



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**“SOBREVIVENCIA DE *Salmonella enterica* EN LECHUGA DURANTE EL
ALMACENAMIENTO Y EN PRESENCIA DE ACEITE ESENCIAL DE NARANJA
(*CITRUS AURANTIUM AMARA*)”**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA

IBT. YESENIA CRUZ JARQUIN

DIRIGIDO POR

DRA. SOFÍA MARÍA ARVIZU MEDRANO

Querétaro, Qro. A 13 de Febrero de 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de
Información



Sobrevivencia de Salmonella enterica en lechuga
durante el almacenamiento y en presencia de aceite
esencial de naranja (*Citrus aurantium amara*)

por

Yesenia Cruz Jarquin

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

Clave RI: FQMAC-300231-0323-223

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

**SOBREVIVENCIA DE *Salmonella enterica* EN LECHUGA DURANTE EL
ALMACENAMIENTO Y EN PRESENCIA DE ACEITE ESENCIAL DE NARANJA
(*CITRUS AURANTIUM AMARA*)**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de **MAESTRO EN
CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Presenta

IBT. Yesenia Cruz Jarquin

Dirigido por

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

SINODALES

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Presidenta

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Secretario

Dr. Diego García Gonzálo

Vocal

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

Suplente

Dr. Omar Hernández Hernández

Suplente

Querétaro, Qro.

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que incluí los detalles metodológicos necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



Yesenia Cruz Jarquin

DEDICATORIA

A mi padre Jesus Cruz Montes, que sé me mira y apoya desde el cielo, y ha sido mi principal ejemplo y motor para lograr mis proyectos. Te amo papá.

A mi familia, por su cariño, apoyo incondicional y darme ánimos en la búsqueda de mis sueños.

A mis amigos Salvador, Johana y Cristina por el apoyo, pero en especial por las risas que lograron mantenerme fuerte en este camino.

A la Dra. Sofía María Arvizu Medrano, gracias dra. por su paciencia y cariño, por ser mi ejemplo como mujer, pero sobre todo por brindarme el apoyo durante todo momento durante mi formación.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Gracias por el apoyo económico otorgado durante la realización de mis estudios.

A la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ)

Gracias por la formación brindada, por ser una escuela ejemplar que me apoyó y brindó los mejores servicios de atención durante mi formación.

A Dra. Sofía M. Arvizu Medrano

Gracias por la oportunidad de compartir sus conocimientos conmigo, pero sobre todo por su apoyo no solo en lo académico sino en lo personal, por su amistad y cariño.

A sinodales Dra. Sofía María Arvizu Medrano, Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz, Dr. Diego García Gonzálo, Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar y Dr. Omar Hernández Hernández

Gracias por sus consejos, comentarios pero sobre todo por ser guías durante todo el proyecto.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	6
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
I.- INTRODUCCIÓN	13
II.- ANTECEDENTES	15
2.1 Lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.)	15
2.1.1 Descripción de la lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.)	15
2.1.2 Producción de lechuga	16
2.1.3 Consumo de lechuga en México	17
2.2 Contaminación durante el cultivo y cosecha de productos hortofrutícolas.	18
2.3 Sobrevivencia y desarrollo de los microorganismos patógenos en productos hortofrutícolas.	19
2.3.1 Factores que afectan el comportamiento microbiano.	19
2.3.2 Adhesión y formación de biopelículas de <i>Salmonella</i> spp. durante la producción y almacenamiento de productos hortofrutícolas.	20
2.4.- Brotes de enfermedad e incidencias de <i>Salmonella</i> en lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L).	21
2.5.- <i>Salmonella</i> spp.	23
2.5.1 Características generales.	23
2.5.2 Salmonelosis.	23
2.6.- <i>Salmonella</i> en México.	24
2.6.1 Presencia de <i>Salmonella</i> en México.	24
2.7.- Control y agentes antimicrobianos.	27
2.7.1 Desinfección de productos hortofrutícolas.	27
2.7.2 Aceites esenciales como antimicrobianos en alimentos.	28
2.8 Aceite esencial de naranja (<i>Citrus Aurantium</i> Amara) como agente antimicrobiano	29
III. JUSTIFICACIÓN	
IV.- OBJETIVOS.	32
4.1 Objetivo general.	32
4.2 Objetivos específicos.	32
V. METODOLOGÍA.	33

5.1 Materiales.	33
5.1.1 Lechuga.	33
5.1.2 AE de naranja (<i>Citrus Aurantium Amara</i>)	33
5.1.3 Cepas de <i>Salmonella</i> .	33
5.1.4 Perlas de acero inoxidable	34
5.1.5 Equipos principales	34
5.2 Métodos.	34
5.2.2 Procedimientos generales	34
5.2.2.1 Preparación del inóculo.	34
5.2.2.2 Preparación del extracto de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L).	34
5.2.3 Condiciones de temperatura de los principales estados productores de lechuga en México	35
5.2.4 Caracterización de aceite esencial de naranja amarga	36
5.2.5 Evaluación de la capacidad de desarrollo y formación de biopelículas de <i>Salmonella</i> con extracto de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L).	36
5.2.5.1 Evaluación de la capacidad de desarrollo, formación de biopelículas de <i>Salmonella</i> en esferas de acero inoxidable con extracto de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.).	37
5.2.6 Evaluación de la capacidad de cepas de <i>Salmonella</i> para adherirse y formar biopelículas en lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L).	38
5.2.6.1 Evaluación del efecto antimicrobiano sobre el aceite esencial de naranja (AEN) sobre cepas de <i>Salmonella entérica</i>	40
5.2.7 Efecto del encapsulado de AEN sobre <i>Salmonella</i> depositada, adherida y en biopelículas sobre lechuga.	41
5.2.7.1 Preparación del encapsulado de AEN (<i>C. aurantifolia</i>) pag 39	41
5.2.7.2 Efecto del complejo de inclusión b-ciclodextrina_de AEN sobre <i>Salmonella</i> depositada, adherida y en biopelícula sobre lechuga	42
5.2.9. Análisis estadísticos	43
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
6.1 Evaluación de la capacidad de desarrollo y formación de biopelículas de <i>Salmonella</i> con extracto de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L).	44
6.1.1 Selección del extracto de lechuga como nutriente para el desarrollo de <i>Salmonella</i> .	44

6.2 Evaluación de la capacidad de desarrollo y formación de biopelículas de <i>Salmonella</i> en esferas de acero inoxidable con extracto de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L).	48
6.3 Caracterización de aceite esencial de naranja amarga (AEN)	50
6.4 Evaluación de la capacidad de cepas de <i>Salmonella</i> para adherirse y formar biopelículas en lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L).	52
6.5 Efecto antimicrobiano del aceite esencial de naranja sobre <i>Salmonella entérica</i>	55
6.6 Efecto del encapsulado de AEN sobre <i>Salmonella</i> adherida sobre lechuga	57
VII. CONCLUSIONES	60
VIII.- REFERENCIAS	61

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	Página
1.- Taxonomía de la lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L).	16
2.- Cepas de <i>Salmonella</i> entérica	33
3.- Días de almacenamiento y recuento de células viables en cada nivel de temperatura	42
4.- Análisis bromatológicos de la muestra del extracto de lechuga 3 % utilizada para cinéticas de <i>Salmonella</i>	46
5.- Incremento de la población de cepas de <i>Salmonella</i> en extracto de lechuga al 3 %	47
6.- Caracterización física del AEN	50
7.- Inhibición del AEN sobre cepas de <i>Salmonella</i>	56

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	Página
1.- Área cosechada y producción de Lechuga periodo 2008-2018 con base de datos estadísticos corporativos de la Organización para la Alimentación y la Agricultura.	17
2.-Casos de salmonelosis y otras enfermedades relacionadas en México.	26
3.- Representación de porciones de lechuga inoculadas con <i>Salmonella</i>	39
4.- Representación de la evaluación de la capacidad de cepas de <i>Salmonella</i> para adherirse y formar biopelículas en lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L).	40
5.- Promedio de la temperatura mínima, media y máxima para identificar los niveles de temperatura de 10 entidades de mayor producción	44
6.Cinetica de crecimiento de <i>Salmonella</i> con extracto de lechuga 0.5,1 y 3 %	45
7.-Cinetica de crecimiento en 48 h de <i>Salmonella</i> en contacto con esferas de acero inoxidable	48
8.- Asociación entre la capacidad de formación de biopolímeros y desarrollo de cepas de <i>Salmonella</i> (incremento 48 h)	49
9.- Cromatografía de gases acopladas a masas del AEN	51
10.- Adhesión (%) de <i>Salmonella</i> durante 3 horas de contacto con lechuga en 95 % de HR y presencia de extracto de lechuga	52
11.- Cinética de crecimiento de <i>Salmonella</i> durante 48 horas en contacto con lechuga en presencia de extracto de lechuga (3 %) y almacenadas a 30 °C.	54
12.- Cinética de formación de polímeros por cepas de <i>Salmonella</i> durante 48 horas en contacto con lechuga	54
13.- Efecto antimicrobiano de AEN sobre <i>Salmonella</i>	56
14.- Comparación de cinética de crecimiento de <i>Salmonella</i> sobre lechuga a 10 °C de temperatura, HR 95 %	57
15.- Resultados obtenidos del almacenamiento de <i>Salmonella</i> sobre lechuga a 30 °C de temperatura, HR 95 %	57

RESUMEN

Salmonella enterica ha sido reportada como una de las principales causas de brotes asociados al consumo de vegetales. La eficacia de los tratamientos de desinfección aplicados a los productos hortícolas puede verse reducida por la presencia de biopelículas bacterianas. Además, algunos desinfectantes tienen un efecto negativo en el medio ambiente, por ello existe una tendencia a utilizar compuestos antimicrobianos de origen vegetal en alimentos para el control de microorganismos patógenos al humano. El objetivo de este trabajo fue evaluar la supervivencia de *Salmonella enterica* en biopelículas sobre lechuga durante el almacenamiento y en presencia de aceite esencial de naranja verde (AEN) encapsulado. Se evaluó la capacidad de crecimiento y formación de biopelículas de 20 cepas de *Salmonella enterica* en extracto de lechuga y esferas de acero inoxidable a 35 °C mediante cultivo y la técnica del cristal violeta. Las seis cepas de *Salmonella* con mayor capacidad de adhesión y colonización se inocularon en lechuga y se almacenaron a 10° y 30° C. Se dio seguimiento a las poblaciones del patógeno y a la formación de biopolímeros durante el almacenamiento. Finalmente se determinó el efecto antimicrobiano del AEN encapsulado sobre *Salmonella* en la superficie de la lechuga. Todas las cepas mostraron capacidad de desarrollarse en el extracto de lechuga a lo largo del almacenamiento con un incremento promedio de 2.6 Log UFC/ml. Se seleccionaron las cepas S1, S5, S12, S7, S3 y S9 por su capacidad de adhesión, desarrollo y formación de biopolímeros en esferas de acero inoxidable con extracto de lechuga. Tanto en 10, como en 30 ° C se observó desarrollo del microorganismo; sin la presencia de AEN, el patógeno pudo aumentar su población en aproximadamente 0,8 y 2,0 Log UFC/cm² a 30 y 10 ° C, respectivamente. La presencia de AEN, tanto encapsulados como no encapsulado, redujo la población alcanzada por *Salmonella* al final del almacenamiento mostrando diferencias de 0.4 Log UFC/ cm² comparado con el control a 30°C y hasta 1 Log UFC/cm² comparado a 10 °C. Los agentes antimicrobianos extraídos de las plantas pueden ser una estrategia eficiente para reducir la actividad de patógenos como *Salmonella* en lechuga.

