procesamiento, muestras de polvo, zapatos de los empleados, escobas, transportadores y otros lugares (Morita *et al.*, 2006). Las investigaciones también han demostrado que las plagas y roedores, aves, cucarachas y moscas pueden albergar, transmitir y ampliar la presencia de la *Salmonella* spp. en el ambiente (Shimi *et al.*, 1979; Kopanic *et al.*, 1994; Kapperud *et al.*, 1998; Meerburg y Kijlstra, 2007).

2.3.4.1.3. Prevalencia de *Salmonella* en frutos secos

Se ha descubierto que las almendras, al igual que la mayoría de los productos agrícolas como granos, especias, cacao crudo, entre otros, pueden

albergar a *Salmonella* y otros patógenos. De igual forma, se ha logrado observar que *Salmonella* spp. sobrevive en pecanas, cacahuates, pistachos, semillas secas comestibles (ajonjolí, alfalfa, melón, girasol, lino), nueces de Brasil, avellanas, nueces de macadamia, nueces y almendras (Beuchat y Heaton, 1975; Riyaz-Ul-Hassan *et al.*, 2003; Kirk *et al.*, 2004; Isaacs *et al.*, 2005; Danyluk *et al.*, 2007b; Eglezios *et al.*, 2008; Vural y Erkan, 2008; FDA, 2009a; FDA, 2009b; Little *et al.*, 2009a; Little *et al.*, 2009b Willis *et al.*, 2009). Eglezios *et al.* (2008) y Little *et al.* (2009b) demostraron una incidencia de *Salmonella* de 1.7 % en almendras crudas, de igual forma, demostraron un índice de aislamiento total de 0.87 % +/- 0.2 % de muestras de almendras crudas de California tomadas en un periodo de 5 años. En este último estudio se pudo observar que *Salmonella* spp. se presentó en niveles bajos en muestras positivas.

2.3.5. Virus

Los virus son como partículas infectantes desprovistas de capacidad de crecimiento, nutrición, respiración o cualquier otro mecanismo para la obtención de energía y autoreplicación; además de la imposibilidad que presentan para la generación de toxinas. En la célula afectada (animal, vegetal o bacterias), toda la maquinaria genética y bioquímica queda bajo control del virus. En lo sucesivo la célula (con sus propios recursos), es inducida a sintetizar partículas virales, por lo tanto la única forma de existencia activa es intracelular. La célula afectada puede morir como consecuencia de la infección; también es posible que sobreviva a la replicación del virus, e incluso que reasuma sus funciones normales (Cliver, 1990).

Como se hemos visto, los virus son parásitos obligados de los seres vivos. Los virus que afectan al hombre y son transmisibles por el agua y alimentos, son arrojados al medio ambiente a través de la materia fecal, y en algunos casos del vómito. Las partículas eliminadas se pueden mantener infectantes por periodos variados en diversos materiales. (Sekla *et al.*, 1980).

El consumo de alimentos contaminados con material fecal ha comenzado a ser reconocido como una predominante vía de transmisión de virus entéricos

humanos, los cuales se han convertido en una creciente preocupación de salud pública. Según datos del CDC, el virus de la Hepatitis A se encuentra en el cuarto lugar como agente causal de ETA; así mismo, recientes proyecciones epidemiológicas indican que los norovirus pueden ser causantes del 60 % de todas las ETAs en EE.UU. (Mead *et al.*, 1999). Ambos grupos de virus se encuentran inmersos en las heces de humanos y su transmisión se da por vía fecal-oral. Las principales rutas de contaminación de alimentos con estos virus incluyen, en primer lugar a los moluscos cultivados en estuarios contaminados con materia fecal; en segundo lugar a frutas o vegetales regados o lavados con aguas negras; y en tercer lugar, alimentos contaminados por manipuladores durante su preparación (Jaykus, 2000a). Adicionalmente se ha observado que norovirus se puede transmitir mediante los aerosoles generados en el vómito, situación que contribuye a un alto grado de transmisión secundaria (Marks *et al.*, 2000; Patterson *et al.*, 1997).

El género norovirus se encuentra relacionado con un amplio número de brotes de enfermedades causadas por alimentos, incluyendo el consumo de moluscos contaminados, hielo comercial, sándwiches, productos de repostería y ensaladas (Jaykus, 2000a). El reporte de previos brotes pone de manifiesto que virtualmente cualquier alimento se encuentra en riesgo de ser objeto de contaminación viral si se encuentra en contacto con materia fecal humana.

Existen diferentes motivos por los que la contaminación viral en alimentos es difícil de identificar, pero la principal es que rara vez se lleva a cabo. Para detectar la presencia de virus entéricos es necesario separar y concentrar los virus a partir de la muestra de alimento previo a la aplicación de métodos de detección tales como ensayos de infectividad de cultivos celulares, técnicas inmunológicas y moleculares ya que los niveles de contaminación en las muestras generalmente son bajos (< 10 unidades infecciosas por gramo de alimento) (Jaykus *et al.*, 2000b).

Cualquier alimento expuesto a contaminación fecal humana debe ser manejado como potencialmente contaminado con virus. Las hortalizas se

contaminan con virus intestinales al ser regadas con aguas negras no tratadas. De acuerdo con Murphy y Silvertone (1958) algunos virus animales pueden penetrar a través de las raíces y llegar a tejidos internos de las plantas.

2.3.5.1. Epidemiología de enfermedades virales

Los virus contaminantes en alimentos raramente son letales. El huésped dispone de cierta protección, no específica (basada en la síntesis de compuestos como el interferón), y específica (a base de anticuerpos). No obstante, se conocen casos de muerte por hepatitis fulminante (CDC, 1995).

En teoría, la ingesta de una sola partícula viral completa puede dar lugar a una infección humana. Sin embargo, la síntesis de ARN dependiente de ARN (como ocurre con los virus) es muy imprecisa y la mayoría de la descendencia es genéticamente atípica al finalizar el proceso de replicación; sólo una pequeña proporción de las partículas generadas es competente para infectar y mantener al virus con las características típicamente reconocidas (Cliver, 1994). Esta forma de infección se expresa como una diarrea infecciosa aguda, y encabeza la morbilidad y mortalidad en los países en desarrollo. Aún en países industrializados se observa como segunda causa de morbilidad en la infancia. Todos los grupos de edad son susceptibles y en ellos se presenta de manera esporádica y aguda. Por lo general, el padecimiento es auto limitado; ante una deshidratación severa, mayor es la letalidad, un estado de desnutrición favorece la severidad.

La infección intestinal por enterovirus suele ser asintomática. A la replicación inicial puede seguir una viremia que puede afectar otros órganos. La vía de excreción de estos virus es en su mayoría fecal; el número de partículas oscila entre 10^6 y 10^{11} /g. Los límites dependen en gran medida del tipo de recuento: partículas físicas, unidades formadoras de placas o unidades infecciosas (Cliver, 1994). La transmisión generalmente se realiza de persona a persona, pero en un número importante de casos esporádicos, y en muchos de los brotes, el agua y los alimentos tienen participación destacada.

2.3.5.2 Norovirus

Los norovirus son los representantes del grupo llamado virus pequeños-redondos-estructurados (SRSVs) incluidos en la familia Caliciviridae. Este tipo de virus también es conocido como virus Norwalk, nombre de la población en Ohio, EE.UU., en la cual se estudió un brote de gastroenteritis no bacteriana en 1969 (Adler y Zickl, 1969). Tiene una importante participación en los casos de diarrea endémica (CDC, 1990); más del 96 % de los brotes no bacterianos de gastroenteritis reportados, consistentes en náusea, vómito y diarrea, con duración de 1-3 días son causados por calicivirus humanos (Frankhauser y *et al.*, 1998). Se estima que el 66.6 % de todas las ETAs que se atribuyen a patógenos conocidos es causado por estos virus (Mead y *et al.* 1999).

Norovirus carece de una envoltura viral, por lo cual se considera un virus “desnudo” siendo la cápside la capa protectora del material genético del virus. Por este motivo norovirus presenta mayor resistencia a ciertas condiciones ambientales tales como altas temperaturas, exposición a ácidos, proteasas, detergentes y a la desecación. Esto se debe a que la envoltura viral está compuesta principalmente de lípidos y algunas proteínas y glicoproteínas las cuales se mantienen estables sólo en soluciones acuosas y presentan mayor sensibilidad a bajo pH, altas temperaturas y a solventes; mientras que la cápside, cuya conformación es proteica, ofrece una mayor resistencia a dichos factores ambientales. Aunado a estos factores presenta fácil propagación a través de fómites, alimentos, manipuladores, etc. (Murray, 2002)

La sintomatología de la infección incluye náusea, fiebre, vómito, mialgias y diarrea sin sangre, que se presenta tras una incubación de 12 a 60 horas; probablemente es dependiente de la dosis de virus ingerida. En general se considera una gastroenteritis moderada y auto limitada con duración de uno o dos días (Appleton, 1994). El virus sale del hospedero mediante el vómito y la materia fecal; hasta 2 días después de la desaparición de los síntomas puede extenderse el periodo de su expulsión. La tasa de ataque suele ser mayor a 50 %. No observa

inmunidad tras una infección, incluso en personas que muestran anticuerpos circulantes. La incidencia es más común durante el invierno.

Los vehículos identificados en los brotes incluyen bivalvos, agua, hielo, ensaladas, hamburguesas, papas fritas, sándwiches de jamón y pasteles con crema (Schwab *et al.*, 2000). La infección provoca la formación de anticuerpos circulantes y locales en el intestino pero no parece existir relación entre los niveles de anticuerpos y la susceptibilidad a la infección (Appleton, 1994). Una diferencia interesante respecto a los rotavirus, es que no se observa alguna variación estacional en las infecciones. Es típico observar en los brotes por norovirus una elevada tasa de ataque entre los adultos, con vómito común, corta duración del padecimiento y ausencia de agentes patógenos bacterianos en las heces de las víctimas (CDC, 1986).

La baja dosis infectante (< 100 partículas) facilita la propagación del padecimiento por diversas vías, además de la frecuencia con la que aparecen casos secundarios y terciarios en los brotes por alimentos reportados en la literatura. Asimismo, la expulsión de virus se puede presentar en individuos asintomáticos y convalecientes, lo que incrementa el problema de diseminación (CDC, 2001). Estos hechos se observan ocasionalmente en brotes que tienen origen en hoteles, asilos, escuelas, guarderías, centros de rehabilitación y otros sitios semejantes. Así, se ha observado que a veces los casos no ocurren de manera explosiva, sino extendidos en el tiempo, o bien en pequeños brotes muy próximos en el tiempo que sugieren vías de exposición distintas al consumo de un alimento común (Kuusi *et al.*, 2002; Love *et al.*, 2002).

Un lavado adecuado de las manos con agua y jabón puede eliminar los norovirus. La dilución 1:50 de las soluciones comerciales de cloro para blanquear es suficiente para inactivarlo mediante frotación vigorosa por 10 seg en superficies inertes (Escartín, 2008).

Debido a la diversidad antigénica de las cepas de norovirus no se observa una protección de nuevas infecciones en personas que han sufrido el

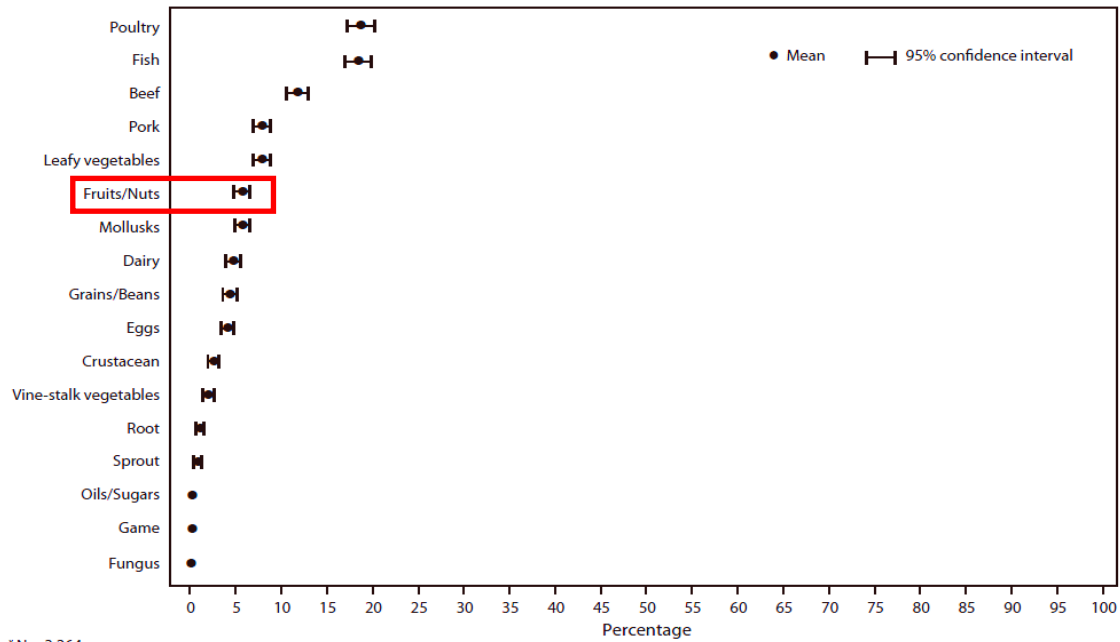
padecimiento. La tasa de ataque de la enteritis no es del 100 % entre quienes llegan a infectarse con el virus.

En la confirmación diagnóstica (CDC, 1997), además del cuadro de diarrea, dolor abdominal, vómito y cefalea, con incubación de 15 a 77 horas, tiene alta relevancia la observación directa de las heces al microscopio electrónico. En la actualidad se puede recurrir a inmunoensayos enzimáticos. Resulta de mayor sensibilidad el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa aplicada en las heces (Escartín, 2008), contra aproximadamente 10^6 /mL requeridas con la técnica de microscopio electrónico (Doane y Anderson, 1987).

2.4. Brotes de enfermedad asociados a alimentos de baja actividad de agua

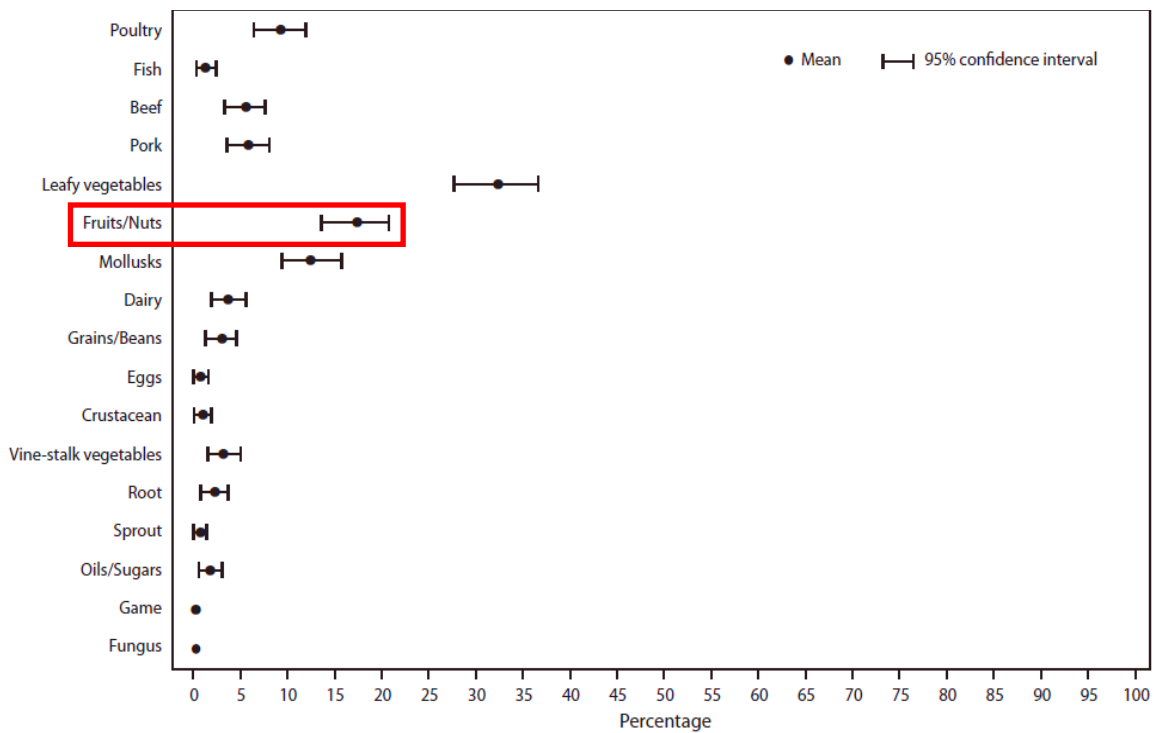
Durante el periodo 1998-2008 el CDC tuvo reporte de 7,998 brotes con un agente etiológico conocido, 3,633 (45 %) fueron causados por virus, 3,613 (45 %) por bacterias, 685 (5 %) por agentes químicos tóxicos, y 67 (1 %) por parásitos. De entre los 7,724 brotes reportados (5 %) que implicaron alimentos o algún ingrediente contaminado, 3,264 (42 %) se incluyeron a una de las 17 categorías de productos básicos predefinidos: pescado, crustáceos, moluscos, lácteos, huevo, carne de res, carne de cerdo, pollo, granos y semillas, aceites, azúcares, frutas y nueces, hongos, vegetales de hoja, vegetales de raíz, brotes y vegetales de vaina o tallo (Figura 2). Las frutas y nueces se ubicaron como el sexto grupo de alimentos que más frecuentemente se relaciona con enfermedades transmitidas por alimentos (Gould *et al.*, 2013).

De acuerdo con el CDC en el mismo periodo, el número de brotes confirmados vinculados a la ingesta de alimentos contaminados con norovirus resalta la importancia de un buen diagnóstico para la correcta elucidación de la etiología de los brotes (Figura 3) (Gould *et al.*, 2013). El grupo de frutas y nueces tiene una importante participación como alimentos implicados en los brotes. El hecho de que norovirus sea un importante patógeno en los brotes asociados a la ingesta de alimentos indica que el depender únicamente de protocolos para la identificación de bacterias es inadecuado durante la investigación de brotes.



*N = 3,264.

Figura 3. Porcentaje medio estimado de enfermedades asociadas a alimentos (por grupo de alimentos).



*N = 439.

Figura 2. Porcentaje medio estimado de enfermedades generadas por brotes de norovirus en alimentos.

Recientemente las almendras han sido causa de varios brotes de salmonelosis. Adicionalmente se han asociado brotes de salmonelosis al consumo de nueces y de otros frutos secos como piñones crudos y coco seco, así como productos derivados de frutos secos como la mantequilla de cacahuete tostado y los productos de semillas de sésamo (por ejemplo, halva y tahina). A la fecha, la mayor parte de los brotes asociados con alimentos de bajo contenido de humedad se han vinculado a *Salmonella* (FAO, 2012).

El primer brote vinculado al consumo de almendras crudas sucedió en 2000–2001 y causó enfermedades en Canadá y EE.UU. debido a una cepa rara, *S. Enteritidis* PT 30 (Isaacs *et al.*, 2005). El segundo brote sucedió en 2003–2004 nuevamente en Canadá y EE.UU., esta vez debido a *S. Enteritidis* PT 9C (CDC, 2004). El producto se retiró del mercado en más de 10 países. Este segundo brote condujo a la promulgación de la norma para el tratamiento obligatorio de almendras crudas para lograr una reducción mínima de 4 Log de *Salmonella* (7 CFR Part 981).

Además de los brotes reportados en EE.UU. se han retirado frutos secos como avellanas, nueces australianas (macadamia), pecanas, pistachos, piñones y nueces pecaneras después de haber sido aisladas cepas de *Salmonella* o *E. coli* enterohemorrágica durante ensayos de rutina, aun cuando no se hubiesen documentado enfermedades asociadas a su consumo. Tanto los brotes como el retiro de productos circulantes en el mercado ofrecen pruebas contundentes de que *Salmonella* y la *E. coli* enterohemorrágica pueden estar presentes en los frutos secos y, de vez en cuando, en la prevalencia y los niveles que dan lugar a brotes reconocidos. En 2005-2006, en Suecia tuvo lugar un grupo de enfermedades causadas por un subtipo raro de *S. Enteritidis* vinculado epidemiológicamente al consumo de almendras crudas (FDA, 2009). Aunque el patógeno no fue aislado de ninguna de las almendras consideradas durante la investigación, estadísticamente había una muy alta proporción de probabilidades relacionadas en el caso del estudio de control conducido por las autoridades suecas. A principios de 2009, la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los

Estados Unidos (FDA) encontró varias muestras de pistacho y productos derivados de pistacho de una compañía específica contaminadas con múltiples serotipos de *Salmonella*, incluidas *S. Montevideo*, *S. Newport* y *S. Senftenberg* (Müller *et al.*, 2007; CDC, 2009b). Aunque no se han vinculado casos definitivos de salmonelosis a los pistachos, el CDC reportó que a partir de muestras de un paciente en Connecticut, EE.UU. se aisló una cepa de *Salmonella* con un perfil genético que coincidía con la cepa de *Salmonella* encontrada en un producto que contenía pistacho.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar el perfil microbiológico de alimentos de baja actividad de agua expendidos a granel en mercados de la ciudad de Querétaro, así como conocer la incidencia y comportamiento de *Salmonella* spp. en productos seleccionados.

3.2 Objetivos específicos

1. Cuantificar el contenido de microorganismos indicadores de interés sanitario (bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli*, hongos y levaduras) en alimentos de baja actividad de agua (cacahuates, nueces, pasas, jitomate y chocolate).
2. Determinar la incidencia de *Salmonella* spp. en alimentos de baja actividad de agua (cacahuates, nueces, pasas, jitomate y chocolate).
3. Evaluar el comportamiento de *Salmonella* spp. en nueces, cacahuates y jitomate durante el almacenamiento bajo diferentes condiciones de temperatura y humedad relativa.
4. Diseñar una técnica molecular para la detección de norovirus en alimentos de baja actividad de agua (cacahuates, nueces, pasas y jitomate deshidratado).

IV. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1 Material biológico

Salmonella Enteritidis ATCC 13076

Salmonella Typhimurium ATCC 23595

Salmonella Typhimurium ATCC 14028

Salmonella Thompson ATCC 8391

Salmonella Montevideo ATCC 8387

Hepatitis A virus cepa citopática HM-175

Norovirus murino MNV-1

Células RAW 264.7

Células FrhK

4.1.2 Soluciones

Solución salina isotónica estéril

Agarosa al 2, 3 y 5 %

Buffer TAE 1X

4.1.3 Reactivos

Antiserum Poly A-I & Vi (Bioxon)

Trizol LS (Invitrogen)

Cloroformo (Sigma-Aldrich)

Isopropanol (Sigma-Aldrich)

Etanol 75 % (preparado con agua DEPC)

Agua estéril libre de DNAsas-RNAsas

Reactivos para la reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR por sus siglas en inglés): mezcla dNTP, BSA (albúmina de suero bovino por sus siglas en inglés), 2X SYBR Green, enzima Platinum Taq polimerasa (Life Technologies).

Reactivos para la amplificación isotérmica mediada por bucle con transcriptasa inversa (RT-LAMP por sus siglas en inglés): buffer Thermopol 10X (New England BioLabs, betaína, mezcla dNTP, BSA, enzima *Bst* DNA polimerasa, enzima AMV-Transcriptasa reversa clonada, MgSO₄ 50 mM.

Marcador de peso molecular DNA 100 bp (Promega)

Marcador de peso molecular DNA 10 bp (0.1 µg/µL) (Thermo Scientific)

Tinte de carga azul/naranja 6X (Promega)

Bromuro de etidio (BIO-RAD)

4.1.4 Medios de cultivo

Peptona de caseína (DIBICO)

Agar soya tripticasa (DIBICO)

Agar hierro y triple azúcar (BD Bioxon)

Agar hierro y lisina (DIBICO)

Agar XLD (BD Difco)

Agar sulfito de bismuto (DIBICO)

Agar de dextrosa y papa (DIBICO)

Agar Baird Parker (DIBICO)

Caldo soya tripticasa (DIBICO)

Caldo infusión cerebro corazón (DIBICO)

Caldo urea (DIBICO)

Caldo tetracionato (BD Difco)

Caldo Rappaport Vassiliadis (BD Difco)

Caldo lauril sulfato de sodio con MUG (DIBICO)

Caldo verde brillante bilis al 2 % (DIBICO)

4.2 Equipo

Homogenizador mecánico Stomacher (Seward, London, England)

Campana de bioseguridad tipo II tipo A/B3 (LABCONCO)

Centrífuga 5702 (Eppendorf)

Incubadora CO₂ HERAcCell 150i (Thermo Scientific)

Espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000)

Termociclador Mastercycler® personal (Eppendorf)

Sistema de detección PCR en tiempo real My iQ Single color RT-PCR (BIO-RAD)

Fuente de voltaje PowerPac 200 (BIO-RAD)

Cámara de electroforesis (BIO-RAD)

Sistema de documentación de geles Gel Doc XR (BIO-RAD)

4.3 Metodología

4.3.1 Alimentos y sitios de muestreo.

Durante los meses de enero a abril del año 2015, en mercados de la ciudad de Querétaro se colectaron muestras de frutas deshidratadas (jitomate, pasas), frutos secos (cacahuates y nueces), y chocolate expendidos a granel; en el caso de los jitomates deshidratados, dichas muestras se obtuvieron en supermercados y tiendas departamentales. Se realizaron muestreos semanales y

de cada producto se colectaron de manera aséptica 30 muestras. Dichas muestras se transportaron al laboratorio de Inocuidad Microbiana de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro para llevar a cabo los análisis microbiológicos dentro de las primeras 24 horas posteriores a su recolección.

4.3.2. Análisis microbiológicos.

4.3.2.1 Preparación de las muestras

Se pesaron porciones de 10 g de muestra y se les adicionaron 90 mL de diluyente de peptona. Las muestras se mezclaron en un homogenizador mecánico por un minuto y se prepararon series de diluciones decimales en tubos con diluyente de peptona. A partir de estas suspensiones se llevó a cabo el análisis microbiológico.

4.3.2.2. Cuantificación de microorganismos indicadores

En las muestras colectadas se cuantificaron los microorganismos indicadores apegados a las Normas Oficiales Mexicanas y métodos estandarizados por la FDA. (Tabla 5).

Tabla 5. Metodologías empleadas para la cuantificación y detección de microorganismos en alimentos de baja actividad de agua

MICROORGANISMO	METODOLOGÍA
Bacterias mesófilas aerobias	NOM-092-SSA1-1994; FDA, 2014
Microorganismos coliformes totales, fecales y <i>E. coli</i>)	NOM-112-SSA1-1994; FDA, 2014
Hongos y levaduras	NOM-111-SSA1-1994
<i>S. aureus</i>	NOM-115-SSA1-1994; FDA, 2014
<i>Salmonella</i> spp.	NOM-114-SSA1-1994; FDA, 2014

4.3.2.2 Bacterias mesófilas aerobias (BMA).

El recuento de BMA se llevó a cabo mediante la técnica de vaciado en placa en agar cuenta estándar. Las cajas Petri en estudio se incubaron a 35 °C por 48 horas.

4.3.2.3 Coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF) y *E. coli*.

La cuantificación de los CT, CF y *E. coli* se realizó mediante la técnica de número más probable (NMP).

- Para la prueba presuntiva se empleó una batería de 9 tubos con caldo lactosado los cuales se incubaron a 35 °C por 48 horas. De cada tubo positivo (turbidez y formación de gas dentro del tiempo de incubación) se tomó una alícuota (100 µL) y se inocularon por separado dos tubos conteniendo 3 mL de caldo lactosa bilis verde brillante (CLBVB), otro tubo con 3 mL de caldo lauril sulfato con MUG y un tubo con 1 mL de agua peptonada. Uno de los tubos con CLBVB se incubó a 35 ± 2 °C por 48 horas; el tubo restante de CLBVB, el de caldo lauril sulfato con MUG y el tubo de agua peptonada se incubaron a 44.5 °C en un baño de precisión durante 48 h.
- Para el CLBVB la presencia de gas evidencia que la prueba fue positiva y para el caldo lauril sulfato con MUG el tubo es positivo si existe formación de gas, fluorescencia a luz UV (365 nm). La producción de indol con el reactivo de Kovac se evidencia en los tubos de agua peptonada.

4.3.2.4. Hongos y levaduras

- El recuento de hongos y levaduras se llevó a cabo por la técnica de vaciado en placa en agar papa dextrosa acidificado a un pH de 3.5 con ácido tartárico. Las cajas se incubaron a 25 °C por un lapso de 72 hasta 120 horas.

4.3.3 Detección de microorganismos patógenos.

4.3.3.1. *Salmonella* spp.

La detección de *Salmonella* se llevó a cabo mediante las metodologías oficiales Mexicanas y las propuestas por la FDA (Tabla 5).

- Se pesaron 25 g de muestra y se sometieron a un pre-enriquecimiento en caldo lactosado (225 mL) el cual se incubó de 18-24 horas a 35 °C. En el caso de muestras de chocolate, el medio de pre-enriquecimiento señalado es leche descremada reconstituida adicionada con verde brillante bilis al 1 %.
- Finalizada la incubación se tomaron dos alícuotas de 1 mL (1 mL para cada caldo de enriquecimiento) de la muestra en caldo lactosado y se inocularon tubos con caldo de enriquecimiento (caldo tetracionato y caldo Rappaport) y se llevaron a incubación a 43 °C en un baño de agua termostáticamente controlado durante 24 horas. Posteriormente se procedió al aislamiento de *Salmonella* en los medios selectivos: agar XLD (agar xilosa lisina desoxicolato) y agar sulfito bismuto (Pouch, 2001).
- Las colonias sospechosas de ser pertenecientes al género *Salmonella* se inocularon en agar TSI (triple azúcar hierro), agar LIA (agar lisina-hierro) y en caldo urea para realizar una confirmación bioquímica. Las colonias con respuesta positiva a dichas pruebas se sometieron a confirmación serológica mediante el uso del antisuero polivalente *Salmonella* 0 Antiserum Poly A-I & Vi. La confirmación mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) se realizó en 30 ciclos según los parámetros establecidos en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de PCR para *Salmonella* spp. (Liu, 2002).

Etapas	Parámetros
Activación	95 °C/5 min
Desnaturalización	95 °C/30 s
Alineamiento	60 °C/90 s
Extensión	72 °C/90 s
Extensión final	68 °C/5 min
Gen blanco	<i>InvA</i>

La mezcla de reacción de PCR consistió de los siguientes volúmenes: 20 µL 10 µL GoTaq Colorless Master Mix 2x (PROMEGA), 0.77 µL *InvA*

F primer (CGCGCTTGATGAGCTTTACC) (SIGMA-ALDRICH), 1.14 μ L
InvA R primer (CTCGTAATTCGCCGCCATTG) (SIGMA-ALDRICH), 7 μ L
agua libre de RNAsas y 1 μ L ADN (de la muestra) por reacción.

- Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 2 %, dicha electroforesis se realizó a 110 W durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de electroforesis se observó el gel de agarosa en cámara de luz UV para analizar el tamaño de los amplicones generados. Para la detección de *Salmonella* el tamaño del amplicón resultante mediante la técnica de PCR fue de 312 pb.
- Las cepas de *Salmonella* se almacenaron a -70 °C para llevar a cabo estudios posteriores.

4.3.3.2 *Staphylococcus aureus*.

Se pesaron 10 g de muestra y se prepararon diluciones decimales en diluyente de peptona. Se cuantificó el contenido del patógeno en las muestras empleando agar Baird Parker por medio de la técnica de extensión por superficie incubando las placas a 35 °C durante 24 a 48 horas. Las colonias sospechosas de ser positivas se inocularon en caldo BHI y se incubaron de 18-24 horas para llevar a cabo la prueba de coagulasa y termonucleasa (Pouch, 2001).

Para llevar a cabo la prueba de coagulasa se emplearon 0.2 mL del cultivo en caldo BHI y se mezclaron con 0.2 mL de plasma sanguíneo diluido 1:1 volumen a volumen con solución salina estéril. Esta mezcla se incubó en baño de agua de 35 a 37 °C; si durante las primeras 6 horas no hay formación de coágulo se realiza una observación a las 24 horas; la prueba se considera positiva si hay formación de un coágulo. Para realizar la comprobación de la coagulación del plasma se añade una gota de CaCl al 5 % a 0.5 mL de plasma reconstituido empleado, formándose un coágulo en 10-15 segundos.

La prueba de termonucleasa se realizó calentando en baño de agua hirviendo por 15 minutos una alícuota de 0.3 mL del cultivo en caldo BHI.

Posteriormente se transfirió una gota de cada cultivo a agar DNAsa con azul de toluidina y se incubó a 35 °C en un lapso de 4 a 24 horas. La formación de un halo transparente extendido de por lo menos 1 mm alrededor del punto de inoculación se considera como prueba positiva.

4.3.3.3. Desarrollo y estandarización de un protocolo para la detección y cuantificación de virus en alimentos de baja actividad de agua.

El trabajo propuesto en este proyecto se centra fundamentalmente en la detección de microorganismos patógenos en los alimentos de baja Aw. Por lo tanto, además de la metodología para la detección de bacterias también se propuso una metodología para la detección de virus en este tipo de alimentos, específicamente Norovirus (empleando el subrogado norovirus murino) y el virus de la hepatitis A.

La metodología para la detección de virus se desarrolló durante la estancia de investigación realizada en el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos del Instituto de Agricultura de la Universidad de Tennessee. Dicha metodología se sometió a evaluación para su aplicación en la detección de Norovirus en muestras de frutos secos y frutas deshidratadas.

4.3.3.3.1. Inoculación de muestras

Para la detección de norovirus murino (MNV-1) se inocularon en la superficie de 25 gramos de cada uno de los productos de estudio (cacahuete, nuez, pasas y jitomate deshidratado al sol) con una alícuota de 200 μ L de MNV-1 con una concentración de 5 Log UFP/mL. Los alimentos inoculados se secaron durante 10 minutos, y posteriormente se procedió a realizar la extracción del material genético.

4.3.3.3.2. Extracción del material genético

Este procedimiento se realizó en una campana de bioseguridad tipo II LABCONCO tipo A/B3 (Figura 4).