Palabras clave: *Salmonella*, biopelículas, aceite esencial de naranja encapsulado, lechuga.

ABSTRACT

Salmonella enterica has been reported as one of the main causes of outbreaks associated with fresh produce consumption. The efficacy of disinfection treatments applied to fresh produce can be reduced by the presence of bacterial biofilms. In addition, some disinfectants have a negative effect on the environment, so there is a tendency to use antimicrobial compounds of vegetable origin in food for the control of human pathogens. The objective of this work was to evaluate the survival of *S. enterica* adhered on lettuce during storage in the presence of encapsulated green orange essential oil (AEN). The ability of 20 *S. enterica* strains to grow and form biofilms on lettuce extract and stainless steel spheres at 35 °C was evaluated by culture and the crystal violet technique. The 6 *Salmonella* strains with the highest adhesion and colonization capacity were inoculated on lettuce and stored at 10° and 30°C. Pathogen populations and biopolymer formation during storage were monitored. Finally, the antimicrobial effect of encapsulated AEN on *Salmonella* on the surface of lettuce was determined. All strains showed capacity to grow on lettuce extract throughout storage with an average increase of 2.6 Log CFU/ml. Strains S1, S5, S12, S7, S3 and S9 were selected for their ability to adhere, develop and produce biopolymers on stainless steel spheres with lettuce extract. Both at 10 and 30°C, microorganism development was observed; without the presence of AEN, the pathogen was able to increase its population by approximately 0.8 and 2.0 Log CFU/cm² at 30 and 10 °C, respectively. The presence of AEN, both encapsulated and un-encapsulated, reduced the population reached by *Salmonella* at the end of storage by differences of 0.4 Log CFU/ cm² compared to the control at 30 °C and up to 1 Log CFU/ cm² compared to 10 °C. Antimicrobial agents extracted from plants can be an efficient strategy to reduce the activity of pathogens such as *Salmonella* in lettuce.

Keywords: *Salmonella*, biofilms, orange essential oil, encapsulated, lettuce.

I. INTRODUCCIÓN

México ocupa el décimo primer lugar en producción de cultivos agrícolas a nivel mundial (SIAP, 2020). La producción de hortalizas frescas en México se ha incrementado en las últimas décadas (Araneda *et al.*, 2018) y nuestro país se encuentra entre los 10 primeros lugares en exportación mundial de hortalizas como aguacate, brócoli, coliflor, pepino y lechuga (SIAP, 2021). Las hortalizas para consumo en fresco han sido frecuentemente involucradas en brotes de enfermedades en Estados Unidos y el mundo (Ferris, 2022). Los productos hortofrutícolas asociados con más frecuencia, incluyen lechuga, espinaca, germinados, tomates, bayas y melón cataloupe (González, 2021); mientras que entre las bacterias enteropatógenas más importantes asociadas con las enfermedades transmitidas por alimentos se encuentran *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* (Heiman *et al.*, 2015), *Shigella sonnei* (Lynch y Hedberg 2009), y *Salmonella* spp. (Mba-Jonas *et al.*, 2018). Siendo *Salmonella* el principal causante de brotes o enfermedades asociadas al cultivo de verduras a nivel mundial. En México se ha documentado la presencia de este microorganismo patógeno en alimentos frescos que ha causado diversos brotes (Vázquez-Garcidueñas *et al.*, 2014), en los que participan diferentes serovares como *Salmonella* Typhimurium (Cabrera-Díaz *et al.*, 2013).

Si bien la persistencia de *Salmonella* en los frutos podría estar asociada a procesos como adhesión, generación de biopelículas y/o protección en estructuras de la superficie del fruto, los factores ambientales pueden también influir de manera decisiva. La habilidad para formar biopelículas es un factor importante en la sobrevivencia y persistencia microbiana en entornos bajo diversas condiciones estresantes, como desecación, bajo pH y alta salinidad (Gu *et al.*, 2020). Por lo tanto, las bacterias en biopelículas son difíciles de eliminar o inactivar de las superficies, con lo que representan un mayor riesgo para la salud pública.

Se han desarrollado nuevas estrategias de control contra formación de biopelículas de los patógenos, como desarrollo de superficies anti-adhesión, la interrupción de la detección del quórum sensing y péptidos antimicrobianos dirigidos selectivamente (Nostro *et al.*, 2012). Además, hay una tendencia a la búsqueda de compuestos extraídos de plantas, como alternativas a los antimicrobianos tradicionales, por ejemplo, ácidos orgánicos, extractos de semillas de cítricos, y aceites esenciales. Dentro de este grupo destacan los aceites esenciales, los cuales tienen el atractivo adicional de que se pueden obtener de subproductos vegetales, el aceite esencial de naranja ha mostrado capacidad para inactivar patógenos como *Salmonella* en estudios *in vitro* (Cherrat *et al.*, 2014; Mattos De Olivera *et al.*, 2013; Signorini *et al.*, 2018). De acuerdo a lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar la sobrevivencia de *Salmonella enterica* en lechuga (*Lactuca sativa* L) durante el almacenamiento y en presencia de aceite esencial de naranja encapsulado (*Citrus Aurantium Amara*).

II. ANTECEDENTES

2.1 Lechuga (*Lactuca sativa* L)

2.1.1 Descripción de la lechuga (*Lactuca sativa* L).

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es una planta autógama, que presenta hojas redondeadas, lanceoladas o casi espatuladas, con su sistema radicular profundo y poco ramificado (Campos, 2012), según su taxonomía pertenece a la familia de Asteraceae y del género *Lactuca* (Cuadro 1), son de tallo cilíndrico y ramificado, presentan forma de aquenios provistos de hojas plumosas con ciclo vegetativo de 3 a 4 meses, alcanzando una altura entre los 10 y 20 cm y su rendimiento óptimo de cabeza es de 24.500 kg/ ha. Esta hortaliza posee un sistema radicular bien desarrollado, estando de acuerdo la ramificación a la compactación del suelo (Pérez *et al.*, 2018). Las flores son amarillas pequeñas, reunidas en anchas cimas corimbosas, con numerosas bractéolas (Aroquipa y Torres, 2020) y su contenido nutricional varía con el grado de color y la posición de la hoja en la cabeza (hojas externas e internas), las hojas externas son más ricas en nutrientes que las internas.

La temperatura óptima para el crecimiento y desarrollo vegetativo de *L. sativa* L. se encuentra en el rango de 14-18 °C diurno y entre 5-8 °C nocturno (Ruiz, 2022). La humedad relativa conveniente para la lechuga es del 60 al 80 % (General, 2009) mientras que el requerimiento del agua en el cultivo de lechuga es cerca de 400 mm durante el cultivo, es usualmente adecuado para un buen desarrollo de la planta ya que una baja humedad en el suelo sería perjudicial, disminuyendo el crecimiento (General, 2009).

Cuadro 1. Taxonomía de la lechuga (*Lactuca sativa* L.)

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Macrophyliophita
Sub-division	Magnoliphytina
Clase	Paenopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae/Compositae
Género	Lactuca
Especie	Sativa

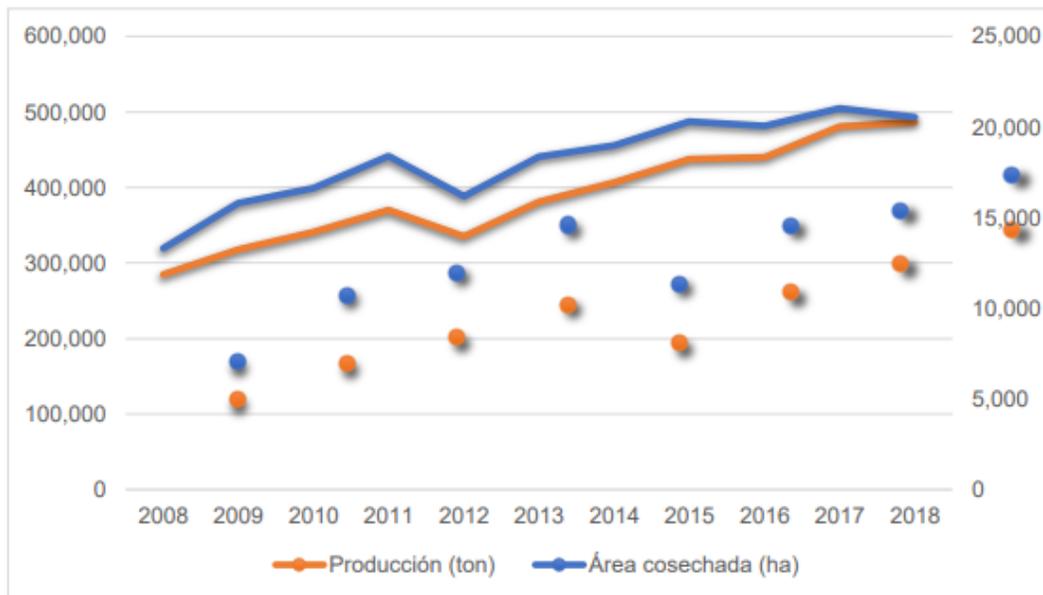
(Muñoz, 2018)

2.1.2 Producción de lechuga

En los últimos años en México, se cosecharon tres tipos y/o variedades de lechuga; *Baby leaf* que es una hortaliza considerada especial por estar orientada al segmento del mercado gourmet, por su diversidad de texturas y colores; *lechuga Escarola* que tiene un sabor ligeramente amargo y es la verdura con mayor contenido de ácido fólico. Y por último lechuga *Romana* que es la variedad de lechuga más común, con forma de ovillo compacto, sus hojas son largas y redondas, crujientes y de sabor suave (Paterlini *et al.*, 2019). En promedio cada año se comercializa internacionalmente 2.2 millones de toneladas de lechuga, donde destacan las exportaciones de México a países como Canadá, Costa Rica, Belice y Cuba según el Panomara agroalimentario (2022); En 2021 México se ubicó en el séptimo lugar a nivel mundial como productor con 509,084 toneladas, cantidad que ha mostrado un aumento en relación con años anteriores; debido al incremento en la demanda por parte de mercados que se han vuelto más selectivos y a que es una de las hortalizas más fáciles de consumir por el modo de preparación y por la implementación de sistemas que permiten una mayor producción de este cultivo.

2.1.3 Consumo de lechuga en México.

En la dieta humana las hortalizas tienen un importante papel como fuente de nutrientes y en el adecuado funcionamiento del aparato digestivo. En la última década el consumo de lechuga ha incrementado en todo el mundo debido a grandes beneficios que aporta a la salud (FAO, 2014) obtenido un saldo favorable en el área cosechada (Figura 1), traducido en la obtención de altos rendimientos en base a la superficie sembrada (CEDRSSA, 2018).



(CEDRSSA, 2018).

Figura 1. Área cosechada y producción de Lechuga periodo 2008-2018 con base de datos estadísticos corporativos de la Organización para la Alimentación y la Agricultura.

Según el Panorama Agroalimentario 2022, el consumo anual per cápita de México es de 2.2 kg, con un 3.3 % de participación en la producción nacional de hortalizas. La lechuga se produce en veintidós entidades de México, de los cuales los mayores productores del país son, Guanajuato produciendo 181,015 ton (30.1 %), seguido Zacatecas con 79,963 ton (14.4 %) y Baja California con 66,264 ton (14.2 %) a lo largo del año, dónde en su conjunto aportan un promedio mensual nacional de 42,971 toneladas.

2.2 Contaminación durante el cultivo y cosecha de productos hortofrutícolas

La contaminación precosecha de hortalizas puede deberse a una contaminación directa con cursos de agua, por el consumo de alimentos vegetales cultivados con aguas contaminadas, o por el consumo de alimentos del mar extraídos en cercanías a drenajes de aguas servidas (Pachepsky *et al.*, 2011), siendo persistente cuando existe descarga continua de aguas desecho, debido a una gran concentración de animales silvestres u otros reservorios ambientales presentes. En algunos casos de contaminación poscosecha, la presencia de *E. coli* en hortalizas, como los brotes de alfalfa, las espinacas frescas y los brotes de trébol crudos, es significativamente más alta en las etapas finales de poscosecha en comparación con las primeras etapas de manipulación (Frank *et al.*, 2012). En Chile, la detección de cepas de *Salmonella* multi-resistentes a los antimicrobianos en animales silvestres, es la evidencia que podría ser utilizada como un indicador al respecto (Dougnac *et al.*, 2015).

Evitar la contaminación de verduras crudas con *Salmonella* es importante ya que se utilizan para preparar alimentos frescos y dado las dosis bajas del patógeno pueden ser suficientes para causar enfermedad; aunque la dosis infectante que se reconoce es de 10^5 a 10^8 UFC, puede ser tan baja como 1 UFC dependiendo de la edad, la salud del huésped y características de la cepa (Serrano *et al.*, 2022).

2.3 Sobrevivencia y desarrollo de los microorganismos patógenos en productos hortofrutícolas.

2.3.1 Factores que afectan el comportamiento microbiano.

Se ha demostrado que los productos frescos pueden contaminarse en cualquier punto de la cadena de producción entre la granja y la mesa, ya sea durante las etapas en el campo, durante el procesamiento inicial y en la cocina (Salas *et al.*, 2023). Por su parte las aguas de riego de diferente origen pueden tener una capacidad diferente para transmitir patógenos y sobrevivir e incluso crecer en la superficie de la hoja, además de sobrevivir en agua de 4 °C y 20 °C (Van Der Linden *et al.*, 2014).

Hay tres tipos de factores que afectan el microbiota presente en los productos frescos y son físicos, químicos y biológicos; Los físicos, como la temperatura y la humedad, afectan el crecimiento y algunas actividades metabólicas de los microorganismos, se sugiere mantenerse la lechuga a temperatura entre 2 y 4 °C con humedad relativa del 85 – 90%, conservándose por un tiempo de 12 días bajo estas condiciones de almacenamiento (González & Galvis 2010). Desarrollo tecnológico para la optimización en la conservación de lechuga, tomate y zanahoria precortadas (alimentos mínimamente procesados). Los factores químicos incluyen el pH, la disponibilidad y el tipo de nutrientes en las verduras que pueden ser utilizados por los microorganismos. Por último, los factores biológicos incluyen la presencia de microbiota competitiva y las interacciones entre bacterias y plantas (Leyva, 2022). *Salmonella* se ha aislado de varias plantas utilizadas para el consumo humano como la espinaca, la lechuga, la alfalfa, el berro, el frijol, la rúcula, el tomate y el rábano, se consideran un hospedador secundario y ha desarrollado mecanismos de adhesión vegetal que varían según la cepa y la planta de que se trate (Franz *et al.*, 2007). Estas plantas tienen barreras físicas como cera, cutícula, pared celular y sitios de alojamiento como tricomas y estomas (poros naturales). Mientras tanto se ha demostrado que algunas bacterias utilizan las estomas como puntos de entrada al interior de las hojas donde pueden sobrevivir y penetrar en el interior de la planta en el apoplasto (Barak *et al.*, 2005; Dinu *et al.*, 2011).

En la superficie del fruto los microorganismos epifitos pueden encontrarse en microcolonias o biopelículas, donde patógenos como *Salmonella* spp. pueden sobrevivir, (Carpio, 2022). La supervivencia y el crecimiento de microorganismos como *Salmonella* en plantas también depende de factores incluidas las características específicas del microorganismo, la madurez de la fruta, las condiciones ambientales, también las plantas más jóvenes son más susceptibles a la internalización de patógenos en comparación con las más viejas, además de los procesos de cosecha y poscosecha (Xylia *et al.*, 2022)

2.3.2 Adhesión y formación de biopelículas de *Salmonella* spp. durante la producción y almacenamiento de productos hortofrutícolas.

Las bacterias como *Salmonella* spp. poseen características hidrofóbicas y pueden adherirse a la cutícula de la planta que está compuesta por ácidos grasos, polisacáridos y ceras (Di Ciccio *et al.*, 2015). La planta ofrece un ambiente que puede ser adverso a los microorganismos con condiciones aeróbicas, temperatura y pH más bajo en comparación con la óptima, un alto nivel de energía UV (ultravioleta) y superficies aéreas (filósfera), que son pobres en nutrientes (Brandl, 2006); sin embargo las bacterias patógenas pueden permanecer en este entorno con baja actividad metabólica y son capaces de sobrevivir a cambios drásticos de temperatura, además autores mencionan que las condiciones de humedad tienen el mayor efecto sobre la supervivencia de *Salmonella* (Jung *et al.*, 2021). Las biopelículas son el principal modo de supervivencia bacteriana y crecimiento en los ambientes naturales (Worthington *et al.*, 2012). La habilidad para formar biopelículas es un factor importante en la supervivencia y persistencia en entornos bajo diversas condiciones estresantes, como desecación, alta acidez, alta salinidad además de agentes antimicrobianos dónde las células bacterianas se encuentran más protegidas (Gu *et al.*, 2020). Por su parte la película fibrosa de celulosa ayuda a la adhesión de la bacteria a las células vegetales e incrementa su resistencia al hipoclorito; la adhesión de microorganismos a superficies de hortalizas o superficies inertes causa que estas células estén sometidas a estrés lo cual puede producir la formación de una biopelícula con la consecuente resistencia al estrés ambiental, así como resistencia a antimicrobianos (Ferreira *et al.*, 2014). Patógenos como *Salmonella* poseen factores de adherencia para la colonización que puede promover la persistencia; estas pueden desarrollar hasta conformar comunidades microbianas en donde las células bacterianas están incrustadas en matrices de polímeros extracelulares en verduras crudas, se ha reportado que la celulosa es uno de los principales componentes de la matriz extracelular de las biopelículas de *Salmonella* (Castelijn *et al.*, 2012). Estrada (2019), menciona que *Salmonella* Enteritidis puede formar biopelículas en frutas como fresas almacenadas tanto a la

temperatura de 20 °C como 7 °C, siendo a 20 °C más rápida tanto la adhesión del microorganismo al fruto como la producción de material polimérico.

Por lo que, las biopelículas son difíciles de eliminar o inactivar de las superficies, haciéndolos un mayor riesgo para la salud pública. Mientras tanto, *Salmonella* contamina las hortalizas durante la cadena de producción y continua viable al llegar al consumidor (Loo, 2017). Loo (2017), realizó un estudio de comportamiento cinético de *Salmonella* en jitomates variedad cherry, observando que *Salmonella* puede aumentar 1 log UFC/ mL a 22 °C en 24 horas y en la cinética de *L. monocytogenes* en la superficie del jitomate, se observó un comportamiento estable sin aumento en la población a 4 °C durante los 7 días de almacenamiento.

S. enterica persiste y prolifera en el medio ambiente, independiente de los huéspedes animales (Doulgeraki *et al.*, 2016). En las industrias alimentarias, las bacterias patógenas como *Salmonella* pueden formar biopelículas y juegan un papel vital en la supervivencia dentro de las instalaciones de procesamiento, lo que provoca el deterioro de los alimentos y pone en peligro la salud de los consumidores (Galie *et al.*, 2018).

2.4. Brotes de enfermedad e incidencias de *Salmonella* en lechuga (*Lactuca sativa* L).

El consumo de productos frescos en 2010 y 2016 fue de 67.2 y 68.7 kg, respectivamente (USDA, 2018). Las verduras de hoja, como la lechuga, la espinaca y las hierbas frescas, son algunas de las verduras más frecuentemente relacionadas con infecciones bacterianas (Cabellos, 2022)

Para el año 2011, el Comité Asesor sobre Seguridad Microbiológica de los Alimentos (ACMSF) informó que, en el Reino Unido, se notificaron 531 casos de enfermedades, incluida una muerte, relacionadas con el consumo de frutas y verduras entre 2008 y 2010 (ACMSF, 2011). El mayor número de casos de enfermedad fueron asociados al consumo de lechuga romana contaminada. Del periodo de 2010 a 2017, ocurrieron 1797 brotes transmitidos por alimentos con un vehículo alimenticio confirmado en los EE. UU, de los cuales el 12.7 % se atribuyeron a productos frescos (CDC, 2017d). En el año 2017 registró un total de

15,481 casos de enfermedad y 649 brotes en E.E.U.U, y los patógenos que fueron mayormente los causantes de esas enfermedades fueron el norovirus y *Salmonella* en frutas y verduras frescas (Olea *et al.*, 2012). También cinco brotes causados por *E. coli* se asociaron con lechuga romana (CDC 2017a; FDA, 2013a). Lechuga contaminada con *L. monocytogenes* causó casos de enfermedad en nueve estados de E.E.U.U. en el 2016 (Self *et al.*, 2016). Para el año 2017, *Salmonella* Saintpaul y *S. Javiana* fueron las etiologías confirmadas con mayor frecuencia en estos brotes (Angelo *et al.*, 2014); sin embargo, los serotipos Newport, Poona y Oslo también estuvieron implicados. Recientemente Zhang *et al.*, (2018) reportó la presencia de *E. coli* O157:H7 en ciertos tipos de vegetales frescos, y aunque la prevalencia fue relativamente baja, este microorganismo puede causar enfermedad grave en los consumidores. También hay informes actuales sobre brotes provocados por el consumo de lechuga, regada con agua contaminada con *E. coli* O157: H7 (CDCd, 2017). López *et al.*, realizaron un estudio en 2014, en muestras de verduras frescas como lechuga, cilantro y pepino obtenidas de mercados públicos de la ciudad de Puebla y Atlixco, dónde se recuperaron *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 en un 2.5 % de estos productos frescos. Las frutas también son el vehículo alimenticio mayoritario implicado en los brotes atribuidos a *S. enterica* (41.1 %) (Chen *et al.*, 2017).

Desiree *et al.*, (2021) investigaron a *Salmonella enterica* y organismos indicadores (*Escherichia coli* y coliformes) en la superficie de verduras frescas donde los niveles de *S. enterica* fueron más altos en la lechuga (5.7 log UFC/g) mostrando prevalencia microbiana en las verduras crudas vendidas en los mercados informales de Camboya.

2.5 *Salmonella* spp.

2.5.1 Características generales

Salmonella enterica es un género de la familia *Enterobacteriaceae*, cuyos miembros se caracterizan por ser bacilos Gram negativo, facultativos y generalmente móviles con flagelos peritricos, no fermenta la lactosa, no produce oxidasa ni ureasa y utiliza

el citrato (Da Silva *et al.*, 2018). *Salmonella* crece a temperaturas entre 8 y 45 °C, aunque su velocidad de desarrollo se ve muy reducida a < 15 °C.