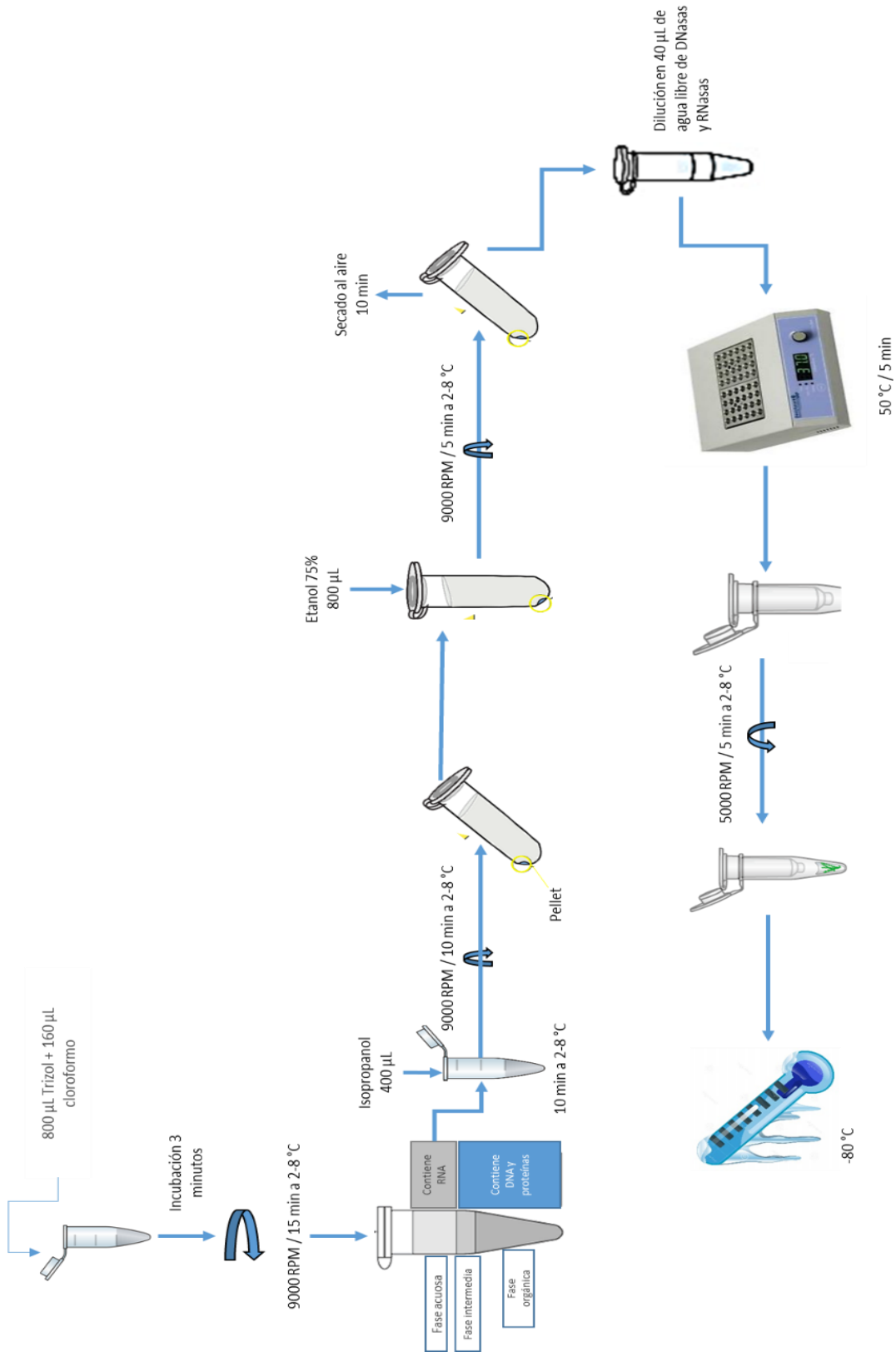


Figura 4. Diagrama del procedimiento de extracción de RNA con TRIzol.

4.3.3.3.3. Amplificación del material genético.

Una vez realizada la extracción del material genético (RNA) se llevó a cabo la amplificación del material mediante el empleo de la técnica molecular transcripción reversa de la cadena de polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés). A la par se evaluó la conveniencia de emplear una técnica alternativa de amplificación, la amplificación isotérmica mediada por bucle con transcriptasa inversa (RT-LAMP, por sus siglas en inglés).

Amplificación por RT-PCR. Para llevar a cabo esta etapa, se evaluó el uso los iniciadores propuestos por Yoneyama *et al.*, 2007, que arrojaron óptimos resultados para la finalidad de este proyecto. Brevemente:

1. Se midió la concentración de RNA extraída con TRIzol el uso de un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000). En esta medición se buscó que el radio de absorbanza entre las lecturas 260/280 nm fuera lo más cercano posible al valor 2.0 que generalmente es aceptado como el valor de una muestra “pura” de RNA. Si dicha relación es notablemente menor esto puede indicar la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben fuertemente en o cerca de 280 nm.
2. Se depositó en un microtubo de 0.2 mL de capacidad 40 μ L de la mezcla de reacción de RT-PCR, la cual consta de 10.3 μ L de agua, 3 μ L de BSA, 0.2 μ L de mezcla de dNTP, 25 μ L de SYBR Green, 0.15 μ L de iniciadores de reacción (Tabla 7), y 1.2 μ L de Taq polimerasa SIII por reacción; en adición con 10 μ L de RNA extraído con TRIzol.

Tabla 7. Iniciadores empleados en las reacciones RT-PCR para MNV-1 (Yoneyama *et al.*, 2007)

Iniciador	Posición en genoma	Tamaño (bases)	Secuencias (5' to 3')
MNV-F	4963	18	ATGGTRGTCCCACGCCAC
MNV-R	5061	17	TGCGCCATCACTCATCC

Los tubos con mezcla de reacción y material genético se depositaron en el sistema de detección PCR en tiempo real My iQ Single color RT-PCR. Las condiciones a las cuales se llevaron a cabo las reacciones de RT-PCR se muestran en la Tabla 8, durante 45 ciclos.

Tabla 8. Condiciones de reacción de RT-PCR (por 45 ciclos).

Reacción	Parámetros
Transcripción reversa	50 °C / 40 min
Desnaturalización	94 °C / 2.5 min
Alineación	60 °C / 1 min
Elongación	72 °C / 45 s
Extensión final	72 °C / 7 min

Fuente: D'Souza, 2014.

Amplificación por RT-LAMP. Para la realización de RT-LAMP se empleó el material genético extraído mediante el uso de TRIzol™ y se realizaron los procedimientos que se muestran a continuación:

1. Se depositaron en un microtubo de 0.5 mL 40 µL de la mezcla de reacción, la cual consta de 5 µL de buffer de reacción ThermoPol 10X *Taq*DNA polimerasa (New England BioLabs), 2.5 µL de MgSO₄ 50 mM (Invitrogen), 8 µL de betaína 4M, 2 µL de *Bst* DNA polimerasa de fragmento largo, 0.5 µL de enzima AMV-RTasa clonada (Invitrogen), 2.8 µL de dNTP Mix, 2 µL de MNV-FIP, 4 µL de MNV-BIP, 0.5 µL de MNV-F3, 0.5 µL de MNV-B3, 1 µL de MNV-LB (Tabla 9), 0.1 µL de albúmina de suero bovino (BSA) y 11.58 µL de agua DEPC; junto con 10 µL de RNA extraído con TRIzol.

Tabla 9. Iniciadores empleados para la reacción RT-LAMP (Hanaki et al., 2014)

Iniciador	Posición en genoma ^a	Tamaño (bases)	Secuencias ^b (5' to 3')
F3	4854	18	CCCTCYCARYTVATGGCC
B3	5161	18	CCACGGGYTGAATGGGA
FIP (F1c-F2)	4996-4977, 4944-4959	41	CAGCGCAGRACAGANCGGTG- <u>TTTTT</u> -GCCCANAGTGGGATAG
BIP (B1c-B2)	5014-5033, 5076-5060	37	TGGATGNYGAGACCCCGCAG- TGCGCCATCACTCATCC
LB	5036	18	ACGCTCRGCRGTCTTGT

^aPosición de nucleótidos correspondiente a MNV-1. CW1 (GenBank: DQ285629).

^bBases mixtas en iniciadores degenerados son las siguientes: R, A o G; V, A, C, o G; Y, C o T; N, cualquiera. La porción subrayada incide un espaciador de 5 timidinas.

2. Los microtubos con mezcla de reacción y material genético se depositaron en un termociclador para llevar a cabo un solo ciclo de reacción a 62 °C durante 90 minutos.

3. Los productos amplificados por ambas metodologías se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 2 %, dicha electroforesis se realizó a 100 W durante 60 minutos.

4. Transcurrido el tiempo de electroforesis se observó el gel de agarosa en cámara de luz UV para analizar el tamaño de los amplicones generados. Para la detección de norovirus murino el tamaño del amplicón resultante mediante la técnica de RT-PCR fue de 115 pb.

4.4. Comportamiento de *Salmonella* en alimentos seleccionados de baja actividad de agua.

En base a los resultados de la incidencia de *Salmonella*, se seleccionaron cacahuates, pasas y jitomates deshidratados al sol para llevar cabo estudios sobre el comportamiento de *Salmonella* en dichos alimentos.

4.3.4.1. Cepas

Se empleó una mezcla de cinco cepas de *S. enterica* (*S. Enteritidis* ATCC 13076, *S. Typhimurium* ATCC 23595, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Thompson* ATCC 8391, *S. Montevideo* ATCC 8387) del cepario del Laboratorio de Inocuidad Microbiana de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro. También se emplearon cinco cepas de *Salmonella* aisladas de cada producto durante este estudio (cacahuates: 25 T/S, 30 T/X, 28 T/X, 34 T/X, 24T/S; nuez: 31 R/X, 26 T/X, 30 R/X, 23 R/X, 18 R/X; pasas: 22 T/S, 29 T/S, 26 T/S, 25 R/S, 24 R/X; jitomate deshidratado: 23 R/S, 22 R/X, 24 T/S, 21 R/S, 30 R/X; y chocolate: 24 R/X, 57 T/S, 53 T/S, 49 T/S, 58 R/S). Tanto a las cepas de referencia como a las cepas aisladas se les indujo la resistencia a rifampicina (200 ppm).

4.3.4.2. Preparación del inóculo

El inóculo se preparó a partir de cultivos (tanto cepas de referencia como cepas aisladas) resistentes a rifampicina previamente almacenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en caldo soya tricapseína adicionado con 15 % glicerol. 100 μL de los cultivos se transfirieron a tubos con 5 mL de caldo soya adicionado con rifampicina (200 ppm) y se incubaron a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, este paso se repitió por tres días consecutivos.

Al cuarto día las cepas se conjuntaron en dos tubos Falcon de 15 mL un tubo por grupo, el grupo A (cepas de referencia) y el grupo B (cepas aisladas) y se realizó una centrifugación a 15000 rpm durante 2 minutos, seguido de un lavado con solución salina isotónica estéril al 0.85 %, se realizó nuevamente una centrifugación y otro lavado con solución salina, este paso se repitió una vez más; las células lavadas se suspendieron en solución amortiguadora de fosfatos de pH 7 estéril en botellas estériles con aspersores para ser empleados en la inoculación de las muestras.

4.3.4.3. Inoculación de las muestras

Los alimentos seleccionados (cacaahuates, pasas y jitomate deshidratado) se colocaron en bandejas (una bandeja por producto) formando una capa de aproximadamente 1.5 cm de espesor. Posteriormente, mediante aspersion se inocularon las muestras con 12 disparos por bandeja con una concentración aproximada de 8 log UFC/g con las suspensiones microbianas en estudio. Posterior a la inoculación se realizó el secado por 30 minutos en campana de flujo laminar. Después del secado se almacenaron en bolsas tipo Ziploc® a temperatura ambiente.

4.3.4.5. Almacenamiento

Las muestras de los tres productos se almacenaron en bolsas cerradas sin exposición a la luz a una temperatura promedio de 27.5 °C

4.3.4.4. Cuantificación de *Salmonella*

Semanalmente se cuantificaron las poblaciones sobrevivientes tomando porciones de muestra de 10 g de producto a los cuales se les adicionaron 90 mL de diluyente de peptona y se homogenizaron mecánicamente por 1 min a velocidad media. A partir del homogenizado se prepararon diluciones decimales y el recuento se efectuó en agar soya tripticasa suplementado con rifampicina (200 ppm), empleando la técnica de extensión en superficie. Las placas se incubaron a 35 °C durante 48 horas.

4.3.4.6. Análisis estadístico

Los datos generados se analizaron mediante el programa de modelado DMFit versión 2.0. DMFit (www.combase.cc) y se obtuvieron los parámetros de crecimiento (velocidad de desarrollo o muerte, la duración de la fase lag y la máxima población alcanzada) del microorganismo bajo las condiciones estudiadas. Se realizó un ANOVA para comparar la diferencia entre las medias de los valores usando el programa JMP versión 10.0.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Microorganismos indicadores en alimentos de baja actividad de agua

A lo largo de cuatro meses (enero-abril, 2015) se colectaron en mercados y supermercados de la ciudad de Querétaro 70 muestras de cada uno de los productos estudiados en este trabajo: cacahuates, nueces, pasas, jitomates deshidratados y chocolate (Tabla 10). Los productos colectados se analizaron y se cuantificó el contenido de microorganismos indicadores de calidad sanitaria: BMA, hongos y levaduras, coliformes totales y *E. coli*.

Los valores de medianas observados para el contenido de BMA en cacahuates, nueces, pasas, jitomates deshidratados y chocolate, fueron 3.5, 3.6, 3.1, 3.1 y 5.2 Log UFC/g, respectivamente (Tabla 10, Figura 5).

Tabla 10. Población de bacterias mesófilas aerobias (BMA), hongos y levaduras en frutos secos y deshidratados recolectados en mercados de la ciudad de Querétaro.

Muestra	n ^a	BMA ^b Log UFC/g	Hongos ^b Log UFC/g	Levaduras ^b Log UFC/g
Cacahuete	70	3.5 (1.0-7.2)	2.0 (1.0-5.2)	2.8 (1.0-7.2)
Nuez	70	3.6 (1.6-7.2)	2.4 (1.0-3.8)	2.8 (1.0-7.2)
Pasas	70	3.1 (1.0-6.5)	1.9 (1.0-5.2)	2.3 (1.0-7.2)
Jitomate	70	3.1 (1.0-6.3)	1.7 (1.0-5.2)	2.0 (1.0-5.8)
Chocolate	70	5.2 (2.3-7.2)	2.0 (1.0-5.2)	2.5 (1.0-6.3)

^a Número de muestras analizadas. ^b Los valores se expresan en mediana y rango del Log UFC/g.

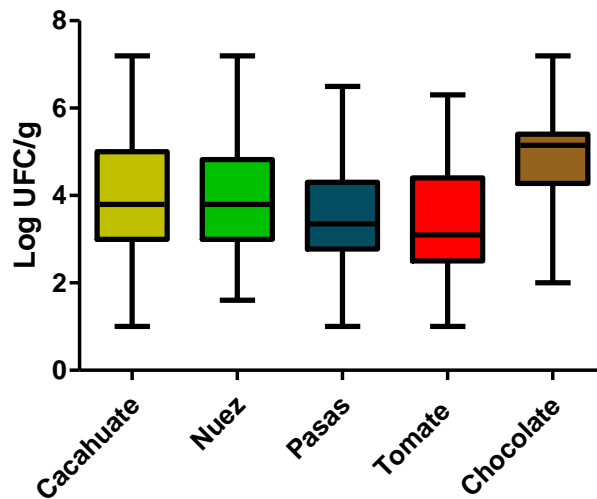


Figura 5. Grafica de caja y barras del contenido de bacterias mesófilas aerobias (BMA) en muestras de alimentos de baja Aw recolectadas en mercados de la ciudad de Querétaro.

Eglezos *et al.* (2008) reportaron un valor promedio de 4.5 Log UFC/g para BMA en muestras de cacahuates crudos pre-tostados recibidos de tres plantas procesadoras de frutos secos en un periodo de tres años. En almendras crudas, el valor promedio reportado de BMA es de 4.4 Log UFC/g (Eglezos *et al.*, 2008), en nuez pecanera almacenada durante cinco años a una temperatura de -20 °C de 3.1 Log CFU/g (Hao *et al.*, 1898). Witthuhn *et al.* (2005) reportaron un contenido de BMA de 2.8 Log UFC/g en pasas comerciales monitoreadas hasta ocho meses después de ser empacadas.

El análisis realizado a los jitomates deshidratados arrojó como resultado un valor de mediana de 3.1 Log UFC/g para BMA. En contraste, Isiaka (2013) reportó un valor promedio de 1.1 Log UFC/g en rebanadas de 25 mm de espesor de jitomate deshidratado.

El granillo de chocolate fue el único producto en nuestro estudio cuyo valor de mediana se encontró por encima de los 5.0 Log UFC/g. Este resultado contrasta con la media obtenida en los trabajos realizados por Mahamadou *et al.* (2008) quien reportó 2.0 Log UFC/g en cobertura de chocolate. Cabe mencionar

que los experimentos realizados por Mahamadou *et al.* (2013) se realizaron en castaña china (*Castanea mollissima*) cubierta con chocolate.

Desafortunadamente las Normas Oficiales Mexicanas no hacen referencia a los valores que se recomiendan en los productos que se analizaron en este estudio. De acuerdo con la metodología para los análisis microbiológicos de los productos listos para el consumo por la Agencia de Normas Alimentarias (Food Standards Australia, 2001), estos productos se clasifican en el nivel 2 de tres posibles niveles, que incluye a los alimentos listos para consumo, que no están sujetos a procesos de cocción. La calidad microbiana de los alimentos incluidos en el nivel 2 se clasifican en tres categorías en base al contenido de BMA: satisfactoria (<6 Log UFC/g), marginal (<7 Log UFC/g) y no satisfactoria (≥ 7 Log UFC/g). De acuerdo con esta información, en una muestra de cacahuate analizada se observó una concentración de 7.2 Log UFC/g, es decir se considera no satisfactoria, mientras que en seis muestras la población de BMA se encontró entre <7 y 6 Log UFC/g y que corresponde a la categoría marginal, y las 63 muestras restantes estarían incluidas en la categoría de satisfactorio (<6 Log CFU/g). En el caso de nueces, se observaron resultados similares a los de cacahuate: una muestra no satisfactoria, seis en la categoría marginal y 63 en la categoría satisfactoria. En relación a las pasas, dos muestras se incluirían en la categoría marginal y el resto de las muestras (68) en la categoría satisfactoria. El análisis de muestras de jitomate deshidratado arrojó como resultado tres muestras en la categoría marginal y 67 en la categoría satisfactoria. Finalmente, los resultados del análisis de muestras de granillo de chocolate reflejaron cuatro muestras en la categoría de no satisfactorio con una concentración de 7.2 Log UFC/g, una muestra en la categoría marginal, y 65 en la categoría satisfactoria.

En los recuentos de BMA en agar cuenta estándar pudimos observar el desarrollo de hongos, levaduras y algunos microorganismos esporulados al cabo de 48 horas.