Este patógeno es capaz de desarrollar en valores de pH de 4.0 a 9.5 y actividad de agua tan baja como 0.94 (Chlebicz y Slizewska, 2018). El género *Salmonella* se divide en dos especies, *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, esta última incluye seis subespecies *S. enterica* (I), *S. salamae* (II), *S. arizonae* (IIIa), *S. diarizonae* (IIIb), *S. houtenae* (IV), *S. indica* (VI) (Castillo *et al.*, 2008). Actualmente se conocen más de 2,500 serovares de *Salmonella* en el mundo de acuerdo a sus antígenos somáticos (O) y flagelares (H). La mayoría de los serovares que se conocen pertenecen a *S. enterica* subsp. *enterica* (subsp. I), las cepas de estos serovares son responsables de la mayoría de las infecciones en humanos y animales de sangre caliente (Le Minor y Popoff, 1997). *Salmonella* spp. tiene una mezcla de factores de virulencia que la hacen un enteropatógeno muy complejo, cuando se encuentra fuera del humano sufre condiciones de estrés como la falta de nutrientes, estrés osmótico, variaciones en temperatura y pH; y es cuando se ha observado que desarrolla el estado viable pero no cultivable. Cuando encuentra las condiciones óptimas deja este estado y empieza a desarrollar (Pérez *et al.*, 2014).

2.5.2 Salmonelosis

En humanos, la salmonelosis incluye varios síndromes como la fiebre *enterica*, gastroenteritis, septicemia, infecciones locales y, en el caso de algunos serotipos se ha descrito un estado de portador asintomático. *Salmonella enterica* causa diferentes infecciones intestinales conocidas, estas se dividen específicamente en dos síndromes: La fiebre enterica, que incluye la fiebre tifoidea y la fiebre paratifoidea causadas por *S. Typhi* y por *S. Paratyphi*, tienen sintomatología similar entre ellas, aunque con menor intensidad para el caso de la fiebre paratifoidea. *Salmonella Typhi* causa la fiebre tifoidea en humanos que son los únicos hospedantes, esta enfermedad prevalece en países en vías de desarrollo, hay aproximadamente 17 millones de casos, 23 anuales con casi 600,000 muertes en Asia y África (Gundogdu *et al.*, 2017). Por otro lado, la gastroenteritis que es el

síndrome más común causado por una diversidad de serotipos, presenta un periodo de incubación entre 12 a 36 horas y duración entre uno a cuatro días.

La concentración de 10^5 a 10^8 células de *Salmonella* viables en el alimento tiene la capacidad de colonizar el intestino, donde el periodo de incubación es de 8 a 48 h después de la ingesta (Gal-Mor *et al.*, 2014). Aunque se han reportado brotes de salmonelosis en los que se estima que las personas ingirieron 10-100 células y presentaron la enfermedad (Carpio, 2022). La presencia de *Salmonella* en alimentos para consumo humano y animal se considera un riesgo para la salud pública (Agbaje *et al.*, 2011). Se sabe que la materia fecal de animales puede albergar *S. enterica*, la intrusión de estos animales a las unidades de producción puede conducir a la contaminación del agua y los cultivos (Wiedemann *et al.*, 2014).

2.6 *Salmonella* en México

2.6.1. Presencia de *Salmonella* en México

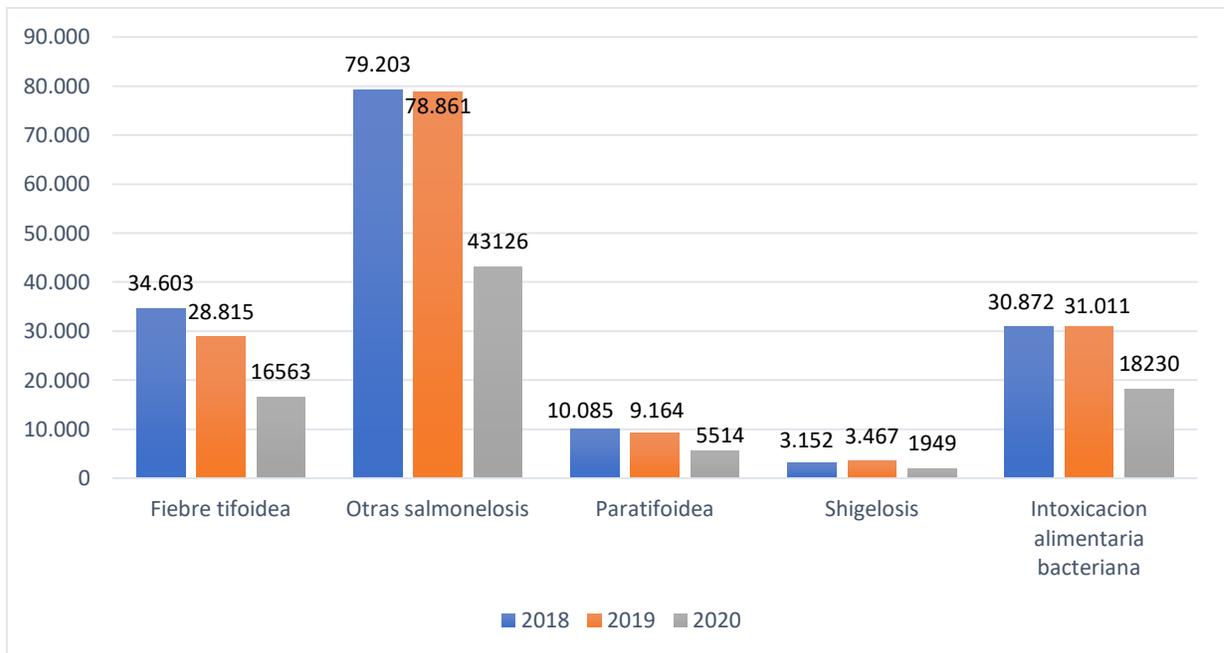
En México, la incidencia de 142 enfermedades sujetas a vigilancia epidemiológica son registradas semanalmente en el Boletín Epidemiológico, para el año 2021 se registró un total de 5, 378,162, de enfermedades ocasionados por bacterias, parásitos, virus y mico toxinas en México; De los cuales la categoría de “Infecciones Intestinales por Otros Organismos y las mal definidas” fue la que presentó mayor número de enfermedades con 2, 771, 141 seguido de “enfermedades infecciosas intestinales” con 2, 521, 996, de enfermedades en ese año (SINAVE, 2021).

Existen diversas investigaciones que revelan la presencia de *Salmonella* en diferentes ambientes, este microorganismo ha sido aislado de ríos, cultivos hidropónicos, animales silvestres en cautiverio (Silva-Hidalgo *et al.*, 2017), en vegetales crudos para consumo humano (Gómez-Aldapa *et al.*, 2013) y también en animales para obtención de alimentos y productos cárnicos procesados en México. Se considera que la mayoría de las infecciones causadas por *S. enterica* están asociadas al consumo de alimentos de origen vegetal, registrando un mayor número de casos (Boletín epidemiológico, 2020).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) confirmó que *S. enterica* (NTS) no tifoidea y *S. Typhi* son los principales patógenos transmitidos por los alimentos en el mundo que causan un gran número de enfermedades (OMS, 2015). Se ha evidenciado la presencia de *Salmonella* spp. en los alimentos, en mariscos recolectados en zonas de pesca de los Estados de Veracruz y Campeche, como pulpo y almejas crudas. *S. enterica* se encontró en 11.7 % y 11.0 % de las muestras analizadas, respectivamente (Estrella-Gómez *et al.*, 2016).

En el caso de los productos cárnicos, los cinco serotipos de *S. enterica* más frecuentemente aislados de carne cruda vacuno son los serotipos Typhimurium (19 %) y Anatum (16 %); mientras que los serotipos Gallinarum (16 %) Anatum (15 %) y Typhimurium (16 %) fueron encontrados con frecuencia en pollo (Joeger *et al.*, 2009); *Salmonella* Anatum (16 %) y *S. Typhimurium* (17 %) se identificaron en muestras de cerdo respectivamente. También en productos cárnicos elaborados, la prevalencia de *S. enterica* en chorizo (salchicha de carne rellena tradicional mexicana) fue de 36 % y longaniza (salchicha curada tradicional mexicana) de 48 % respectivamente, en el estado de Jalisco (Torres *et al.*, 2011). De igual importancia en el caso de los lácteos, estudios realizados en los estados de Jalisco e Hidalgo mostraron la presencia más frecuente de *Salmonella* Amsterdam (22.5 %) y *Salmonella* Anatum (16.9 %) en queso fresco (1.1–34 %) (Torres *et al.*, 2011).

En 2017, el número de casos notificados de salmonelosis no tifoidea (92,013) fue mayor que los casos reportados a causa de *Salmonella* Typhi (45,280) y *Salmonella* Paratyphi a (12, 458) (Godínez *et al.*, 2020). Sin embargo, recientemente en el 2018 la salmonelosis registra el mayor número de casos notificados (79,903) comparado con otras enfermedades infecciosas (Figura 2.)



(SINAVE, 2020)

Figura 2. Casos de salmonelosis y otras enfermedades relacionadas en México.

El brote más grande considerando número de estados afectados y número de casos, asociado a alimentos producidos en nuestro país fue el ocurrido en Estados Unidos en 2015 y se relacionó con pepinos contaminados con *S. enterica* Poona (CDC, 2016b). Con respecto a los casos clínicos registrados en los centros de salud del país se ha encontrado que los serovares más frecuentes son: Typhimurium, Enteritidis, Derby, Agona y Anatum (Gutiérrez-Cogco *et al.*, 2000). En un estudio realizado en el estado de Yucatán, *S. enterica* se detectó en el 18.7 % de las muestras de heces de personas que tenían los síntomas; los serotipos *S. Typhimurium* (21.8 %), *S. Agona* (21 %) y *S. Anatum* (5.8 %) fueron los más encontrados (Zaidi *et al.*, 2013).

Aunque de manera limitada, se han descrito algunos serovares implicados en algunos brotes, como un brote que surgió en una prisión de México en el año 2010 y donde se encontró que el agente causal fue *S. Oranienburg* (Vázquez-Garcidueñas *et al.*, 2014).

2.7 Control y agentes antimicrobianos

2.7.1 Desinfección de productos hortofrutícolas

La contaminación por patógenos en los productos hortícolas puede ocurrir en la producción en campo a diversas fuentes de contaminación y, también durante poscosecha (Liu *et al.*, 2005). De acuerdo con la Ley de Modernización de la Seguridad Alimentaria (FMSA) para los productos frescos, los manipuladores de alimentos deben recibir educación sobre el uso apropiado de agentes desinfectantes y sobre los principios de higiene y seguridad alimentaria para reducir los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos asociados al consumo de verduras crudas. Se están evaluando activamente otros desinfectantes alternativos, incluidos el ozono, el ácido peroxiacético y el dióxido de cloro, para determinar su eficacia contra microorganismos patógenos y deterioradores.

El ácido peracético (80 ppm), el cloro (100 y 200 ppm), el dióxido de cloro (3 y 5 ppm) y el ozono (3 ppm) reducen las poblaciones > 4 log de *E. coli* O157:H7 inoculado en manzanas, lechugas, fresas y melón (Qi *et al.*, 2018). Liao *et al.*, (2000) observaron una reducción limitada de *Salmonella* Chester (1-2 Log/UFC) en discos de manzana tratados con peróxido de hidrógeno, hipoclorito de calcio e hipoclorito de sodio. Rodgers *et al.*, (2014) solo detectaron el uso de peracético de 80 ppm ácido en lechuga picada y 200 ppm de hipoclorito de sodio en manzanas enteras.

Hoy en día, debido a su bajo costo y gran disponibilidad, el desinfectante más comúnmente utilizado es el hipoclorito (100 a 200 ppm), la solución de clorado es el desinfectante de uso más convencional aplicado para verduras mínimamente procesadas (Nou *et al.*, 2011), con eficacia de 5 Log UFC/ mL de reducción (Patrignani *et al.*, 2015). Sin embargo, los microorganismos patógenos que se encuentran adheridos formando biopelículas son difíciles de disminuir mediante desinfección (Dougnaç *et al.*, 2015); Según Moraes *et al.* (2018), debido a que *Salmonella* realiza proceso de formación de biopelículas muestra disminución en efectividad de estos desinfectantes.

2.7.2 Aceites esenciales como antimicrobianos en alimentos

Los aceites esenciales son mezclas homogéneas de compuestos químicos orgánicos, provenientes de una misma familia química, terpenoides. Obtenidas de diferentes órganos vegetales (flores, capullos, semillas, hojas, ramitas, etc.), con propiedades antimicrobianas y antifúngicas (Amor *et al.*, 2021). Tienen la propiedad en común, de generar diversos aromas agradables y perceptibles al ser humano (Muñoz, 2002; Peter, 2004).

Actualmente se han utilizado aceites esenciales que poseen propiedades antimicrobianas y antioxidantes en sistemas alimentarios (Calo *et al.*, 2015; Amor *et al.*, 2021). *Cinnamomum zeylanicum* EO (CEO) es efectivo, según su concentración mínima inhibitoria (MIC 1.25–1.87 $\mu\text{L}/\text{mL}$) sobre microorganismos como *Salmonella* y hongos como *Aspergillus parasiticu*. Cinco $\mu\text{L}/\text{mL}$ CEO, aplicado en lechuga, inmediatamente reducen las células depositadas y fuertemente adheridas (reducción de 0.78 Log y 0.63 Log/UFC/cm², respectivamente), con efecto significativo hasta las 120 h. CEO también inhibe la actividad de polifenol oxidasa, por lo tanto, preservando el color de la lechuga durante su almacenamiento (Rossi *et al.*, 2019).

Nychas y Skandamis (2000), inocularon en ensalada de berenejena con la bacteria *E. coli* O157:H7, ésta se almacenó durante cuatro días a diferentes temperaturas (0, 5, 10 y 15 °C) y se añadió AE de orégano en diferentes concentraciones; después de tres días de almacenamiento el AE de orégano (en concentraciones de 7-21 $\mu\text{L}/\text{g}$) sí tuvo efecto antibacteriano contra *E. coli* O157:H7.

De igual forma se ha probado el gel de la sábila (*Aloe vera*) y quitosano, en frutas con almacenamiento como pimiento morrón, papaya maradol y rodajas de kiwi contra hongos y bacterias demostrando que las frutas recubiertas con el gel de *Aloe vera* muestran la población más baja de entre 90 y 3.15 UFC/ g (Benítez *et al.*, 2015; Castillo, 2015; Manoj *et al.*, 2016).

2.8 Aceite esencial de naranja (*Citrus Aurantium Amara*) como agente antimicrobiano

Los cítricos son los frutos de hoja persistente más importantes en regiones tropicales y subtropicales del mundo y se cultivan en más de cien países (Zhang, 2014). En 2020 México fue incluido entre los principales exportadores de aceite esencial de naranja (*Citrus Aurantium Amara*), perteneciente a la familia de los cítricos. El interés en la industria alimentaria es debido a que los análisis fitoquímicos del aceite esencial de naranja (*Citrus Aurantium Amara*) han demostrado la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos (Abu-seif *et al.*, 2009). Núñez *et al.*, (2022) identificaron hasta 95% de compuestos etanólicos y la mayor concentración de flavonoides en hojas de la especie *Citrus aurantium L.*, además de otros metabolitos como alcaloides, triterpenos (Youcef-Ettoumi *et al.*, 2020). Estos compuestos pueden contribuir a su actividad antimicrobiana, ya que puede dañar directamente la pared celular y causar una disminución del potencial de membrana que podría conducir a fuga de iones de calcio, así como otros componentes (Maqbool *et al.*, 2011). Kim *et al.*, (1995) estudiaron la actividad antibacteriana de 11 componentes de aceites esenciales contra *Escherichia coli*, *E. coli* 0157: H7, *S. Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y *Vibrio vulnificus*. Informando que los componentes de los aceites esenciales de cítricos, como limoneno, linalool, citronelal, geraniol y perilaldehído, tienen fuerte actividad contra *S. Typhimurium*, y su mutante resistente a la rifampicina *in vitro*. Resultados obtenidos del método de difusión en disco seguido de mediciones de MIC confirmó que las cepas de *S. aureus* fueron las bacterias más sensibles con la zona de inhibición más alta y la CIM más baja y valores de MBC (0.25 % y 0. 5% v / v).

El aceite esencial ejerce dosis de actividad dependiente con efectos más pronunciados contra *S. aureus* (5.8 a 7.9 mm) que en *E. coli* (1.7 a 3.1 mm). Para Cepas de *L. monocytogenes*, la actividad inhibidora fue más pronunciado a la concentración de 0.5 %. El citral y el perilaldehído tenían MBC de 100 y 250 pg/ mL contra *V. vulnificus*. El citral, el geraniol y el perilaldehído a 500 pg/mL redujeron completamente a *E. coli*, *E. coli* 0157: H7, y *S. Typhimurium*, mientras que el

citronelal a 250 pg/ mL inactivó a *V. vulnificus*. Chaieb *et al.*, (2018) investigaron la composición química del aceite esencial de naranja amarga aislado de áreas de *C. aurantium*, donde, identificaron veinti nueve compuestos químicos donde el Limoneno (67,1 %), Linalool (8,37 %), β -pineno (4,02 %), mirceno (3,17 %), β -ocimeno (2,36 %) y α -pineno (1,18 %) fueron los principales compuestos. Zhong *et al.*, (2022) mencionan que la alta presencia de limoneno en aceites esenciales como Citrus unshiu Mar participando como el agente mayoritario con actividad frente a diversas cepas como *Aeromonas hydrophila* además de otros patógenos como, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella entérica* destruyendo la integridad de la membrana celular, e influir en su potencial celular. Juarez *et al.*, (2010) determinaron la composición química de aceite esencial de naranja dulce (*Citrus sinensis* L), por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masa (CG/ EM), destacándose en el cromatograma la identificación de Limoneno, β -linalol, decanal y 2 (10)-pineno (1S,5S)-(-)-.

También evaluaron la actividad antibacteriana del aceite esencial *in vitro* contra cepas de microorganismos Gram (+), como *Staphylococcus aureus* ATCC 25933 y *Staphylococcus epidermidis*, demostrando actividad antibacteriana significativa a concentraciones de 100 y 50%, respectivamente; no así con los microorganismos Gram (-): *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

III. JUSTIFICACIÓN

La resistencia bacteriana comprende diferentes eventos evolutivos y de adaptación que puede disminuir la eficiencia de la desinfección química en alimentos. Diversos estudios han buscado desarrollar estrategias alternativas a los desinfectantes convencionales que se aplican a vegetales de consumo crudo. La lechuga es un alimento de amplio consumo en México y este alimento se ha asociado a diversos brotes de enfermedad en distintos países; el principal patógeno asociado a estos brotes ha sido *Salmonella*.

Los aceites esenciales se reconocen por su efecto antimicrobiano, pero por sus propias características pueden perderse por volatilización y la encapsulación podría evitarlo. Sin embargo, es limitada la evaluación de estos agentes antimicrobianos en alimentos, por ello es importante otro panorama del uso de estos aceites esenciales debido a su composición química que está fundamentado que contribuye a disminuir el crecimiento de patógenos en medios de cultivo. La aplicación de aceites esenciales en los alimentos para prevenir el crecimiento y sobrevivencia de agentes patógenos como *Salmonella* puede ser una estrategia que impacte en la disminución de las enfermedades que se transmiten por los alimentos a nivel mundial.

IV. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Evaluar la sobrevivencia de *Salmonella enterica* en lechuga (*Lactuca sativa* L) durante el almacenamiento y en presencia de aceite esencial de naranja encapsulado (*Citrus Aurantium Amara*).

4.2 ESPECÍFICOS

- 4.2.1 Evaluar la capacidad de cepas de *Salmonella* para desarrollar en extracto de lechuga.
- 4.2.2 Caracterizar cepas de *Salmonella* spp. en su capacidad para formar biopelículas en esferas de acero inoxidable y presencia de extracto de lechuga y su susceptibilidad al aceite esencial de naranja amarga.
- 4.2.3 Evaluar la sobrevivencia y desarrollo de *Salmonella* spp. adherida sobre lechuga (*Lactuca sativa* L) almacenada a 10 y 30 °C en presencia de aceite esencial de naranja amarga encapsulado.

V. METODOLOGÍA

5.1 Materiales

5.1.1 Lechuga

Hortalizas de lechuga (*Lactuca sativa* L), adquiridas de un mercado local del estado de Querétaro.

5.1.2 Aceite esencial de naranja amarga.

El aceite esencial de naranja amarga (AEN) fue comprado en la empresa BIOEXTRACTO de Jurica Querétaro. El AEN fue obtenido por hidrodestilación de la cáscara de la fruta conocida como naranja agria/amarga (*Citrus aurantium* Amara). Es soluble en aceites, parcialmente soluble en alcoholes e insoluble en agua. Su aspecto es líquido, transparente, incoloro, aroma amargo y sabor cítrico y amargo. El AEN fue caracterizado mediante

5.1.3. Cepas de *Salmonella*.

Se emplearon 20 cepas (Cuadro 2) de *Salmonella entérica* donadas por el Laboratorio de Salud del Estado de Michoacán que fueron utilizadas en el experimento. Las cepas fueron almacenadas a -20°C con caldo soya tripticasa (CST) y glicerol hasta su uso.

Cuadro 2. Cepas de *Salmonella entérica*

1.- <i>S. Saintpaul.</i>	11.- <i>S. Bareilly.</i>
2.- <i>S. Give.</i>	12.- <i>S. Tennessee.</i>
3.- <i>S. Virchow.</i>	13.- <i>S. Derby.</i>
4.- <i>S. Typhimurium.</i>	14.- <i>S. Cannstatt.</i>
5.- <i>S. Hadar.</i>	15.- <i>S. Agona.</i>
6.- <i>S. Oranienborg.</i>	16.- <i>S. Bovismorbificans</i>
7.- <i>S. Rissen.</i>	17.- <i>S. Enteritidis.</i>
8.- <i>S. Oslo.</i>	18.- <i>S. Anatum</i>
9.- <i>Salmonella</i> spp.	19.- <i>S. Enteritidis.</i>
10.- <i>S. Muenchen.</i>	20.- <i>S. Muenchen.</i>

5.1.4 Perlas de acero inoxidable

Se utilizaron unidades de 4 mm/0.2in de perlas de acero inoxidable reutilizables (Navaris).