En los cinco productos analizados, en general, el contenido de hongos y levaduras fue bajo, aunque muy variable. Los valores de las medianas del contenido de hongos en cacahuates, nueces, pasas, jitomate deshidratado y chocolate fueron 2.0, 2.4, 1.9, 1.7 y 2.0 Log UFC/g, respectivamente; y el de levaduras de 2.8, 2.8, 2.3, 2.0 y 2.5 Log UFC/g, respectivamente (Figura 6).

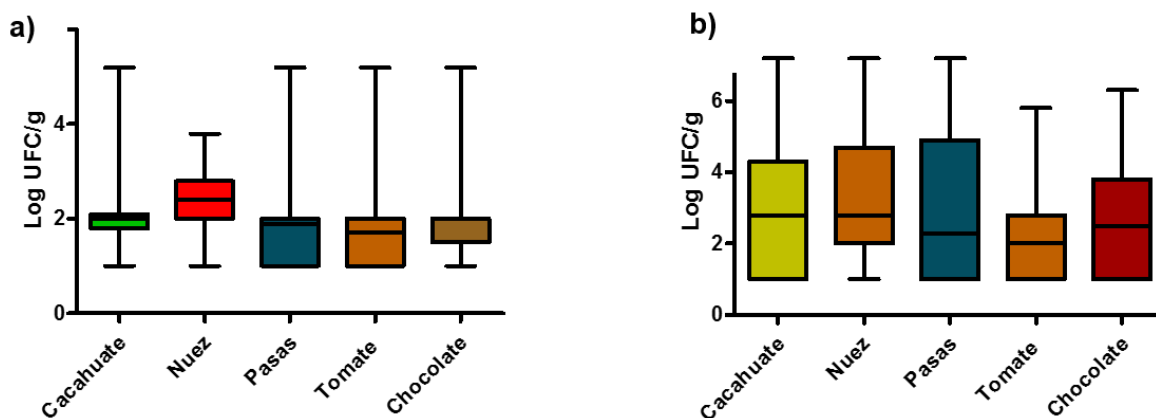


Figura 6. Gráfica de caja y brazos del contenido de hongos (a) y levaduras (b) en muestras de alimentos de baja Aw obtenidos en mercados de la ciudad de Querétaro.

Kazemi *et al.* (2013) analizaron 100 muestras de cacahuates no tostados y reportaron una concentración media de hongos de 1.3 Log UFC/g, valor inferior al que reportamos en nuestro trabajo (2.0 Log UFC/g). Los mismos autores en nueces reportan una concentración media de 2.2 Log UFC/g, que es similar a la mediana obtenida en nuestro estudio (2.4 Log UFC/g).

Witthuhn *et al.* (2005) reportaron un contenido medio de hongos de 2.3 Log UFC/g en pasas disponibles en el mercado hasta 8 meses después de haber sido envasadas. En las muestras analizadas en este trabajo el contenido de hongos fue de 1.9 Log UFC/g, sin embargo, se desconoce el tiempo tenían de almacenamiento previo a su exposición y venta en el mercado. Isiaka (2013) reportó el contenido de hongos en rodajas de jitomate de 25 mm de espesor secados al sol es de 0.9 Log UFC/g, valor inferior al que reportamos en este trabajo (mediana de 1.7 Log UFC/g).

Mahamadou *et al.* (2008) reportaron una concentración media de hongos y levaduras <1.3 Log UFC/g en la cobertura de chocolate de castañas chinas; en nuestro trabajo en el análisis de chispas de chocolate, pudimos observar valores de medianas de 2.0 y 2.5 Log UFC/g de hongos y levaduras, respectivamente.

Una característica que pudimos observar en las placas en donde se efectuó la cuantificación de hongos y levaduras fue la relación en proporción inversa que presentaron, es decir, si se observaba un alto contenido de levaduras el contenido de hongos era bajo y viceversa, a un alto contenido de hongos el contenido de levaduras era inferior.

En relación al contenido de coliformes los valores medios observados para fueron notablemente bajos en los cinco tipos de muestras. Las poblaciones en cacahuates, nueces, pasas, jitomate deshidratado y chocolate fueron de 0.9, 1.0, 1.1, 0.6 y 0.6 Log NMP/g, respectivamente. *E. coli* estuvo presente en los cinco productos aunque en concentraciones inferiores a 1.0 Log NMP/g (Tabla 11).

En orden decreciente el porcentaje de positividad de *E. coli* fue: cacahuate (20%), pasas (17%), nuez pecanera (13%), jitomate deshidratado (9%) y chocolate (7%). Estos datos claramente indican las malas prácticas de procesamiento o manejo durante la producción y/o venta de los alimentos.

Es importante recordar que la presencia de este grupo de microorganismos en los alimentos puede sugerir inadecuados o no controlados procesos de elaboración, así como contaminación del alimento en cualquier punto de la cadena de producción, en este caso, desde la cosecha hasta el empaclado. Respecto a los microorganismos coliformes fecales y *E. coli*, estos microorganismos pueden indicar contaminación fecal, aunque pueden vivir en ambientes no intestinales, incluyendo instalaciones industriales por lo cual, es de vital importancia procesar estos alimentos en condiciones de higiene estrictas para poder así asegurar la oferta de un producto sin riesgos microbianos.

Tabla 11. Contenido de microorganismos coliformes totales (CT) y *E. coli* en frutos secos, deshidratados y chocolate recolectados en mercados de la ciudad de Querétaro.

Muestra	n ^a	Coliformes totales ^b Log NMP/g	<i>E. coli</i> ^b Log NMP/g	<i>E. coli</i> ^c % (+)
Cacahuete	70	0.9 (<0.5-2.4)	0.9 (<0.5-1.4)	20 (14)
Nuez	70	1.0 (<0.5-3.0)	0.6 (<0.5-1.0)	13 (9)
Pasas	70	1.1 (<0.5-3.0)	0.6 (<0.5-1.7)	17 (12)
Jitomate	70	0.6 (<0.5-3.0)	0.5 (<0.5-1.7)	9 (6)
Chocolate	70	0.6 (<0.5-2.4)	0.5 (<0.5-1.0)	7 (5)

^a Número de muestras analizadas por producto. ^b Los números fuera del paréntesis indican los valores de medianas, los números dentro del paréntesis se refieren a mínimos y máximos. ^c Porcentaje de positividad; los números dentro del paréntesis indican el número de muestras positivas.

Los resultados obtenidos en la realización de esta investigación a pesar de reflejar una menor carga microbiana mantienen cierta concordancia con los obtenidos en trabajos anteriores (McCoy *et al.*, 2015; Mahamadou *et al.*, 2008; Eglezos *et al.*, 2008 y Akpan *et al.*, 2004). En dichos trabajos, se evaluó el contenido de coliformes totales y posteriormente la detección de *E. coli* en muestras de pasas sin procesamiento industrial, cobertura de chocolate, cacahuates, almendras, castañas y avellanas; y en jitomate deshidratado. Sin embargo, Eglezos *et al.* (2008) no detectaron *E. coli* dichas muestras de frutos secos. Cabe mencionar que los experimentos con los cuales se realizan las comparaciones presentadas se realizaron empleando medio Petrifilm, 3M para la determinación de microorganismos coliformes, teniendo como límite de detección hasta 10 UFC/g, mientras que el método empleado en la realización de este trabajo fue el del número más probable el cual nos ofrece un límite de detección de hasta 3 Log NMP/g. Los recuentos de coliformes en esta investigación no son

diferentes a los obtenidos por Abdalla *et al.* (2014) quienes reportaron contenidos de 0.5 Log NMP/g y 1.0 Log NMP/g en jitomates Galela y Asela, respectivamente. Estos valores son similares a los reportados en nuestro trabajo para jitomate deshidratado al sol (mediana de 0.6 Log NMP/g).

5.2. Incidencia de microorganismos patógenos

En nuestra investigación no se obtuvo identificación positiva de *S. aureus* en ninguna muestra. Sin embargo, la presencia de *Salmonella* se detectó en los cinco alimentos en estudio. La incidencia de *Salmonella* osciló entre 26 y 49% según el tipo de alimento (Tabla 12).

Tabla 12. Incidencia de *Salmonella* en cacahuates, nueces, pasas, jitomate deshidratado y chocolate recolectados en mercados de la ciudad de Querétaro.

Muestra	<i>Salmonella</i> spp. +/n (%)^a
Cacahuete	22/70 (31)
Nuez	28/70 (40)
Pasas	21/70 (30)
Jitomate	39/70 (56)
Chocolate	18/70 (26)

^a Muestras positivas entre el número de muestras analizadas (porcentaje de positividad).

Resulta de especial interés la incidencia de *Salmonella* en estos productos, ya que se trata de porcentajes muy altos tomando en cuenta que al ser considerados como alimentos listos para consumo no reciben algún tratamiento que asegure su inocuidad previo a la ingesta, situación que se podría agravar al entrar en contacto con alimentos tales como carnes, ensaladas, pasteles, postres, etc., ya que si bien hemos argumentado que *Salmonella* no es capaz de desarrollar en las condiciones de *A_w* que estos productos presentan (~ 0.5), cuando se añaden a otros alimentos, el valor de *A_w* podría incrementar lo cual

fomentaría la presencia de un ambiente adecuado en el cual *Salmonella* y favorecer su desarrollo en dicha combinación de alimentos.

Generalmente, al realizar análisis microbiológicos a muestras de alimentos se relaciona el contenido de microorganismos coliformes con la presencia o ausencia de *Salmonella*; concretamente un número elevado de coliformes no necesariamente refleja la presencia de *Salmonella*, aunque cifras reducidas del indicador en general, son buenos indicadores de su ausencia (Escartín, 2008). Según estudios realizados por Geldreich (1970) en aguas superficiales, cuando la densidad de coliformes fecales era menor de 200/100 mL, la positividad a *Salmonella* fue de 27.6 %; este porcentaje de positividad se veía incrementado a 98 % en las muestras que mostraban una densidad de coliformes fecales mayor a 2,000/100 mL.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, junto con una continuidad de la investigación, pueden ser de ayuda para generar un panorama de la situación actual que presentan algunos alimentos de baja A_w en nuestro país ya que si bien se cuenta con cifras de casos de salmonelosis, aún se carece de información suficiente para poder establecer el vehículo por el cual el patógeno llegó al consumidor. Por la alta incidencia de *Salmonella* en los alimentos estudiados se pudiera sospechar que la contaminación se debe al manejo que se da a dichos productos en los puntos de venta. Sin embargo, el porcentaje de positividad en muestras de jitomate pone de manifiesto que no se trata de un problema relacionado exclusivamente al tipo y sitio de venta, ya que dichos productos son procesados lo cual exhibe la falta de procesos realmente efectivos para asegurar la inocuidad durante la producción.

Alrededor del mundo existen reportes en los cuales se han relacionado a alimentos de baja A_w tales como chocolate, almendras, cereales, condimentos, pimienta, papas fritas, coco deshidratado, fórmulas infantiles y recientemente mantequilla de cacahuete y aperitivos elaborados con arroz inflado y maíz, como vehículos de *Salmonella*, y si bien dichos reportes son relativamente raros, a menudo afectan a un gran número de personas ya que se presentan como brotes

distribuidos a lo largo de varios estados, ya que se trata de productos cuya vida de anaquel es prolongada, motivo por el cual su distribución a lo largo de un amplio espacio geográfico se ve favorecida (Tabla 13).

Tabla 13. Brotes de enfermedad asociados al consumo de alimentos de baja Aw en los cuales *Salmonella* se ha relacionado como agente causal.

Vehículo	Año	Lugar	Patógeno	No. de casos
Almendras crudas	2003-2004	EE.UU (Oregon) y Canadá (12 estados)	S. Enteritidis	34
Almendras	2005	Suecia	S. Enteritidis	15
Crema de cacahuete	2006	44 Estados de EE.UU	S. Tennessee	425
Crema de cacahuete	2008-2009	43 Estados de EE.UU	S. Typhimurium	550
Piñones	2011	Maryland, New Jersey, New York, Pennsylvania, Virginia	S. Enteritidis	43
Chocolate	1987	Noruega	S. Typhimurium	361
Chocolate	2001-2002	Alemania	S.Oranienburg	439
Chocolate	2006	Reino Unido	<i>Salmonella</i> Montevideo	45
Chocolate con nueces	2007	Reino Unido	<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	90

Fuente: CDC, 2012.

Cabe resaltar que la mayor parte de los brotes de salmonelosis ocurridos en EE. UU. relacionados con alimentos de baja Aw refieren al consumo de

alimentos procesados, tal es el caso de la crema de cacahuate y chocolate, sin embargo y a pesar de que se han realizado estudios de sobrevivencia de *Salmonella* en dichos productos aún es necesario la realización de más investigación acerca de incidencia y comportamiento del patógeno en las materias primas para poder así establecer bases de conocimiento tanto de la calidad microbiológica de los alimentos de baja Aw como la participación que puedan tener en casos de salmonelosis en nuestro país.

Si bien se presentan brotes asociados al consumo de frutos secos y deshidratados como vectores de *Salmonella*, dichos reportes se ubican en países de la Unión Europea y EE.UU.; por tal motivo, resulta necesario generar información que pueda establecer tanto la calidad microbiológica como la incidencia de patógenos en dichos productos en países como México.

Los frutos secos se estabilizan microbiológicamente mediante el proceso de secado, el cual se logran niveles de Aw inferiores a 0.7. En estos niveles bajos de agua, los microorganismos no se multiplican, y la vida de anaquel del alimento está normalmente limitada por la oxidación de los lípidos (rancidez). El proceso de desecación (secado) suele disminuir las poblaciones microbianas matando una parte de las células. La eficiencia de esta reducción depende de una amplia variedad de factores que comprenden la cepa y las condiciones de cultivo, así como la humedad y la temperatura durante el secado. Sin embargo, una vez seco, las poblaciones restantes de *Salmonella* y *E. coli* enterohemorrágica sobreviven muy bien en los frutos secos. Cuando se almacenan los frutos a temperaturas de refrigeración o congelación no se observa prácticamente ninguna reducción superado el año de almacenamiento. A temperatura ambiente, es normal un ligero índice de reducción; puede que no se aprecie un nivel de reducción importante durante varios meses (FAO, 2012).

Dada la existencia de la aparición natural de *Salmonella* spp. en el medio ambiente, no es un hecho sorprendente el encontrar a este patógeno en nueces crudas y productos similares. Es necesario que estos productos sean manejados

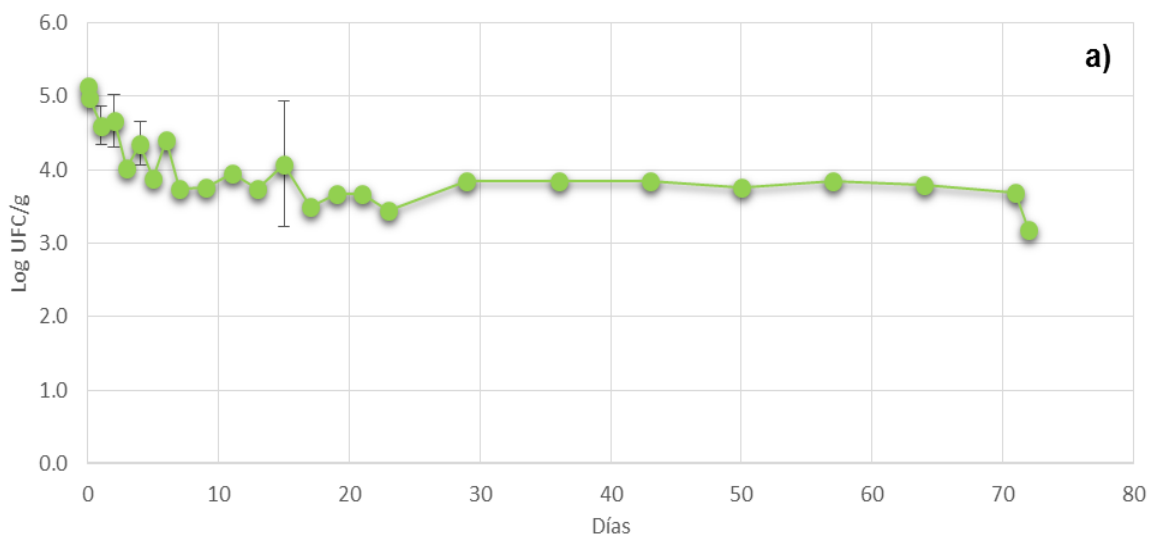
por el procesador como si estuvieran contaminados con *Salmonella* spp., y se deben tomar medidas para evitar la recontaminación del producto tratado.

5.3. Sobrevivencia de *Salmonella* en productos de baja Aw seleccionados.

Una vez realizado el protocolo de detección de *Salmonella* en las muestras analizadas (desde la etapa de pre-enriquecimiento hasta la confirmación por PCR) se procedió con la realización del estudio de sobrevivencia del patógeno en muestras seleccionadas de alimentos de baja Aw.

En este estudio se inoculó un coctel de cinco cepas de referencia y otro coctel con cinco cepas aisladas de cada producto. Los productos con los cuales se realizó el estudio fueron cacahuate, pasas y jitomate deshidratado. Se observó el comportamiento de *Salmonella* durante 71 días tanto para cepas aisladas a partir de muestras como para las cepas de referencia. El almacenamiento de las muestras se llevó a cabo en bolsas tipo Ziploc® a temperatura ambiente promedio de 27 °C.

Como se presenta a continuación, el comportamiento de las cepas de *Salmonella* muestra amplias diferencias entre los tres productos, siendo el cacahuate en donde mayor tiempo de sobrevivencia se observó (Figura 7).