5.1.5 Equipos principales

- XH-D Vortéx Mixer Eurotech
- Centrífuga METRIX® Velocity 14
- Homogeneizador Stomacher®
- Incubadora INCUBATOR® 815
- Microscopio óptico B-159 1000X óptima.
- Campana de flujo laminar Biobase
- Autoclave Wisconsin
- Lector de microplacas Varioskan Lux Reader

5.2 Métodos

5.2.2 Procedimientos generales

5.2.2.1 Preparación del inóculo

Se reactivaron las cepas transfiriendo 10 µL de la suspensión conservado a -20 °C, a un tubo con 1mL de (CST), y se incubaron a 30 °C/ 24h. Se realizaron dos subcultivos sucesivos en el mismo medio y condiciones de incubación, sólo que en el último el tiempo de incubación fue de 18 h. Se cosecharon las células mediante centrifugación (4500 x g, 15 min) y se lavaron dos veces con 900 µL solución salina isotónica (NaCl 0.85 %). Posteriormente se realizaron diluciones para llegar a suspensión requerida de cada cepa de *Salmonella* activada y lavada (10⁴ UFC/ mL) que sería utilizada para los experimentos.

5.2.2.2 Preparación del extracto de lechuga (*Lactuca sativa* L)

Se preparó una solución al 5 % p / v de lechuga en agua destilada estéril. La mezcla de lechuga-DP, fue homogenizada durante dos minutos a alta velocidad en un homogenizador (Stomacher) y esterilizada a 121 °C por 15 min. A partir de la suspensión estéril se prepararon diluciones para tener concentraciones de 0.5 1 y 3 %). Las suspensiones se emplearon como fuentes de nutrientes para *Salmonella* en los procesos de adhesión y formación de biopelículas (5.2.5.1). El extracto al 3 % fue enviado al Laboratorio Especializado en Análisis de Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro de la Facultad Química para la realización de un análisis bromatológico de humedad (AOAC 925.09B), proteína (AOAC 954.01), cenizas (AOAC 923.03) y finalmente análisis de azúcares (NOM-086-SSA1-1994) reductores totales (apéndice normativo C inciso 2). La muestra se analizó por triplicado y el cálculo de los resultados se hizo en base húmeda.

5.2.3 Condiciones de temperatura de los principales estados productores de lechuga en México.

Se llevó a cabo recopilación de datos de temperatura en los últimos 5 años, del 2018-2022 y de los principales meses de producción de la lechuga (Junio- Agosto) en los estados que muestran mayor producción de lechuga de en el país según el Atlas agroalimentario 2022 (Aguascalientes, Baja California, Guanajuato, México, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tlaxcala y Zacatecas) (Atlas agroalimentario, 2022).

Se recolectaron los datos mediante un promedio de la temperatura mínima, media y máxima para identificar los niveles de temperatura a los que se expone la lechuga.

5.2.4 Caracterización de aceite esencial de naranja amarga.

Se realizó la caracterización del aceite esencial de naranja amarga (AEN) en cuanto a sus propiedades físicas como densidad relativa (Norma NTP-ISO 279:2011 picnómetro), misibilidad (Wang *et al.*, 2011) e índice de refracción (Binsi *et al.*, 2013). La caracterización química del AEN se realizó mediante cromatografía de

gases acoplada a masas donde al AEN se diluyó a 1:100 en n-hexano y luego fue inyectado (1 μ L, relación de división: 1:50) en un sistema GC-MS (cromatógrafo de gases Agilent 6898N equipado con un espectrómetro de masas de 5973 N).

La fase estacionaria fue compuesta por una columna capilar HP-5MS (5 % de fenilmetilpolisiloxano, 30 m de longitud \times 0.25 mm de d.i., 0.1 μ m de espesor de película, Agilent, Folsom, CA), mientras que la fase móvil será helio (99.999 %) a 1 mL/ min. La temperatura del horno programada fue de 60 $^{\circ}$ C a 220 $^{\circ}$ C a 4 $^{\circ}$ C/ min, luego se elevó a 280 $^{\circ}$ C a 11 $^{\circ}$ C/ min. Los espectros de masas se obtuvieron en modo de impacto de electrones (EI, 70 eV) en el rango de 29 a 400 m/ z. El análisis cualitativo y cuantitativo se realizó utilizando el MSD Software ChemStation (Agilent, versión G1701DA D.01.00) (Maggi *et al.*, 2010). Como estándares se utilizó una mezcla de los principales componentes reportados para el AEN y para calcular la retención lineal en datos (RI). Los componentes fueron identificados mediante la comparación de tiempos de retención (RT), RI y espectros de masas (MS) de picos con los obtenidos con los estándares. Los porcentajes relativos del área de los picos se obtuvieron mediante normalización del área de pico sin aplicar factores de corrección.

5.2.5. Evaluación de la capacidad de desarrollo y formación de biopelículas de *Salmonella* con extracto de lechuga (*Lactuca sativa* L).

En placas de 100 pocillos con 240 μ L de extracto de lechuga al 0.5, 1 y 3 % (sección 5.2.2.2) de manera individual se inocularon 10 μ L de la suspensión de cada cepa de *Salmonella* activada y lavada (10^4 UFC/ mL) y se almacenaron a 35 $^{\circ}$ C/ 48 h. De manera periódica se realizaron mediciones de DO a 600nm en el espectrofotómetro y se llevó a cabo el recuento de células viables por el método de Miles y Misra en agar soya tripticasa (AST).

Una vez finalizado el almacenamiento los pocillos se lavaron tres veces con 300 μ l de agua destilada estéril y se llevó a cabo la técnica de cristal violeta donde las bacterias adheridas se fijaron con 250 μ L de metanol durante 15 min, posteriormente se vació el metanol y la cada pocillo se tiñó con 250 μ l de cristal violeta durante 5 min para luego ser enjuagadas con 250 μ l de agua destilada dos

veces. Finalmente, el colorante se resolubilizó con 250 µl de 33 % (v / v) ácido acético por pocillo y se procedió a determinar la DO a 570 nm.

5.2.5.1 Evaluación de la capacidad de desarrollo y formación de biopelículas de *Salmonella* en esferas de acero inoxidable con extracto de lechuga (*Lactuca sativa* L).

Se empleó como fuente de extracto de lechuga al 3 % para evaluar la formación de biopelículas en esferas de acero inoxidable. En tubos eppendorf con tres perlas de acero inoxidable se agregaron 20 µl de *Salmonella* (4 Log UFC/ ml) y 500 µl de extracto de lechuga y se almacenaron a 35 °C/ 3h.

Para obtener el porcentaje de adhesión de cada cepa, se tomaron tres unidades experimentales a las tres horas de almacenamiento y se realizaron dos lavados con 500 µl de solución salina. Las esferas lavadas se colocaron en solución salina y se homogenizaron en vortex por un minuto, se realizaron diluciones con solución salina y alícuotas de 100 µl se sembraron en AST por extensión en superficie; las placas, fueron incubadas a 35°. Esferas con células adheridas fueron colocadas en tubos eppendorf con 500 µl de extracto de lechuga (3 %) y fueron almacenadas a 35 °C/ 48h; a las 0, 3, 24 y 48 hr se cuantificaron las células adheridas como ya se describió. A partir de los datos obtenidos se estimó el porcentaje de adhesión a las 3 h de contacto con esferas de acero inoxidable:

Porcentaje de adhesión= [(células que lograron permanecer adheridas tras los lavados con SSF/ Total de células inoculadas en la suspensión) *100].

El incremento de la población de *Salmonella* mediante una resta del tiempo 0 con la población a las 24 y 48 h de almacenamiento.

Para dar seguimiento a la capacidad de formación de biopolímeros se realizó la técnica de cristal violeta a las 24 y 48 h de almacenamiento, dónde se tomaron tres unidades experimentales de cada cepa de *Salmonella*, posteriormente se vertió el contenido en los tubos eppendorf (20 µl de *Salmonella* y 500 µl de extracto de lechuga 3 %) dejando sólo las tres perlas de acero inoxidable dónde las bacterias adheridas se fijaron con 250 µL de metanol durante 15 min para posteriormente

vaciar el metanol. Las perlas de acero inoxidable se tiñeron con 250 µl por pocillo de cristal violeta durante 5 min para luego ser enjugadas con agua destilada estéril. Finalmente, el cristal violeta se solubilizó con 250 µl de ácido acético glacial 33 % (v/v) por pocillo y se procedió a realizar la medición a 580 nm.

Es así donde al término del almacenamiento se seleccionaron las cepas que presentaron mayor capacidad de adhesión, de desarrollo (incremento 48 h) y formación de polímeros para ser utilizadas para evaluar sobre lechuga.

5.2.6 Evaluación de la capacidad de cepas de *Salmonella* para adherirse y formar biopelículas en lechuga (*Lactuca sativa* L).

Se utilizaron porciones cuadradas de 1 cm² de lechuga que se inocularon con 5 gotas de 10 µL cada una de una suspensión de 4 Log UFC/ mL de una mezcla de cepas activadas de *Salmonella*. Se dejaron secar a 25 °C/ 3 h, se lavaron en tres ocasiones con 2mL de solución salina (SSF) y se estimó la proporción adherida mediante:

Porcentaje de adhesión= [(células que lograron permanecer adheridas tras los tres lavados con SSF/ Total de células inoculadas en la suspensión) *100].

Las porciones de lechuga con células adheridas de *Salmonella* se colocaron en cajas Petri y se adicionaron 50 µL de extracto de lechuga 3% extendiéndolo en toda la superficie de lechuga dejándola secar por 15min aprox. Las cajas Petri con las porciones de lechuga se colocaron en recipientes herméticamente cerrados con la temperatura de 25 °C y HR previamente estabilizada mediante una solución saturada de sal de Sulfato de Potasio (K₂SO₄ 97 %) para obtener HR del ambiente de las lechugas a 95 % (Figura 3) .

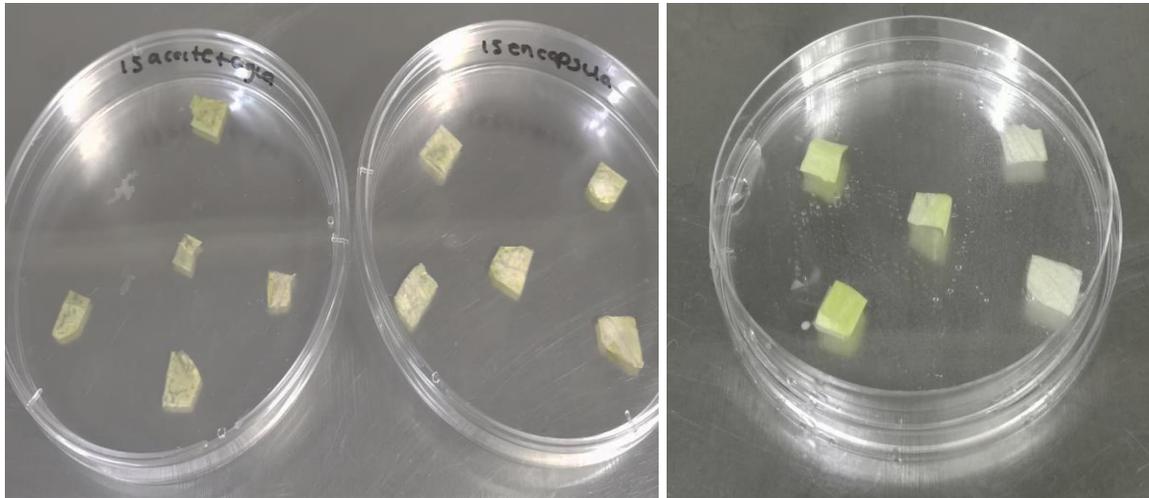


Figura 3. Representación de porciones de lechuga inoculadas con *Salmonella*

La cuantificación de células se realizó a las 3, 24 y 48 h realizando los lavados con 2 ml de solución salina, posteriormente se realizaron diluciones y se sembraron 100 μL en AST por extensión en superficie para la cuantificación de células al inicio y término del almacenamiento. Periódicamente se tomaron tres unidades experimentales para cuantificar las biopelículas con la técnica de cristal violeta a los 3, 24 y 48 h. Los resultados de esta sección experimental permitieron seleccionar las cepas que fueron utilizadas en la evaluación final ante el encapsulado del aceite esencial de naranja.

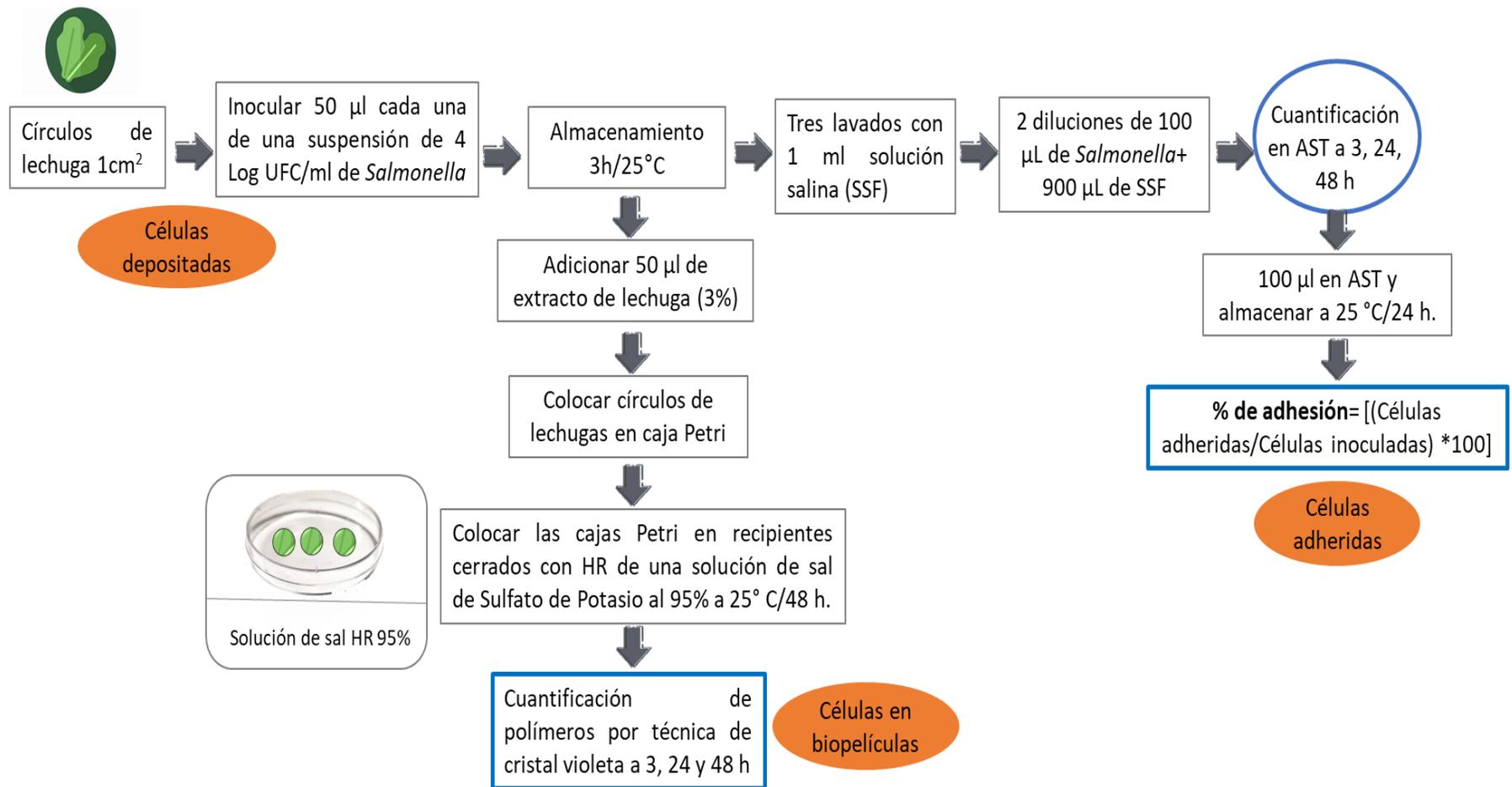


Figura 4. Representación de la evaluación de la capacidad de cepas de *Salmonella* para adherirse y formar biopelículas en lechuga (*Lactuca sativa* L).

5.2.6.1 Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de naranja (AEN) sobre cepas de *Salmonella entérica*.

Se evaluó el efecto antimicrobiano del AEN de forma directa contra cepas de *Salmonella* mediante la técnica de Kyrbi- Bauer, donde se utilizó una suspensión de cada cepa de *Salmonella* activada y lavada (10^4 UFC/ ml) y se inoculó en placas con AST, con hisopo en toda la superficie de la placa y se dejó secar durante unos 5 min en campana con flujo de aire. Se colocaron círculos de discos de papel filtro estériles de 1 cm^2 sobre la caja Petri, se realizaron dos diluciones de AEN+ alcohol (1/10 y 1/100 v/v) y se agregaron 10 μ l de acuerdo al tratamiento sobre los discos de papel filtro. También se agregó de forma directa el AEN y se utilizó un control sólo colocando 10 μ l de alcohol, esto para las 20 cepas de *Salmonella*. Finalmente las placas con discos inoculados con *Salmonella* fueron almacenados a 35 °C/ 24 h. al término del almacenamiento los halos de inhibición fueron medidos con un vernier digital.

5.2.7. Efecto del encapsulado de AEN sobre *Salmonella* depositada, adherida y en biopelícula sobre lechuga.

5.2.7.1 Preparación del encapsulado de AEN (*C. aurantifolia*).

La preparación del encapsulado del aceite esencial fue realizada por Soto *et al.*, (2022) usando la técnica de Microprecipitación. De acuerdo al procedimiento de ciclodextrinas por Estequiometria (1:1) se pesaron 1.5 g de b-ciclodextrina y fue disuelto en 25 mL de una solución etanol/agua (1/1) y calentado a 55 °C. Posteriormente se usó el ultraturrax para homogeneizar a 2,000 r.p.m por 10 min hasta observar una solución incolora homogénea. La mezcla se mantuvo en agitación en una parrilla a 55 °C y se adicionó 0.32 g de aceite esencial de naranja con 0.4681 g de etanol en una jeringa gota a gota mientras se mantenía en agitación por 4 hrs. (cambio de color incolora a un sistema blanquecino). Después se bajó la temperatura a 35 °C por 2 horas manteniéndolo en agitación. Al término del tiempo, se dejó enfriar el sistema y se mantuvo en agitación por 12 horas para inducir la precipitación. Finalmente se filtró a vacío para recuperar el sólido precipitado.

5.2.7.2 Efecto del complejo de inclusión b-ciclodextrina de AEN sobre *Salmonella* depositada, adherida y en biopelícula sobre lechuga.

Para evaluar el efecto del complejo de inclusión b-ciclodextrina_aceite esencial de naranja sobre células depositadas, células adheridas y células formando biopelículas de *Salmonella* en la lechuga se utilizaron las porciones de 1 cm² de lechuga que fueron inoculadas con 20 µL de una mezcla de cepas de *Salmonella* resistente a rifampicina, y se incubaron durante 3 h, se realizaron tres lavados con SSF y se aplicaron 50 µL de encapsulado (0.15 gr + 10 mL de agua destilada estéril), AEN (10 mL de agua destilada estéril+ 100 µL de aceite de naranja + 100 µL de Tween 80) o SSF como control. Finalmente, las lechugas fueron almacenadas a 10 °C por 14 días o a 30 °C por 3 días. Para obtener las células viables se realizaron tres lavados con 2 ml de solución salina una vez finalizado el tiempo de almacenamiento correspondiente a cada tratamiento (Cuadro 3). Se llevó a cabo la cuantificación colocando cada porción de lechuga lavada en tubos falcon de 15 ml y se agregó 10ml de diluyente se peptona (0.1 %), se homogenizó en vortex durante 1 min, se realizaron diluciones con diluyente de peptona (0.1 %) y se sembraron 100 µL en agar soya tripticasa (AST) adicionado de rifampicina (10 ppm) por extensión en superficie y se incubaron durante 24 h/ 25°C, para después realizar la cuantificación de células viables durante el almacenamiento.

Cuadro 3. Días de almacenamiento y recuento de células viables en cada nivel de temperatura.

Temperatura	Días de almacenamiento y medición de cuantificación de células viables.				
10°C	0	3	7	10	14
30°C	0	1	2	3	

*Todos los tratamientos fueron a 95% de HR.

5.2.9 - Análisis estadísticos

Las comparaciones de la población de *Salmonella* ante los diferentes tratamientos (nivel de humedad relativa y presencia de AEN) fueron realizadas mediante un análisis de varianza (ANOVA). Se aplicó una prueba Tukey con $\alpha=0.05$, usando el paquete estadístico R (software versión 3.6). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y en dos ocasiones.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Evaluación de la capacidad de desarrollo y formación de biopelículas de *Salmonella* con extracto de lechuga (*Lactuca sativa* L).

6.1.1 Selección del extracto de lechuga como nutriente para el desarrollo de *Salmonella*.

Para la evaluación de la capacidad de desarrollo de *Salmonella* con extracto de lechuga, se obtuvieron los resultados del Promedio de la temperatura mínima, media y máxima para identificar los niveles de temperatura de 10 entidades de mayor producción (Figura 5), donde al término de la evaluación se utilizó el promedio de la temperatura mínima de las entidades y la máxima para utilizar los dos parámetros de almacenamiento de la lechuga.

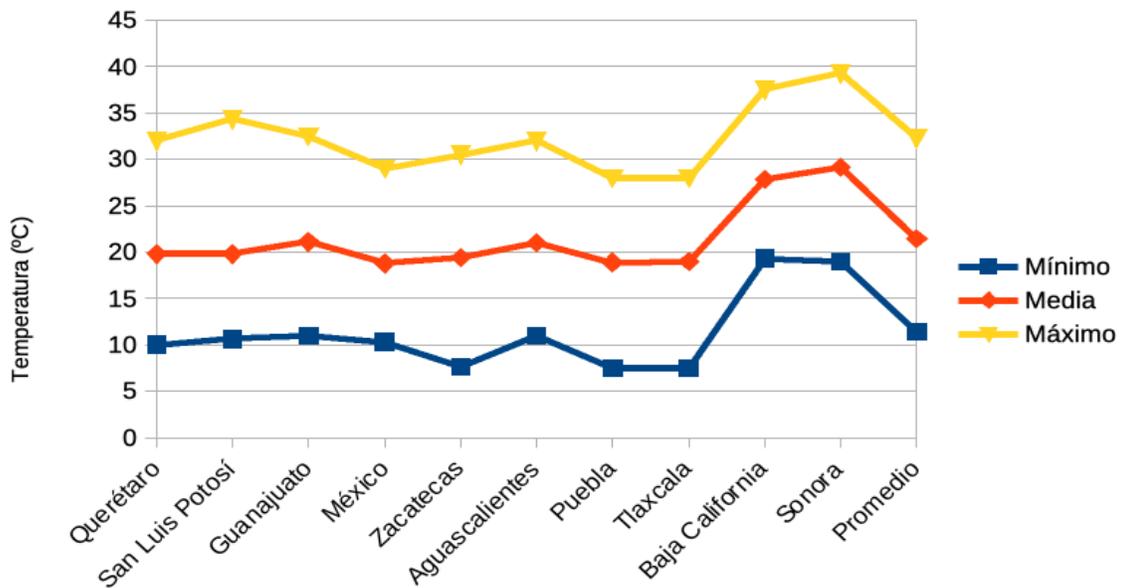


Figura 5. Promedio de la temperatura mínima, media y máxima para identificar los niveles de temperatura de 10 entidades de mayor producción.