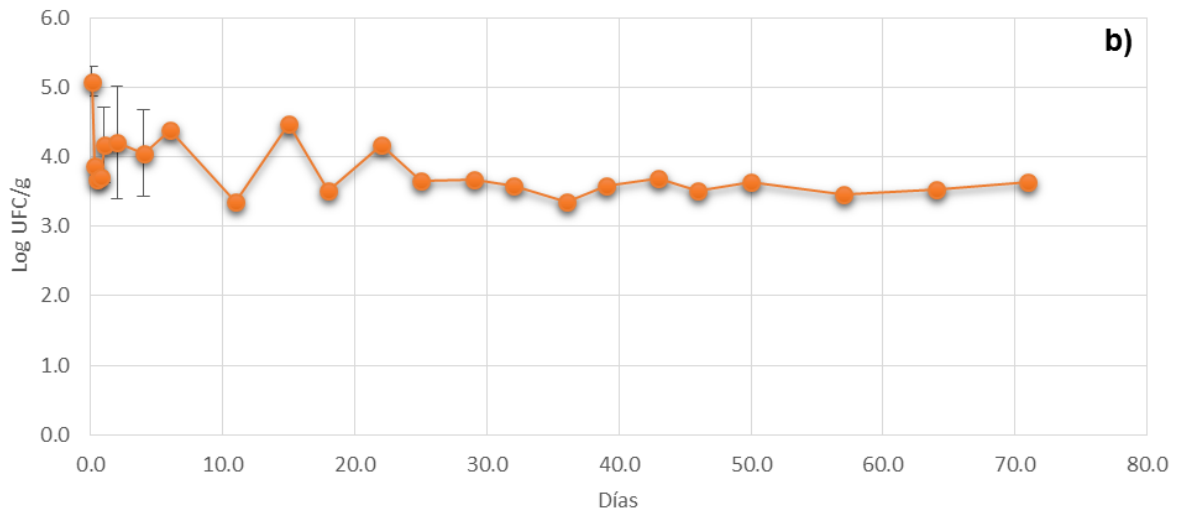


Figura 7. Comportamiento de cepas de *Salmonella* en muestras de cacahuate. En el eje de las "X" se presenta el tiempo en horas, en el eje de las "Y" se presenta la concentración bacteriana en Log UFC/g. En el inciso a) se presentan cepas de referencia, en el inciso b) cepas aisladas a partir de muestras del producto en etapas previas.

Respecto al comportamiento de las cepas de referencia inoculadas en cacahuate se observó que durante el tiempo de secado (1.5 h) se presentó la mayor tasa de inactivación (~ 3 Log UFC/g), posteriormente al llegar a las 120 h de almacenamiento la población de *Salmonella* disminuyó en ~ 1.5 log UFC/g. A partir de ese momento el contenido se mantuvo entre 3 y 4 Log UFC/g hasta 50 días. Hacia los 82 días de almacenamiento la disminución en la concentración de *Salmonella* fue de 1 Log UFC/g.

Analizando el experimento realizado con los cacahuates inoculados con el coctel de cepas de aisladas de cacahuate se observó al igual que con las cepas de referencia, que el mayor descenso en la concentración de *Salmonella* sucedió durante las 1.5 horas que transcurrieron durante el secado del cacahuate. Posteriormente, la concentración de *Salmonella* se mantuvo entre 3.5 y 5.5 Log UFC/g hasta las 21 días. A partir de ese momento la concentración de *Salmonella* se mantuvo constante con un valor de ~ 3.5 Log UFC/g hasta el día 71, fecha en

que se concluyeron los conteos con el fin de reportar en este trabajo. Posterior al día 71 se continuó realizando el recuento de *Salmonella* en las muestras.

Cabe mencionar que las muestras de cacahuate, tanto inoculadas con cepas de referencia como aisladas presentaron olor característico de rancidez de lípidos aproximadamente a los 50 días de almacenamiento.

Normalmente la A_w de las almendras almacenadas en forma adecuada es menor al nivel requerido para el crecimiento de la *Salmonella*. Sin embargo, el agregado de humedad o de agua puede crear condiciones que permitan que la *Salmonella* crezca si está presente en las frutas secas. La capacidad de la *Salmonella* spp. para sobrevivir por largos periodos en condiciones secas es de particular relevancia para las almendras y otros frutos secos. Uesugi *et al.* (2006) demostraron que *S. Enteritidis* fagotipo 30 puede sobrevivir hasta 550 días en granos de almendra sometido a una variedad de condiciones de almacenamiento comunes.

Aunque la A_w inhibe el crecimiento de microorganismos, *Salmonella* spp. puede sobrevivir por grandes periodos de tiempo en un ambiente de baja A_w . Burnett *et al.* (2000) demostraron que *Salmonella* spp. sobrevivió hasta por 24 semanas en mantequilla de cacahuate, siendo mayor la sobrevivencia en el producto almacenado a 5 °C que aquel que se almacena a temperatura ambiente (21°C).

Mattick *et al.* (2001) encontraron que la baja A_w era perjudicial para la supervivencia de *Salmonella* a 55 o 60 °C, pero que las temperaturas mayores a 70 °C siempre eran protectoras, lo cual significa que era más difícil inactivar el patógeno a una temperatura más alta.

La sobrevivencia de *Salmonella* en muestras de pasas se realizó de igual forma que en muestras de cacahuate. Similar a lo sucedido con los cacahuates, la mayor disminución de la concentración del patógeno se presentó después del tiempo de secado (1.5 horas). A las 48 horas de almacenamiento la concentración de *Salmonella* había disminuido a ~ 3 Log UFC/g en el caso de las cepas de

referencia y hasta ~ 3.5 Log UFC/g en el de las cepas aisladas de pasas. Con ambos tipos de cepas se presentó un comportamiento de inactivación (Figura 8).

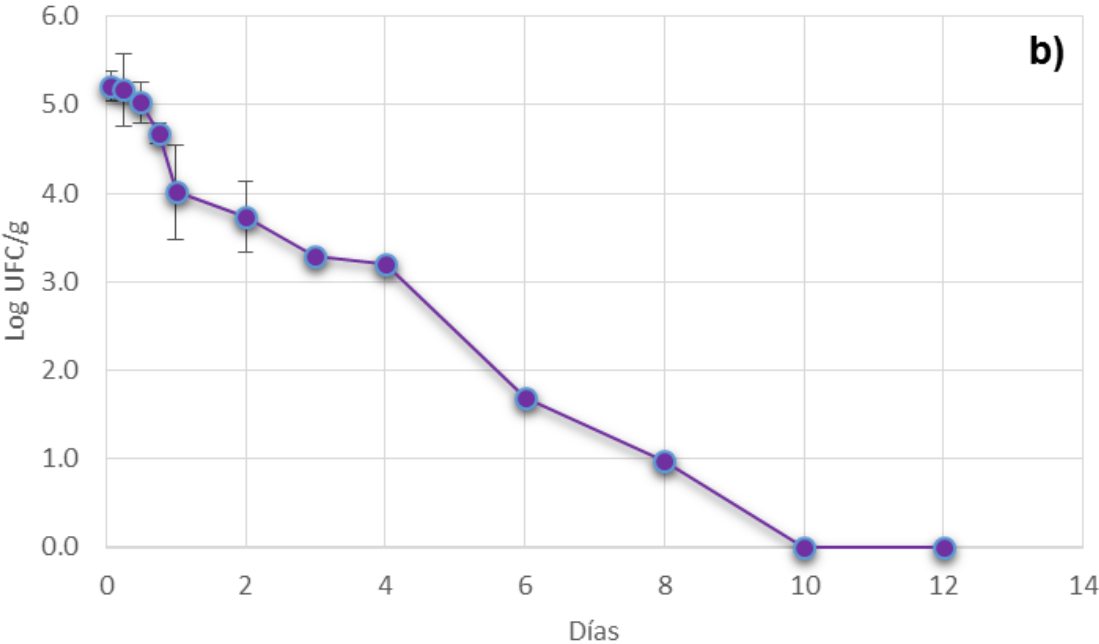
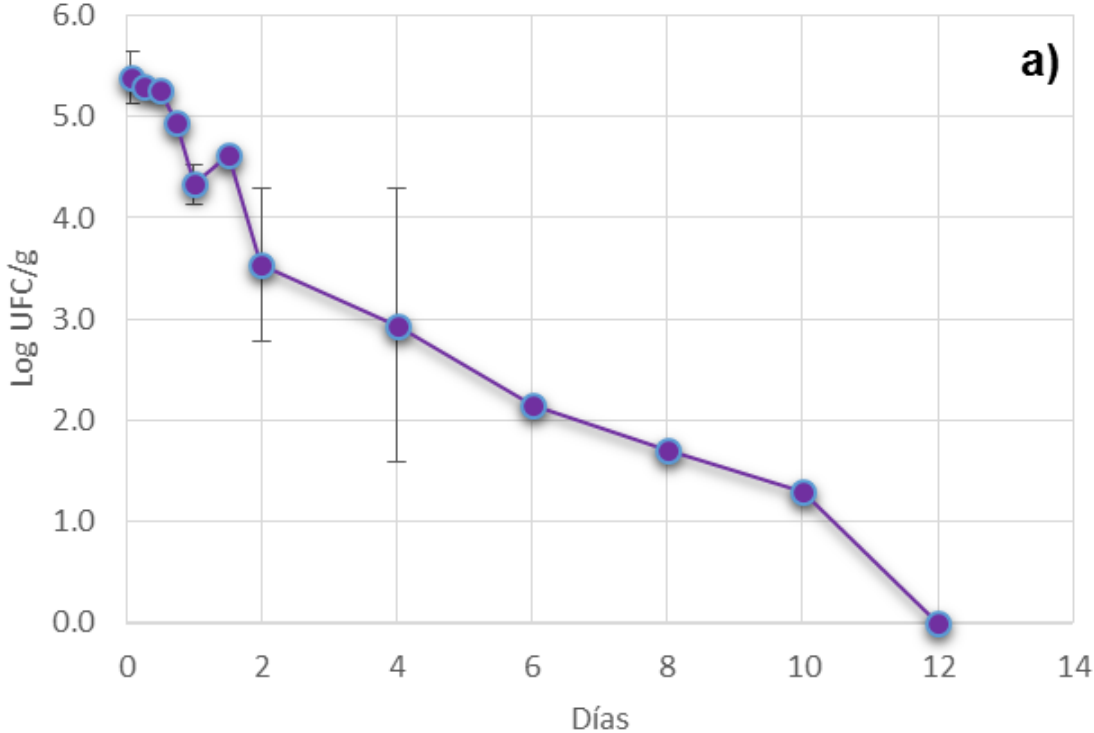
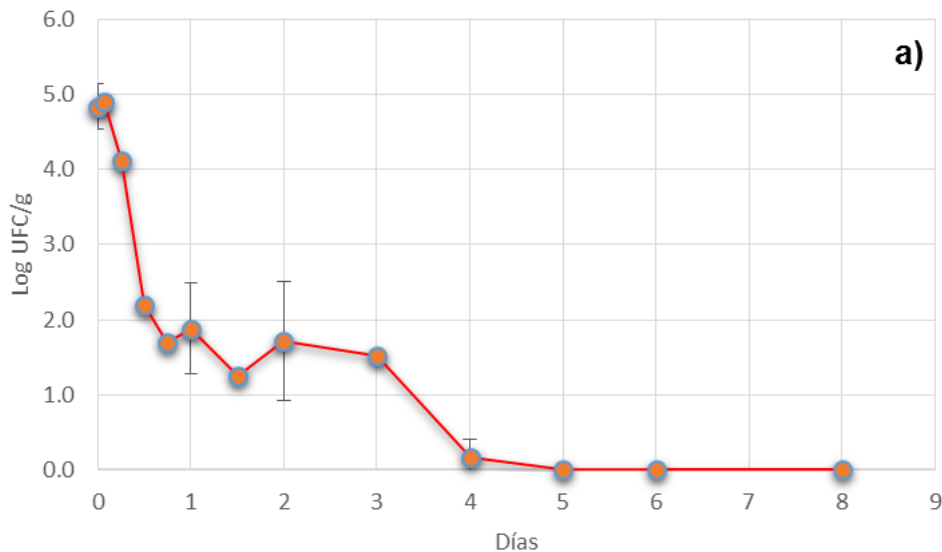


Figura 8. Comportamiento de cepas de *Salmonella* en muestras de pasas. En el eje de las "X" se presenta el tiempo en horas, en el eje de las "Y" se presenta la concentración bacteriana en Log UFC/g. En el inciso a) se presentan cepas de referencia, en el inciso b) cepas aisladas a partir de muestras del producto en etapas previas.

La sobrevivencia de *Salmonella* en muestras de jitomate fue menor que en los cacahuates y las pasas. En las muestras inoculadas con las cepas de referencias se observó la completa inactivación a las 148 horas (6 días), punto en el cual la concentración de *Salmonella* fue menor a 10 UFC/g. Respecto a la sobrevivencia de *Salmonella* en muestras de jitomate inoculadas con cepas aisladas del producto observó un comportamiento similar al presentado en las muestras inoculadas con cepas de referencia. Cabe hacer notar que durante el lapso de 18 a 36 horas se observó una ligera estacionalidad en el rango de 3.5 a 4 Log UFC/g, posterior a este lapso la tendencia a la inactivación continuó siendo clara (Figura 9).



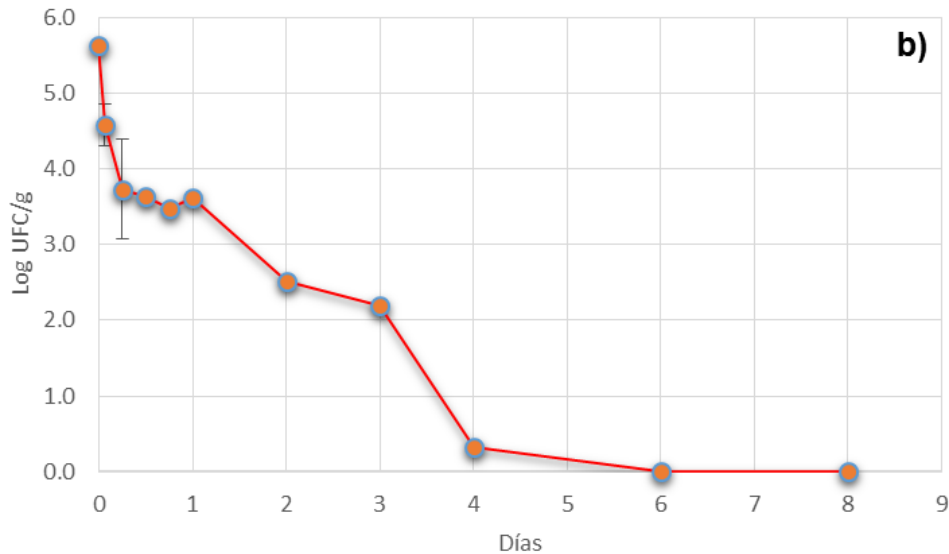


Figura 9. Comportamiento de cepas de *Salmonella* en muestras de jitomate deshidratado. En el eje de las "X" se presenta el tiempo en horas, en el eje de las "Y" se presenta la concentración bacteriana en Log UFC/g. En el inciso a) se presentan cepas de referencia, en el inciso b) cepas aisladas a partir de muestras del producto en etapas previas.

5.4. Protocolo para la detección de virus en alimentos deshidratados.

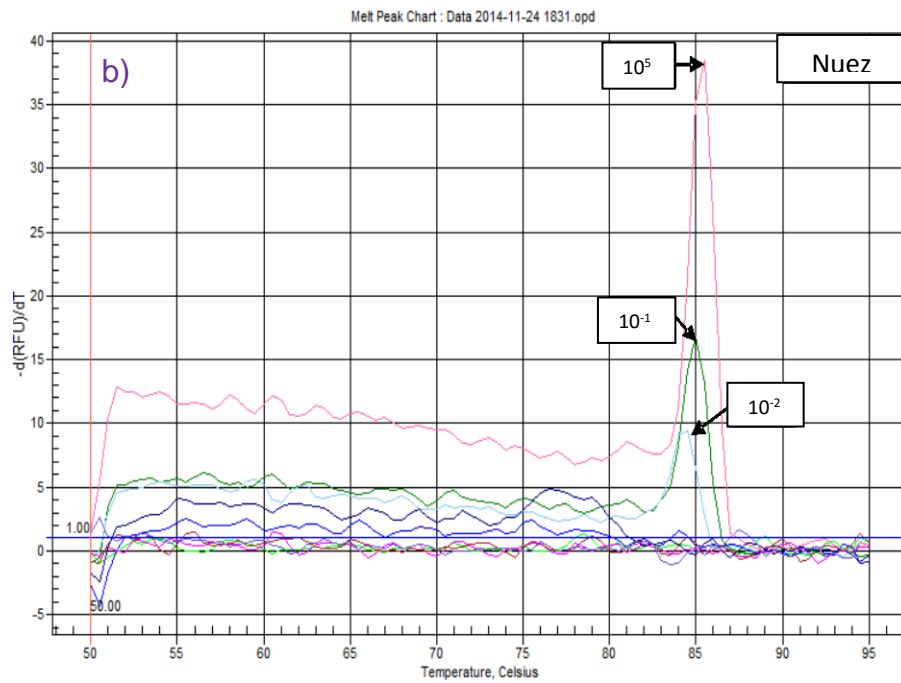
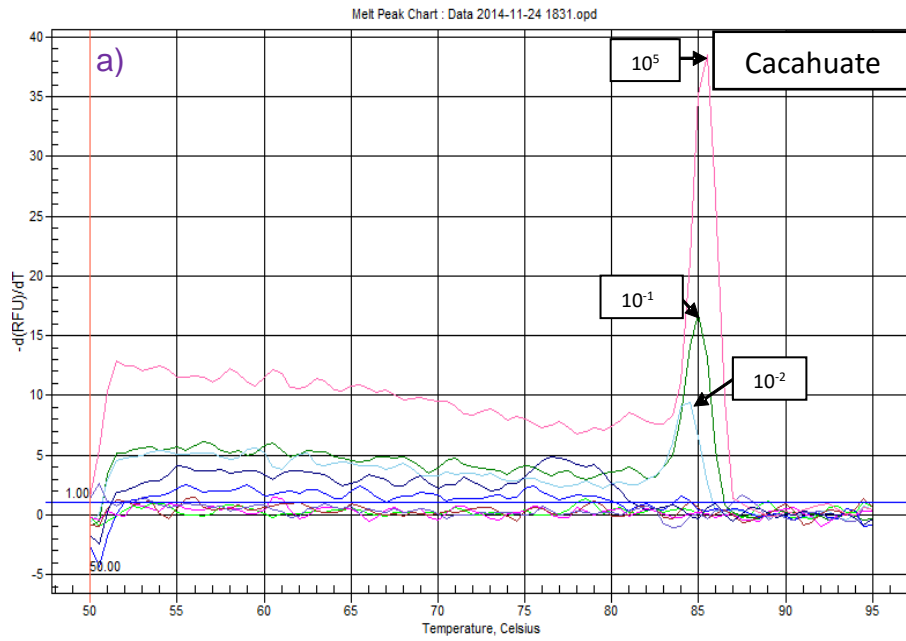
La extracción de ARN empleando el agente TRIzol™, seguida de la amplificación por RT-PCR fue capaz de detectar hasta -7 Log (<1 UFP/mL) del stock inoculado de MNV-1. Los cacahuates y nueces inoculados con el stock de MNV-1 mostraron una detección hasta de -3 Log (~ 4 Log UFP/mL o 4 Log unidades de RT-PCR) y hasta -5 Log (~ 3 Log UFP/mL o 3 Log unidades de RT-PCR), respectivamente. En el caso de pasas y jitomates deshidratados, la detección fue de hasta -6 Log (<1 UFP/mL) y -1 Log (~ 10 UFP/mL o 1 Log de unidades de RT-PCR), respectivamente. Los geles de electroforesis resultantes de la amplificación de RNA producto de la extracción de muestras de alimentos de baja Aw inoculadas mostraron bandas de 115 pb, lo cual corresponde al tamaño esperado para MNV-1. En este caso se optó por presentar las curvas de disociación obtenidas en este experimento ya que la temperatura de disociación de los iniciadores empleados nos ayudó a corroborar que los productos formados fueran aquellos correspondientes a la amplificación de MNV-1 (Figura 10). En el

eje horizontal se observa la temperatura en grados Celsius y en el eje vertical la fluorescencia emitida. Los exponentes indican el límite de detección. El exponente positivo indica el control positivo (ARN producto de extracción por calor).

El norovirus es resistente a la acidez. Después de 3 horas a pH 2.7 y temperatura ambiente no se pierde la infectividad; en pH neutro sobrevive 60 min a 60 °C (Dolin *et al.*, 1972). También muestra resistencia al tratamiento térmico. La vía primaria de transmisión es la fecal oral, en hospitales y hoteles se ha demostrado la participación de fomites e incluso la vía aérea (Caul, 1994; Green *et al.*, 1998; Cheesbrough *et al.*, 2000). Se estima que más de 30 millones de partículas virales pueden ser expulsadas durante un acceso de vómito por un portador (Caul, 1994).

El protocolo aquí presentado es el resultado de conjuntar técnicas tanto de extracción de material genético como de amplificación del mismo. Dichas técnicas lograron arrojar los resultados presentados, sin embargo, es necesario el mejoramiento y establecimiento de técnicas adecuadas a este tipo de alimentos, ya que si bien logramos detectar MNV-1 inoculado en cacahuate, pasas y jitomate, en nuez no se logró amplificar material genético, lamentablemente por el tiempo establecido para la estandarización de la técnica no fue posible profundizar en la investigación de las probables causas por las cuales la amplificación de material genético no fue posible en nuez. En contraste, la amplificación de RNA de MNV-1 a partir de muestras de cacahuate, pasas y jitomate inoculadas se pudieron confirmar mediante electroforesis (Figura 11).

Adicionalmente, el empleo de la técnica de RT-LAMP; sin embargo, no se logró amplificar el producto esperado para MNV-1 en cacahuates, nueces, pasas y jitomate deshidratado.



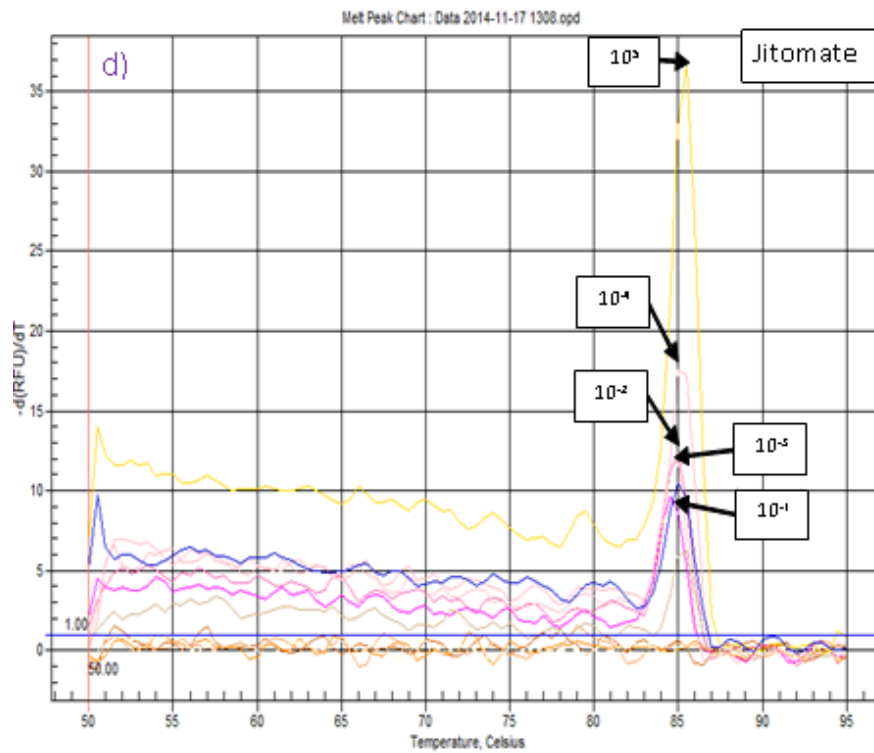
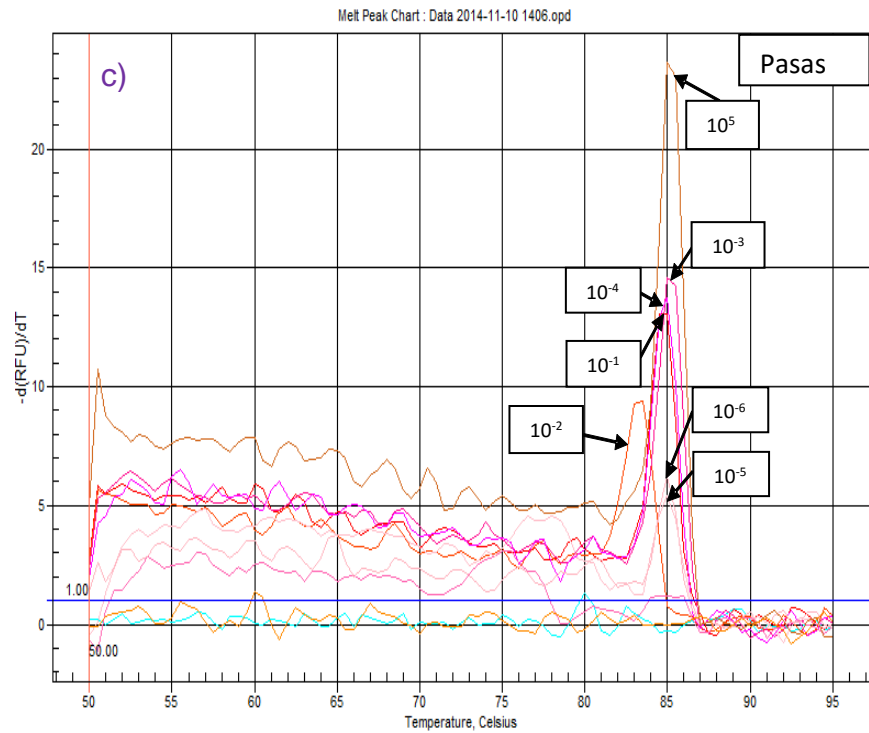


Figura 10. Curvas de disociación de RT-PCR para muestras de alimentos de baja Aw inoculadas con MNV-1. a) Cacahuates, b) Nuez, c) Pasas, d) Jitomate.

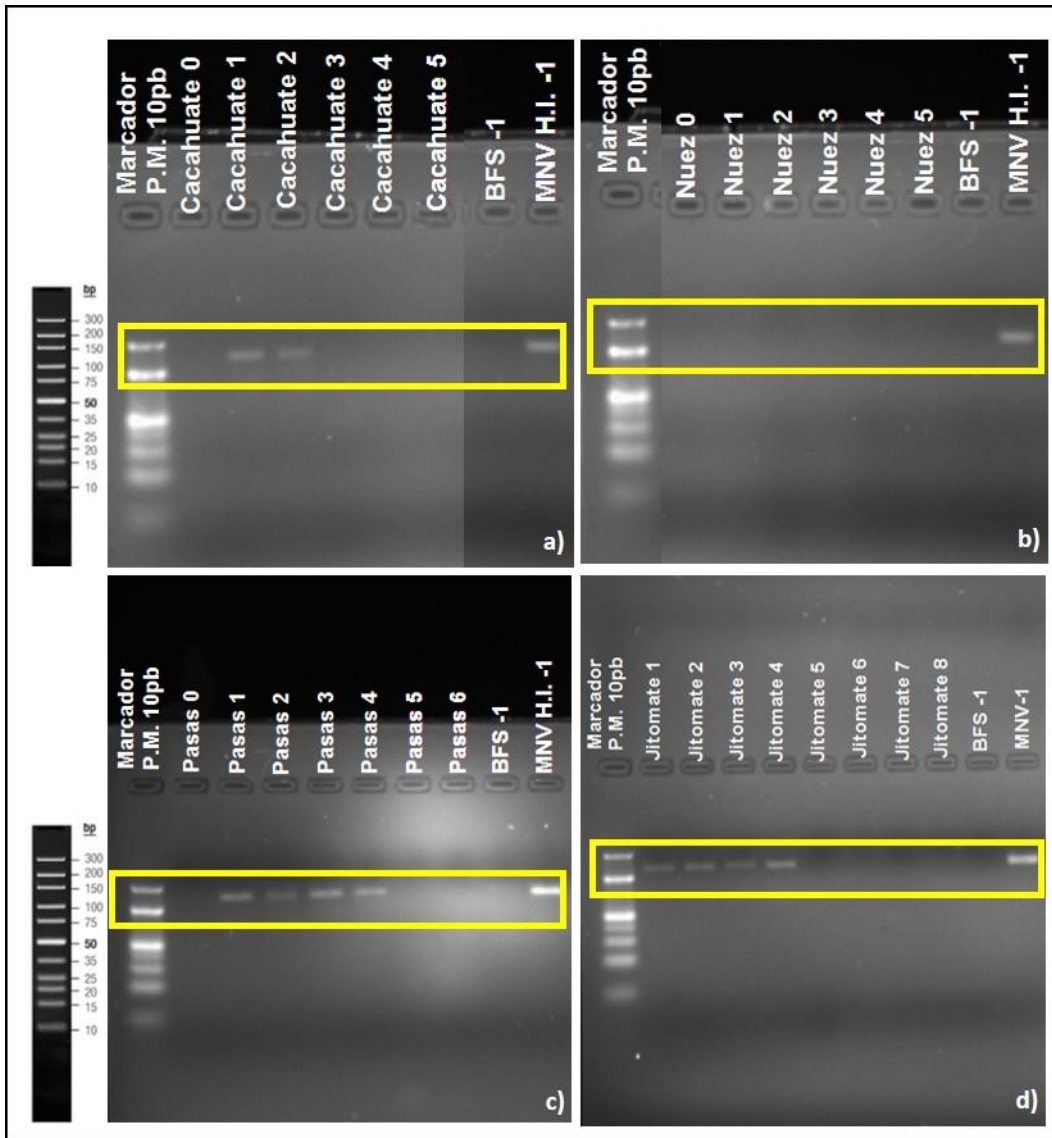


Figura 11. Geles de electroforesis de la amplificación de productos obtenidos mediante RT-PCR de la extracción de ARN. A partir de 25 g de muestras de alimentos de baja Aw inoculados con 200 μ L MNV-1. a) Cacahuates, b) Nuez, c) Pasas, d) Jitomate. En las imágenes los números 0 a 6 indican el límite de detección para cada producto. BFS-1 se refiere a buffer de fosfatos salinos (control negativo); MNV-1 se refiere al control positivo (ARN obtenido a partir de inactivación por calor).

Algunos investigadores (Moore *et al.*, 1979; Teltsch y Katzenelson, 1978) demostraron la diseminación de virus (echovirus, enterovirus) en la atmósfera

mediante la formación de aerosoles que se generan durante el riego de hortalizas por aspersión con aguas residuales tratadas. Algunos enterovirus sobreviven mejor que los coliformes y las salmonelas en el aire contaminado por aerosoles en las plantas de tratamiento de aguas negras (Teltsch *et al.*, 1980). De ahí que esas bacterias no deben ser empleadas como indicadores confiables de la presencia de virus patógenos en el agua y otros materiales procedentes del medio ambiente. Los virus se retienen bien por adsorción en la tierra; los suelos arcillosos son los más eficientes (Drewry y Eliassen, 1968).

Debido al carácter estrictamente parasitario intracelular de los virus, ninguno de ellos se multiplica en los alimentos. Así, el enfoque central en la prevención de las infecciones virales por vía de los alimentos, se enfoca en evitar la contaminación y en su inactivación. Esta última se logra fundamentalmente con tratamientos térmicos.

Si bien los virus no se multiplican fuera de las células, muestran capacidad para mantenerse infectantes fuera de ellas. La magnitud de esta cualidad es fundamental para comprender la epidemiología de las enfermedades virales y el tipo de acciones adecuadas a su prevención y control. El virus de la hepatitis A sobrevive en verduras almacenadas a 4-20 °C y muestra resistencia a la desinfección que se aplica al agua por cloración (Gerba, 1988). La resistencia al calor de los virus en general, es mayor que la que exhibe la mayoría de las bacterias no esporuladas; puede compararse con las cepas más termorresistentes de las formas vegetativas de los patógenos, por lo tanto, se pueden clasificar como microorganismos termodúricos.

El poder retentivo de bacterias y virus al infiltrarse con el agua en la tierra no es el mismo. Las bacterias se fijan con facilidad, al contrario, los virus se desplazan a mayores distancias tanto en sentido vertical como horizontal (Schaub y Sorber, 1977). Yeager y O'Brien (1979) confirmaron que el ritmo de inactivación de los virus entéricos depende claramente de la temperatura. A 4 °C se detectan al cabo de 180 días, destacando la importancia de la contaminación durante el invierno si se aplican aguas residuales en tierras de cultivo o a través de fosas

sépticas. Otros factores que influyen en la inactivación son el tipo de suelo receptor, el papel protector que les confieren algunos sólidos de las mismas aguas negras y el proceso de desecación; esta inactivación es mayor cuando los niveles de humedad se hacen más reducidos. La resistencia a la desecación se aproxima a la de las *Enterobacteriaceae* (Cliver, 1994). Así, la desecación se considera un eficiente recurso de inactivación. El daño al virión consiste en disociación de los componentes virales (genoma y cápside) y degradación del ARN (Yeager y O'Brien, 1979). Adicionalmente, la desecación acelera el proceso de inactivación; este efecto también se puede observar en frutas como las fresas conforme su humedad se pierde por evaporación (Konowalchuk y Speirs, 1975).

Entre las sustancias que se suelen incorporar a los alimentos para mejorar su apariencia o prolongar la vida comercial, el bisulfito de sodio y el ácido ascórbico pueden inactivar algunos enterovirus. El efecto depende de la concentración, temperatura y pH y parece ser irreversible (Salo y Cliver, 1978).

A pesar de la disminución en los índices de brotes reportados asociados a ETAS aún se requiere de gran trabajo en la detección de patógenos ya que como se ha mencionado la reducción en la incidencia de brotes por patógenos desconocidos se ha dado a la par de la identificación de virus en alimentos. A esto podemos sumar la desmitificación de que los microorganismos patógenos para el hombre no sobreviven en alimentos de baja actividad de agua. Es por este motivo que se recalca la importancia de implementar técnicas de detección que no sólo estén enfocadas al estudio de bacterias. Se debe considerar también que la aplicación adecuada de buenas prácticas agrícolas es un factor de alta relevancia en la tarea de reducir al mínimo la contaminación antes de la cosecha y durante ella. Así mismo, los tratamientos de inactivación deben ser validados y acompañados de un programa de seguimiento para determinar si controlan de manera eficaz los patógenos entéricos para así poder asegurar la inocuidad tanto de materias primas como de productos que se ofrecen a los consumidores y evitar que se produzca una contaminación.

Si bien EE.UU. ha demostrado con estos estudios la presencia de microorganismos patógenos (*Salmonella* y *E. coli* enterohemorrágica específicamente) e incluso virus en productos de baja Aw, en México hace falta investigación que genere información que contribuya al conocimiento del comportamiento de microorganismos patógenos en alimentos de baja Aw ya que como se ha mencionado, son alimentos que pueden ofrecer condiciones adecuadas para la sobrevivencia de patógenos; este riesgo puede verse incrementado si no se tiene control en el manejo de estos productos, desde su obtención hasta su sitio de venta. En nuestro país podemos encontrar este tipo de alimentos exhibidos a granel expuestos a numerosas fuentes de contaminación lo cual potencializa el riesgo si no se llevan las prácticas higiénicas adecuadas en la obtención y el procesado de este tipo de productos. Otro factor que incrementa el riesgo de enfermar de quien los consume es que por lo general estos productos son de consumo directo, es decir, la mayoría no recibe un tratamiento previo al consumo.

VI. CONCLUSIONES

Como resultado de esta investigación, se logró establecer el perfil microbiológico de algunos alimentos de baja Aw, específicamente cacahuete, nuez, pasas, jitomate deshidratado y chocolate, así como la incidencia de *Salmonella* spp. en los mismos.

Este trabajo hace un aporte importante al contribuir con información respecto al contenido de BMA, OCT, hongos y levaduras que pueda ser de utilidad a nuestro país para establecer normas en relación al contenido de microorganismos indicadores en alimentos de baja Aw ya que actualmente no existe normatividad al respecto.

La elevada incidencia de *Salmonella* en cacahuete (31 %), nuez (40 %), pasas (30 %), jitomate (56 %) y chocolate (26 %), confirma que aun exhibiendo condiciones adversas para el desarrollo de microorganismos, estos pueden estar presentes e incluso sobrevivir por largos periodos representando un riesgo para la población en general. El hecho se agrava al ser estos productos (excepto el jitomate deshidratado) alimentos de consumo popular en diversidad de alimentos como lo son ensaladas, postres, botanas, etc. Si bien hemos mencionado que en nuestro país el consumo del jitomate deshidratado no es común, dicho producto comienza a encontrar nichos en público que busca productos “*gourmet*”. Adicionalmente y como una alternativa para la disminución de pérdidas poscosecha, se ha optado por ofertar este producto por parte de algunos productores nacionales, incluido la misma UAQ.

Es necesario continuar con la estandarización de los protocolos para la detección de virus en alimentos, que permitan la generación de información acerca de la incidencia de estos patógenos en alimentos de baja Aw que permitan conocer el riesgo al consumidor asociado a su presencia en este tipo de alimentos.

VII. LITERATURA CITADA

- [ECOM] Ecom Canada Ingredients. 1997. Available from: <http://ecomcanada.com/tomato.html>. Accessed 2001 Feb 3.
- [TDF] Traina Dried Fruit. 1999. Available from: <http://www.traina.com>. Accessed 2000 Nov 2.
- 7 CFR Part 981. Almonds grown in California; outgoing quality control requirements. Final rule. 72(61):15021–15036.
- Abdalla Sara A, Sulieman E. Abdel Moneim and Salih A. Zakaria. 2014. Chemical and Microbiological Characteristics of Two Tomato Cultivars Dried Using Shade and Oven Methods. *J Food Nutr Disor* 2014, 3:3.
- Adams, J. C. and Thielges, B. A. 1977. Research underway on pecan timber improvement. *Louisiana Agriculture*. 20:14-15.
- Adler, J.L.; Zickl, R. 1969. Winter vomiting disease. *J. virus infect. Dis.* 119:668-673.
- Akpan I, Olusegun O, Ogunfowokan, OA. 2004. Microbiological quality and nutrient composition of dry tomato. *J. Food. Sci. Technol.*, 41(4): 420 – 422.
- Almond Board of California, 2012. Programa de monitoreo ambiental de patógenos (MAP). Modesto, CA. USA.
- Appleton, H. 1994. Norwalk virus and the small round viruses causing foodborne gastroenteritis: 57-79. In: *Foodborne Disease Handbook*. Hui, Y.H., Gorham, J.R., Murrell, K.D. and Cliver, D. O. (Eds.). Vol. 2. Marcel Dekker, Inc. N.Y.
- Ardhana, M.M., Fleet, G.H. 2003 The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia, *International Journal of Food Microbiology* 86: 87-89.
- Battilani, P., Chiusa, G., Trevisan, M., and Ghebbioni, C. Methods for microbiological quality evaluation of tomato fruits. *Rivista di Scienza dell’Alimentazione* 24(4):555–563, 1995.

- Beckett, Stephen. 2009. Industrial chocolate manufacture and use. Fourth Edition. Wiley-Blackwell. Iowa, USA.
- Beuchat, L.R. 1975. Incidence of molds on pecan nuts at different points during harvesting. *Appl. Microbiol.* 29 (6): 852.
- Beuchat, L.R. 1994. Microbiology and sanitation. In: Pecan Technology. C.R. Santerre (Ed.) pp 87-97. Chapman & Hall, New York.
- Beuchat, L.R. y Heaton, E.K. 1975. *Salmonella* survival on pecans as influenced by processing and storage conditions. *Appl. Microbiol.* 29: 795-801.
- Beuchat, L.R. y Heaton, E.K. 1980. Factors influencing fungal quality of pecans stored at refrigeration temperatures. *J. Food Sci.* 45: 251.
- Beuchat, Larry R., Komitopoulou, Evangelia, Beckers, Harry, Betts, Roy P., Bourdichon, François, Fanning, Séamus, Joosten, Han M., Ter Kuile, Benno H. 2013. Low–Water Activity Foods: Increased Concern as Vehicles of Foodborne Pathogens. *J. Food Prot.* 2013 Jan;76(1):150-72.
- Brisson, R. F. 1985. Cultivo del Nogal Pecanero. Editorial CONAFRUT. México. 350 p.
- Burnett, S.L., E.R. Gehm, W.R. Weissinger, and L.R. Beuchat. 2000. Survival of *Salmonella* in peanut butter and peanut butter spread. *J. Appl. Bacteriol.* 89:472–477.
- Castillo, I.; Jarquín, D; Fortis, M.; Vázquez, C.; Gallegos, M.A. 2013. Producción y comercialización de nuez pecanera (*Carya illinoensis* Koch) en el norte de Coahuila, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.* Vol 4, No.3.
- Caul, E.O. 1994. Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *Lancet* 343:1240-1242.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1986. Gastroenteritis outbreaks on two Caribbean cruise ships. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* 35:383-384.

Centers for Disease Control and Prevention. 1990. Viral agents of gastroenteritis. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 39/RR-5:1-24.

Centers for Disease Control and Prevention. 1995. Foodborne hepatitis A—Missouri, Wisconsin, and Alaska, 1990–1992. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 42:526–529.

Centers for Disease Control and Prevention. 1997. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 46 (No. RR-10):1–55.

Centers for Disease Control and Prevention. 2001. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese—North Carolina, October 2000–January 2001. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 50:560–562.

Centers for Disease Control and Prevention. April 10, 2009. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food—10 states, 2008. *MMWR Weekly* 58:333–337.

Centers for Disease Control and Prevention. April 14, 2009a. *Salmonella* in pistachio nuts, 2009. Available at: <http://www.cdc.gov/salmonella/pistachios/> Accessed: 23 May 2014.

Centers for Disease Control and Prevention. January 29, 2009b. Multistate outbreak of *Salmonella* infections associated with peanut butter and peanut butter–containing products—United States, 2008–2009. *MMWR Weekly* 58 (Early Release):1–6.

Centers for Disease Control and Prevention. June 1, 2007. Multistate outbreak of *Salmonella* serotype Tennessee infections associated with peanut butter—United States, 2006–2007. *MMWR Weekly* 56(21):521–524.

Centers for Disease Control and Prevention. June 11, 2004. Outbreak of *Salmonella* serotype Enteritidis infections associated with raw almonds—United States and Canada—2003–2004. *MMWR Weekly* 53(22):484–487.

- Cheesbrough, J.S, Green, J., Gallimore, C.I., *et al.* 2000. Widespread environmental contamination with Norwalk-like viruses (NLV) detected in a prolonged hotel outbreak of gastroenteritis. *Epidemiol. Infect.* 125:93-98.
- Chiple, J.R. y Heaton E.K. 1971. Microbial flora of pecan meat. *Appl. Microbiol.* 22: 252.
- Chow de la Peña, M. 2007. Propuesta de inversión para una línea de descascarado de un conjunto de Huertas Nogaleras. Tesis Licenciatura. Universidad de las Américas Puebla. México.
- Christensen, C.M. y Kaufmann, H.H. 1976. Contaminación por Hongos en Granos Almacenados. Ed. PAX-MEXICO, México, D.F.
- Cliver, D.O. 1990. Viruses: 275-292. In: *Foodborne Diseases*. Cliver, D.O. (Ed.), Acad. Press Inc.
- Cliver, D.O. 1994. Epidemiology of foodborne viruses: 159-175. In: *Foodborne Disease Handbook*. Hui, Y.H., Gorham, J.R., Murrell, K.D. and Cliver, D.O. (Eds). Vol. 2, Marcel Dekker, Inc., N.Y.
- Cordier, J.L. 1994. HACCP in the chocolate industry, *Food Control*, Vol. 5, No. 3, pp. 171-175.
- D'Aoust, J.-Y. 1977. Salmonella and the chocolate industry – a review. *Journal of Food Protection*, 40(10), 718–727.
- D'Aoust, J.Y. Chapter 9: *Salmonella*. In Doyle, MP, editor, *Foodborne Bacterial Pathogens*, New York, NY: Marcel Dekker, 1989, p. 327-445.
- Danyluk, M.D., M. Nozawa-Inoue, K.R. Hristova, K.M. Scow, B. Lampinen, and L.J. Harris. 2007a. Survival and growth of *Salmonella* Enteritidis PT 30 in almond orchard soils. *J. Appl. Microbiol* 104:1391–1399.

- Danyluk, M.D., T.M. Jones, S.J. Abd, F. Schlitt-Dittrich, M. Jacobs and L.J. Harris. 2007b. Prevalence and amounts of *Salmonella* found on raw California almonds. *J. Food Protect.* 70:820–827.
- Doane, F.W.; Andersons, M. 1987. *Electron Microscopy in Diagnostic Virology*, Cambridge University Press, N.Y.
- Dolin, R., Blacklow, N.R., DuPont, H., *et al.* 1972. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 140:758-783.
- Douglas, King. A. Jr., y Duane, Lindsay L. 1992. Nut meats. In: *compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Carl Venderzant (Ed.) pp 1019.
- Drewry, W.A.; Eliassen, R. 1968. Virus movement in groundwater. *J. Water Poll. Control Fed.* 40:R257-R271.
- Duxbury, D.D y Meinhold, N.M. 1990. Tree Nuts: Growing from a snack food into a healthy ingredient. *Food Processing* 51(5).
- Economic Research Service United States Department of Agriculture (ERS-USDA-NASS) 2005. <http://www.fas.usda.gov/ustrade> (Accessed: 23 Mayo 2014).
- Eglezos, S., B. Huang and E. Stuttard. 2008. A survey of the bacteriological quality of preroasted peanut, almond, cashew, hazelnut, and brazil nut kernels received into three Australian nutprocessing facilities over a period of 3 years. *J. Food Protect.* 71:402–404.
- Eliosa-Martínez, J. A. Migración internacional. 2012. Estrategia de sobrevivencia e identidad campesina en San Felipe Teotlacingo, Puebla, México. *Rev. Agrc. Soc. Des.* 9(1):71-84.
- Escartín, 2008. *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos*. Ed. Universidad Autónoma de Querétaro. Pp: 419-429, 663-665, 695.

- FAO. 2002. Nutrición humana en el mundo en desarrollo. Colección FAO: Alimentación y nutrición N° 29. Roma, Italia.
- FAO. 2004. Manual de capacitación. Conservación de frutas y hortalizas mediante tecnologías combinadas.
- FAO. 2012. Prevención y control de la *Salmonella* y la *E. coli* enterohemorrágica en los frutos secos. EMPRES Inocuidad de los Alimentos. Serie sobre Enseñanzas Aprendidas. Vol. 2. Junio de 2012.
- FDA. 2009. Update on pistachio product recall. Available at: <http://www.fda.gov/Safety/Recalls/MajorProductRecalls/Pistachio/Update/default.htm> Accessed: 23 Mayo 2014.
- FDA. 2014. Bad Bug Book: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm> Accessed 23 May 2014.
- FDA. 2014. Bad Bug Book: *Salmonella* spp. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/food/foodborneillnesscontaminants/ucm297627.pdf> Accessed 23 Mayo 2014.
- FDA. December 17, 2009a. Recall–firm press release: Willamette shelling recalls shelled hazelnuts because of possible health risk. Available at: <http://www.fda.gov/Safety/Recalls/ucm194806.htm> Accessed: 23 Mayo 2014.
- FDA. November 11, 2009b. Safety: enforcement report for November 11, 2009. Raw macadamia nuts contaminated with *Salmonella*. Available at: <http://www.fda.gov/Safety/Recalls/EnforcementReports/ucm190285.htm> Accessed: 23 Mayo 2014.
- Fideicomiso Instituido en Relación a la Agricultura (FIRA). 1993. Boletín Informativo. La nuez pecanera: Situación y perspectivas en México. 47(34):765:790.

- Financiera Rural. 2011. Monografía del cacahuate. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial. Dirección Ejecutiva de Análisis Sectorial. México.
- Food Standards Australia New Zealand. Guidelines for the microbiological examination of ready - to - eat foods. 2001.
- Food-Info. 2014. ¿Cuál es la composición (física y química) de los granos, de la manteca, de la masa y del polvo de cacao? Disponible en: <http://www.food-info.net/es/qa/qa-fp48.htm>
- Frankhauser, R.L., Herrmann, J.E., Booth, J.W., *et al.* 1998. Molecular epidemiology of “Norwalk-like viruses” in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Inf. Dis.* 178:1571-1578.
- Eroski Fundación. 2014. Ficha técnica uva pasa. Disponible en: <http://frutas.consumer.es/uva-pasa/>
- Geldreich, E. E. water quality. 1970. Applying bacteriological parameters to recreational J. *Am. Water Works Assoc.* 62:113-120.
- Gerba, C.P. 1988. Viral disease transmission by seafoods. *Food Technol.* 42 (3):99-103.
- González, Victor. 2005. Cacao en México: Competitividad y Medio Ambiente con Alianzas. INIFAP e IPRC para USAID, México. pp. 16-18.
- Gould, L. H. Walsh K. A., Vieira A. R., Herman K., Williams I. T., Hall A. J. 2013. Surveillance for Foodborne Disease outbreaks. United States, 1998-2008. Vol. 62, No. 2. Centers of Disease Control and Prevention. USA.
- Gray, O. S. 1973. Consider pollen when planting. *The Pecan quarterly.* 7(3):24-25.
- Green J., Wright, P.A., Gallimore, C.I., *et al.* 1998. Role of environmental contamination with small round structured viruses in a hospital outbreak investigated by reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J. Hosp. Infect.* 39:39-45.

- Hao, D. Y.-Y., E. K. Heaton, and L. R. Beuchat. 1989. Microbial, compositional, and other quality characteristics of pecan kernels stored at -20°C for twenty-five years. *J. Food Sci.* 54:472–474.
- Herrera, E. y Clevenger, T. 1996. Importancia Económica de la Industria Nogalera en EUA. Guía Z-501, Nuevo México, EE.UU. Servicio Cooperativo de Extensión Agrícola. NMSU. 2-5 pp.
- Ho, J.L., Shands, K.N., Friedland, G., Ecking, P., and Fraser, D.W. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Arch Int Med* 146:520–524,1986.
- Hui, Y.H., Ghazala, S., Graham, Dee M., Murrell, K.D., Nip, Wai-Kit. 2004. Handbook of Vegetable Preservation and Processing. New York, NY: Marcel Dekker p. 21
- Isaacs, S., J. Aramini, B. Ciebin, J.A. Farrar, R. Ahmed, D. Middleton, A.U. Chandran, L.J. Harris, M. Howes, E. Chan, A.S. Pichette, K. Campbell, A. Gupta, L.Y. Lior, M. Pearce, C. Clark, F. Rodgers, F. Jamieson, I. Brophy and A. Ellis. 2005. An international outbreak of salmonellosis associated with raw almonds contaminated with a rare type of *Salmonella* Enteritidis. *J. Food Protect.* 68:191–198.
- Isiaka M. 2013 Quality assessment of solar energy dried tomato flakes. *Arid Zone Journal of Engineering, Technology and Environment.* August, 2013; Vol. 9, 1-71.
- Jaykus, L.A. 2000a. Enteric viruses as ‘emerging’ agents of foodborne disease. *Irish J. Agric. Food Res.* 39,245–255.
- Jaykus, L.A. 2000b. Detection of human enteric viruses in foods. In: Hui, Y.H., Sattar, S.A., Murrell, K.D., Nip, W.K., Stanfield, P.S. (Eds.), *Foodborne Disease Handbook, Viruses, Parasites, and HACCP*, vol.2, seconded. Marcel Dekker, New York, pp.137–163.
- Joffe, A.Z. 1969. The mycoflora of fresh and stored ground nut kernels in Israel. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 39: 255.

- Johnson, D. C. United States is World Leader in Tree Nut Production and Trade. USDA-ERS Fruit and Tree Nuts Situation and Outlook. FTS-280. August 1997. 908 pp.
- Kapperud, G., H. Stenwig and J. Lassen. 1998. Epidemiology of *Salmonella typhimurium* O:4–12 infection in Norway. Am. J. Epidemiol. 147:774–782.
- Kazemi Abdolhassan; Ostadrahimi Alireza; Ashrafnejad Fereshteh; Sargheini Nafiseh; Mahdavi Reza; Farshchian Mohammadreza; Mahluji Sepideh. 2013. Mold Contamination of Untreated and Roasted With Salt Nuts (Walnuts, Peanuts and Pistachios) Sold at Markets of Tabriz, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2014 January; 7(1): e8751.
- King Jr., A.D., y Schade, J.E. 1986. Influence of almond harvesting processing and storage on fungal population and flora. J. Food Sci. 51: 202.
- Kirk, M.D., C.L. Little, M. Lem, M. Fyfe, D. Genobile, A. Tan, J. Threfall, A. Paccagnella, D. Lightfoot, H. Lyi, L. McIntyre, L. Ward, D.J. Brown, S. Surnam and IST Fisher. 2004. An outbreak due to peanuts in their shell caused by *Salmonella enterica* serotypes Stanley and Newport –sharing molecular information to solve international outbreaks. Epidemiol. Infect. 132:571–577.
- Kohls, R. L. and Uhl, J. N. Marketing of Agricultural Products. Mcmilan Publishing Co., Inc. New York. 1985. 98(45):1348-1360.
- Komitopoulou, E., Penaloza, W., 2009. Fate of Salmonella in dry confectionery raw materials. Journal of Applied Microbiology 106, 1892–1900.
- Konowalchuck, J.; Speirs, J.I. 1975. Survival of enteric viruses on fresh vegetables. J. Food Prot. 38:469-472.
- Kopanic Jr., R.J., B.W. Sheldon, and C.G. Wright. 1994. Cockroaches as vectors of *Salmonella*: laboratory and field trials. J. Food Protect. 57:125–132.

- Kuusi, M., Nuorti, J.P., Maunulla, L., *et al.* 2002. A prolonged outbreak of Norwalk-like calicivirus (NLV) gastroenteritis in a rehabilitation center due to environmental contamination. *Epidemiol. Infect.* 129:133-138.
- Latapi, Guadalupe and Barret, M. Diane. 2006. Influence of Pre-drying treatments on Quality and Safety of Sun-dried Tomatoes. Part II. Effects of Storage on Nutritional and Sensory Quality of Sun-dried Tomatoes Pretreated with Sulfur, Sodium Metabisulfite, or Salt. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*—Vol. 71, Nr. 1, 2006.
- Little, C.L., N. Rawal, E. de Pinna, J. McLauchlin, and the Food, Water, and Environmental Surveillance Network. 2009a. LACORS/HPA co-ordinated food liaison group studies: assessment of the microbiological safety of edible nut kernels on retail sale in the UK with a focus on *Salmonella*. Available at: <http://www.lacors.gov.uk/lacors/ContentDetails.aspx?id=22118>. Accessed: 23 Mayo 2014.
- Little, C.L., W. Jemmott, S. Surman-Lee, L. Hucklesby and E. de Penna. 2009b. Assessment of the microbiological safety of edible roasted nut kernels on retail sale in England, with a focus on *Salmonella*. *J. Food Protect.* 72:853–855.
- Liu, T. 2002. Application of nested polymerase chain reaction to detection of *Salmonella* in poultry environment. *J. Food Prot.* 65:1227–1234.
- López, A. 2003. Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas, del campo al mercado. Boletín de servicios agrícolas de la FAO 151, Roma, Italia.
- Love, S.S., Xiang, X., Barrett, E., *et al.* 2002. A large hotel outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis among three groups of guests and hotel employees in Virginia. *Epidemiol. Infect.* 129:127-132.
- Mahamadou E. Gounga, Shi-ying Xu, Zhang Wang. 2008. Nutritional and microbiological evaluations of chocolate-coated Chinese chestnut (*Castanea mollissima*) fruit for commercial use. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. ISSN 1673-1581 (Print); ISSN 1862-1783 (Online) www.zju.edu.cn/jzus; www.springerlink.com

- Marcus, K.A. y Amling, H.J. 1973. *Escherichia coli* field contamination of pecan nuts Appl. Microbiol. 26: 279.
- Marks, P.J., Vipond, I.B., Carlisle, D., Deakin, D., Fey, R.E., Caul, E.O. 2000. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. Epidemiol. Infect. 124, 481–487.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V. 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis. 5,607–625.
- Medina, M. M. C. y Cano, R. P. 2002. Aspectos generales del Nogal Pecanero. In: tecnología de producción en Nogal Pecanero. Libro Técnico Núm. 3. Primera edición. INIFAP. Campo Experimental La Laguna, Matamoros, Coahuila. 222 p.
- Meerburg, B.G. and A. Kijlstra. 2007. Role of rodents in transmission of *Salmonella* and *Campylobacter*. J. Sci. Food Agricul. 87:2774–2781.
- Moore, B.E., Sagik, B.P., Sorber, C.A. 1979. Procedure for the recovery of airborne human enteric viruses during the spray irrigation of treated wastewater. Appl. Environ. Microbiol. 38:688-693.
- Morita, T., H. Kitazawa, T. Iida and S. Kamata. 2006. Prevention of *Salmonella* cross-contamination in an oilmeal manufacturing plant. J. Appl. Microbiol. 101:464–473.
- Mrak EM, Phaff HJ, Perry RL, Marsh GL, Fisher CD. 1946. Fruit dehydration. California Univ. Agricultural Experiment Station Bulletin 698. Berkeley, Calif.
- Müller, L.L., M. Hjertqvist, L. Payne, H. Pettersson, A. Olsson, L. Plym-Forsell and Y. Andersson. 2007. Cluster of *Salmonella* Enteritidis in Sweden 2005–2006–suspected source: almonds. Eurosurveillance 12:153–155.
- Murphy, W.H.; Silverton, J.T. 1958. Adsorption and translocation of mammalian viruses by plants. II: Recovery and distribution of viruses in plants. Virology 6:623-636.

- Murray, Patrick. 2002. Microbiología médica. Cuarta Edición. Ed. Mosby. Barcelona. p. 725.
- National Pecan Shellers Assosiation. 2007. National Pecan Shellers Association. Retrieved from I love Pecans: <http://www.ilovepecans.org/indust.html> Accessed 23 Mayo 2014.
- Nelson, T. C. 1965. Silvical Characteristics of the Commercial Hickories. In: Hickory Task Force Report 10. Southeastern Forest Experiment Station, USDA Forest Service. Asheville, NC, USA. 121 pp.
- Nielsen, D.S., Teniola, O.D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T.S. and Holzapfel, W.H. 2007. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. International Journal of Food Microbiology, 114: 168-186.
- Olorunda AO, Aworth OC and Onuoha CN. Upgrading quality of dried tomato: Effects of drying methods, conditions and pre-drying treatments. 1990: J. Sci Food and Agric., 52; 447-454.
- Patterson, W., Haswell, P., Fryers, P.T., Green, J. 1997. Outbreak of small round structured virus gastroenteritis arose after kitchen assistant vomited .Comm. Dis. Rep. CDC Rev.7, R101–R103.
- Podolak, R., Enache, E., Stone,W., Black, D.G., Elliott, P.H., 2010. Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of Salmonella in low-moisture foods. Journal of Food Protection 73, 1919–1936.
- Polles, G.S., Hanny, B.W., y Harvey, A.J. 1981. Condensed tannins in kernels of thirty-one pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch] cultivaris. J. Agric. Food Chem. 26(5): 1214.
- Pouch Downes, F. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of food. Fourth edition. Ed. American Public Health Association.

- R.C. Witthuhn, S. Engelbrecht, E. Joubert and T.J. Britz. 2004. Microbial content of commercial South African high-moisture dried fruits. *Journal of Applied Microbiology* 2005, 98, 722–726.
- Ratti, C.; Mujumdar, A. S. 2005. Drying of fruits. In: Barret et al. (Comp.) *Processing fruits*. CRC PRESS. USA. Cap.7.
- Riyaz-Ul-Hassan, S., V. Verma, A. Malik and G.N. Qazi. 2003. Microbiological quality of walnut kernels and apple juice concentrate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19:845–850.
- Sair, A.I.; D'Souza, D.H.; Moe, L.C.; Jaykus, L. 2001. Improved detection of human enteric viruses in foods by RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 100:57-69.
- Salo, R.J.; Cliver, D.O. 1978. Inactivation of enteroviruses by ascorbic acid and sodium bisulfite. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:68-75.
- Sangerman-Jarquín, D. M. Espitia-Rangel, E. Villaseñor- Mir, H. E. Navarro-Bravo, A. Larqué-Saavedra, B. S. De la O- Olán, M. Torres- García, R. 2012. Transferencia de tecnología a los productores trigueros en Nanacamilpa, Tlaxcala. 2012. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 3(8):1591-1604.
- Santerre, C.R. 1994. Pecan composition. In: *Pecan Technology*. C.R. Santerre (Ed.). pp: 98-110. Chapman & Hall, New York, London.
- Schaub, S.A.; Sober, C.A. 1977. Virus and bacterial removal from wastewater by rapid infiltration through soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:609-619.
- Scheil, W, C Dalton, S Cameron and C Murray. 1997. A multistate *Salmonella* Mbandaka outbreak associated with peanut butter: the South Australian experience. *J. Clin. Epidemiol.* 50 (supplement 1):S18.
- Scheil, W., S. Cameron, C. Dalton, C. Murray and D. Wilson. 1998. A South Australian *Salmonella* Mbandaka investigation using a database to select controls. *Australian New Zealand J. Pub. Health* 22:536–539.

- Schwab, K.J., Estes, M.K.; Atmar, R.L. 2000. Norwalk and other human caliciviruses: molecular characterization, epidemiology, and pathogenesis: 469-493. In: Microbial Foodborne Diseases. Mechanisms of Pathogenesis. Cary, J.W., Linz, J.E. and Bhatnagar, D. (Eds.). Technomic Publ. Co. Penn. EUA.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA- SIACON) 1980-2010. México, D. F. 54 pp.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2010a. Monografía de cultivos, jitomate. México, D.F.
- Segura, R. 2001. Valor nutricional-frutos secos y salud. Composición de los frutos secos y su valor nutricional Conferencia "Salud y Frutos Secos". Celebrada en Reus el 16 de mayo de 2001. Disponible en: http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/ae613/composition_esp.htm Accessed 23 Mayo 2014.
- Sekla, L., Stackiw, W., Kay, C., Van Buckenhout, L. 1980. Enteric viruses in renovated water in Manitoba. Can. J. Microbiol. 26:518-523.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), 2014. Monografías de productos agrícolas generados en México, nuez encarcelada.
- Shachar, D and S. Yaron. 2006. Heat tolerance of *Salmonella* enterica serovars Agona, Enteritidis, and Typhimurium in peanut butter. J. Food Protect. 69:2687–2691.
- Shimi, A., M. Keyhani and K. Hedayati. 1979. Studies on salmonellosis in the house mouse, *Mus musculus*. Laboratory Animals 13:33–34.
- Somogyi LP, Luh, BS. Vegetable dehydration. In: S Luh, JG Woodroof, eds. Commercial Vegetable Processing. 2d ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1988, pp 387-437.
- Stock, S.L., C.B. Annett, C.D. Sibley, M. McLaws, S.L. Checkley, N. Singh, M.G. Surette and A.P. White. 2007. Persistence of *Salmonella* on egg conveyor belts is

dependent on the belt type but not the rdar morphotype. *Poultry Sci.* 86:2375–2383.

Teltsch, B., Kedmi, S., Bonnet, I. *et al.* 1980. Isolation and identification of pathogenic microorganisms at wastewater irrigated fields ratios in air and wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:1183-1190.

Teltsch, B.; Katzenelson, E. 1978. Airborne enteric bacteria and viruses from spray irrigation with wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:290-296.

Toole, E. R. 1965. Pecan (*Carya illinoensis*). In: Fowells, H. A. (Comp.). *Silvics of forest trees of the United States. Agriculture Handbook 271*, Washington, DC. 12-15 p.

Uesugi, A.R. and L.J. Harris. 2006. Growth of *Salmonella* Enteritidis phage type 30 in almond hull and shell slurries and survival in drying almond hulls. *J. Food Protect.* 69:712–718.

Uesugi, A.R., M.D. Danyluk, and L.H Harris. 2006. Survival of *Salmonella* Enteritidis phage type 30 on inoculated almonds stored at -20, 4, 23, and 35°C. *J. Food Protect* 69:1851–1857.

Uesugi, A.R., M.D. Danyluk, R.E. Mandrell, and L.J. Harris. 2007. Isolation of *Salmonella* Enteritidis phage type 30 from a single almond orchard over a 5–year period. *J. Food Protect.* 70:1784–1789.

USDA-FAS. 2008. Gain report: Mexico tree nuts annual- revised 2008. Gain report number: MX3107.

Valley Sun. 2000. Sun-dried tomato—the valley sun difference. Newman, Calif. Available from: <http://www.valleysun.com>. Accessed 2001 Jan 1.

Vázquez, B. Ma., 1998. Sensibilidad de la almendra de genotipos criollos de nuez pecanera (*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch) originarios del centro de la república mexicana a la infección por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* toxigénicos. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. México.

- Venkatachalm, M. y Sathe, K.S. 2005. Chemical composition of selected edible nut seeds. *J.Agric.FoodChem.*2006,54,4705–4714.
- Vural, A. and M.E. Erkan. 2008. The research of microbiological quality in some edible nut kinds. *J. Food Technol.* 6:25–28.
- Wacher, R.M., 2011. Microorganismos y chocolate. *Revista Digital Universitaria*. Coordinación de Publicaciones Digitales. Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación UNAM. • Volumen 12 Número 4 • ISSN: 1067-6079.
- Wesche, A.M., Gurtler, J.B., Marks, B.P., Ryser, E.T., 2009. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection* 72, 1121–1138.
- Wilkoff, L.J., L. Westbrook and G.J. Dixon. 1969. Persistence of *Salmonella typhimurium* on fabrics. *Appl Microbiol.* 18:256–261.
- Willis, C., C.L. Little, S. Sagoo, E. de Penna and J. Threlfall. 2009 [In Press]. Assessment of the microbiological safety of edible dried seeds from retail premises in the United Kingdom with a focus on *Salmonella* spp. *Food Microbiol.*, doi 10.1016/j.fm.2009.05.007.
- Winfield, M.D. and E.A. Groisman. 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3687-3694.
- Witthuhn, R.C., Engelbrecht, S., Joubert, E. and Britz, T.J. 2005. Microbial content of commercial South African high-moisture dried fruits. *Journal of Applied Microbiology* 2005, 98, 722–726.
- Wood, R.C., Hedburg, C., and White, K. A multistate outbreak of *Salmonella javiana* infections associated with raw tomatoes. 40th Ann. Conf. U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA, 1991.

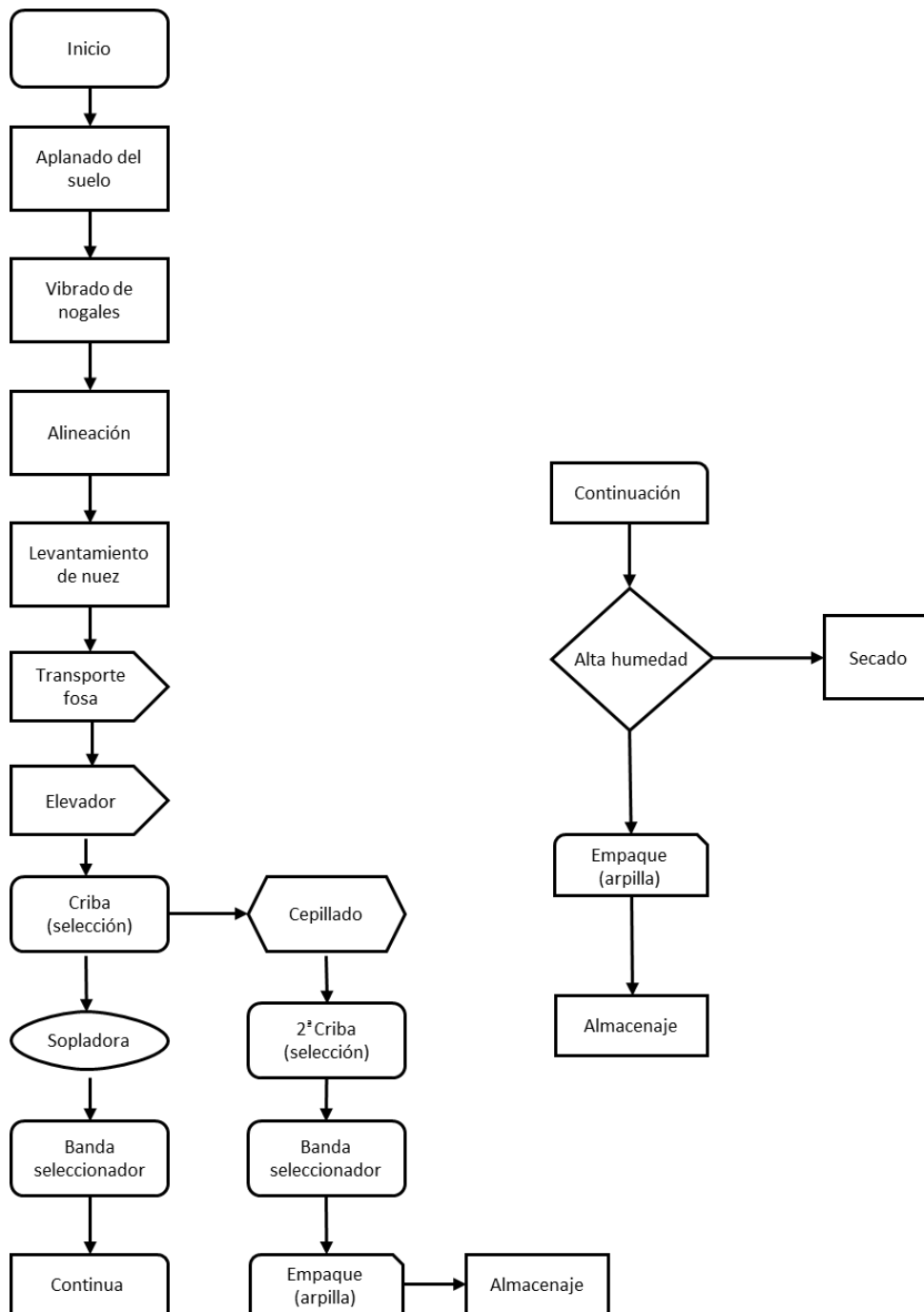
Worley, R.E. 1994. Pecan physiology and composition. In: Pecan Technology. C.R. Santerre (Ed.). pp 39-48. Chapman & Hall, New York, London.

Yeager, J.G.; O'Brien, R.T. 1979. Enterovirus inactivation in soil. Appl. Environ. Microbiol. 38:694-701.

Yeong, B.K., Yasutaka, K., Akitsugu, I., and Reinosuke, N. Effect of storage temperature on keeping quality of tomato and strawberry fruits. J Korean Soc Hort Sci 37(4):526–532, 1996.

VI. ANEXOS

Anexo I. Diagrama de flujo correspondiente al procesado de nuez pecanera (Chow de la Peña, 2007)



Anexo I-B. Diagrama general de procesamiento de jitomate. (Hui et al., 2004).