Posteriormente se realizó una selección del extracto que serviría como nutriente para el crecimiento de las cepas. Se obtuvieron valores de la cinética de crecimiento de las 20 cepas con extracto de lechuga al 0.5, 1 y 3 % (Figura 5). Todas las cepas mostraron capacidad de desarrollar a lo largo del tiempo de almacenamiento, sin embargo, se observa un mayor crecimiento cuando cepas *Salmonella* se encuentran en contacto con el extracto al 3 %, por lo que se eligió esta concentración para los siguientes experimentos.

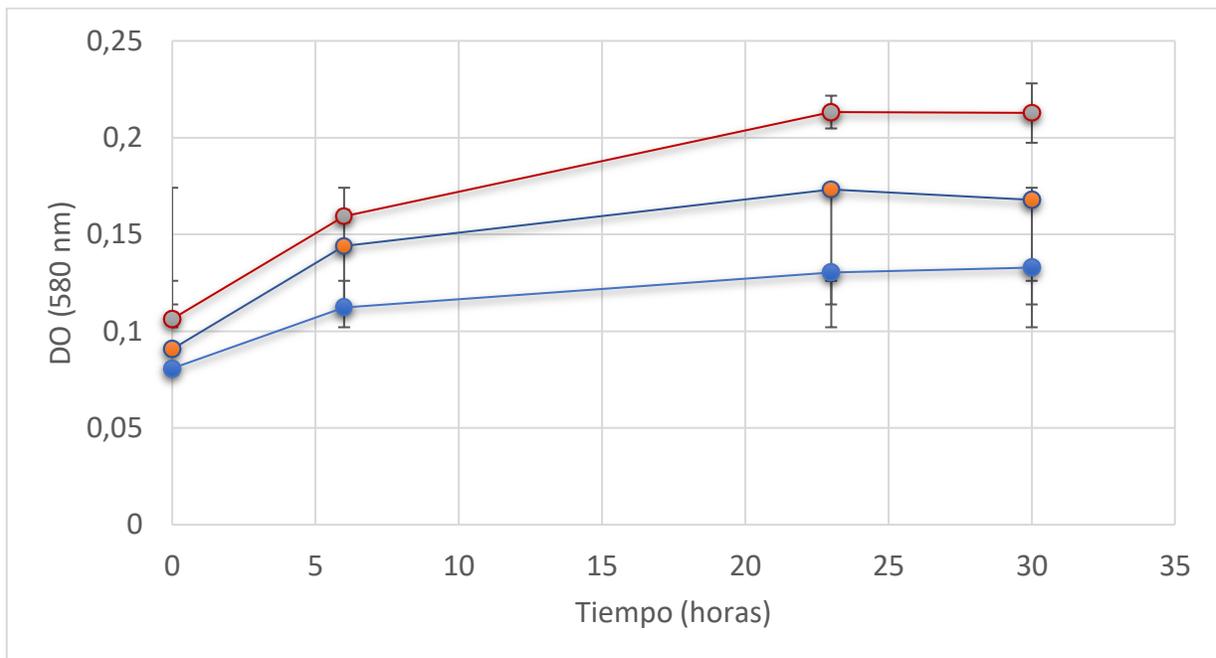


Figura 6. Cinética de crecimiento de *Salmonella* en extracto de lechuga (0.5, 1 y 3 %) a 30 °C/ 30 h.

Cada punto representa la media de tres repeticiones de la DO alcanzada a 580nm y las barras de error representan el error estándar.

El desarrollo de microorganismos patógenos en extractos de plantas, ya ha sido reportado: Cholán *et al.*, (2019) utilizaron extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) y observaron el crecimiento de *Salmonella* Typhi y *Escherichia coli* a 37 °C con 24 h. de almacenamiento.

El daño que pueden sufrir las hojas de lechuga durante las operaciones de cosecha, selección y empaçado, pueden liberar nutrientes del alimento que son suficientes para promover el desarrollo del patógeno evaluado.

Una vez evaluados los porcentajes de los extractos y seleccionado el extracto al 3 %, fue enviado al Laboratorio Especializado en Análisis de Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro para un análisis bromatológico y conocer su composición en cuanto a los principales nutrientes (Cuadro 4).

Ensayo	Método	Resultados (g /100 g producto)
Humedad	A0AC 925.09B	99.86 ± 0.01
Cenizas	A0AC 923.03	0.01 ± 0.00
Proteína total	A0AC 954.01	0.02 ± 0.00
Lípidos	A0AC 920.39	0.00 ± 0.00
Carbohidratos	NOM-051 SCFI/SSA 2010	0.10 ± 0.01
Azúcares reductores	NOM-086-SSA1-1994	0.04 ± 0.01

Cuadro 4. Análisis bromatológicos de la muestra del extracto de lechuga 3 % utilizada para las cinéticas de *Salmonella*.

De acuerdo al recuento de células viables realizada mediante el método de Miles y Misra, se obtuvo un incremento promedio de 2.58 Log UFC/ ml de la población de las 20 cepas individuales de *Salmonella* en extracto de lechuga al 3 % durante 30h de almacenamiento (Cuadro 5).

Cepa	Concentración (Log UFC/ ml)		Incremento
	Inicial	Final	
S1	6.5	9.1	2.4
S2	6.3	9.1	2.8
S3	6.5	9.1	2.5
S4	6.5	9.2	2.7
S5	6.6	9.4	2.8
S7	6.5	9.0	2.5
S9	6.5	9.0	2.5
S10	6.4	8.9	2.5
S12	6.6	9.3	2.7
S14	6.7	9.5	2.8
S15	6.8	9.5	2.7
S17	6.6	9.4	2.7
S18	6.4	8.6	2.6
S22	6.3	8.9	2.6
S23	6.5	9.2	2.6
S24	6	8.6	2.6
S25	6.2	8.3	2.0
S26	6.1	8.6	2.4
S37	6.3	9	2.6
S40	6.3	9.0	2.6
Promedio			2.58

Cuadro 5. Incremento de la población de cepas individuales de *Salmonella* en extracto de lechuga al 3 %.

Este incremento, concuerda con otros estudios realizados en jugos liberados por las hojas de espinaca almacenado durante 20 h a 4 °C, dónde hubo incremento de la población de *Salmonella* por 1.33 Log UFC/ g (Koukkidis *et al.*, 2017).

6.2 Evaluación de la capacidad de desarrollo y formación de biopelículas de *Salmonella* en esferas de acero inoxidable con extracto de lechuga (*Lactuca sativa* L).

En este objetivo se evaluaron las 20 cepas por su capacidad para adherirse a esferas de acero inoxidable, capacidad de desarrollo (incremento a las 48 h) y finalmente su capacidad de formación de biopolímeros, como medidas de la capacidad de las cepas para formar biopelículas en superficies. Como se observa en la Figura 7, todas las cepas mostraron capacidad de desarrollarse en presencia de extracto 3 %; sin embargo, se observa un mayor crecimiento de las cepas de *Salmonella* S5, S1 y S9. Mendoza (2015) evaluó el crecimiento de *Salmonella enterica* y *S. Typhimurium* en acero inoxidable durante 24 h a 37 °C teniendo como fuente de nutrientes dilución 1:10 de muestra cárnica de pechuga de pollo con agua peptonada. Este autor reportó un crecimiento de hasta 5.53 y 5.71 Log UFC/ mL al final de las 24 h. La cantidad de nutrientes en el extracto de lechuga son un tanto limitados y permiten un desarrollo discreto con respecto al incremento que se reporta en la suspensión de carne de pollo, la cual contiene una mayor cantidad de proteína.

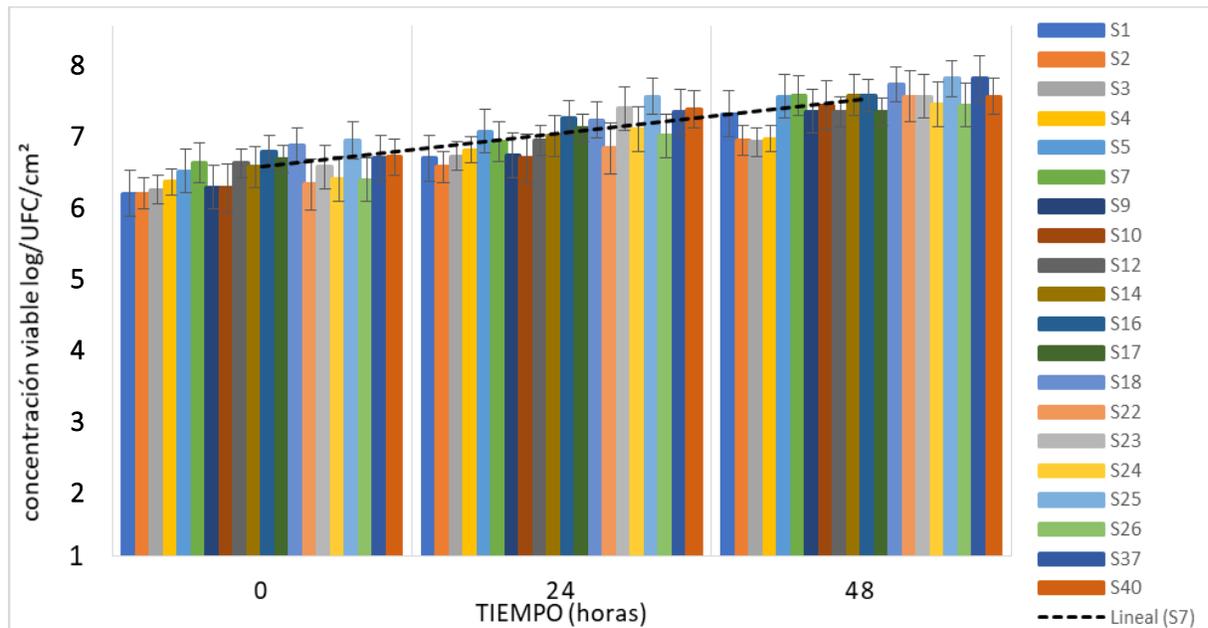


Figura 7. Concentración de *Salmonella* adheridas a esferas de acero inoxidable en contacto con extracto de lechuga al 3% y almacenadas por 24 y 48 h a 35°C.

La capacidad de adherirse y desarrollar en superficies inertes, permite a las bacterias persistir en ambientes de producción de alimentos y posteriormente contaminar los alimentos, en donde pueden tener mayor posibilidad de desarrollo (Carrascosa *et al.*, 2021). Schlisselberg & Yaron, (2013) observaron que *S. Typhimurium* formaba biopelícula después de 18 h de crecimiento en una superficie de acero inoxidable 304, cuando la temperatura era de 37 °C. Sin embargo, requería de un mayor tiempo de crecimiento (24 horas) cuando la temperatura decrecía a 24 ° C, en el acero inoxidable 316. Todas las cepas también mostraron producción de biopolímeros mediante la técnica de cristal violeta, en la cual los valores de absorbancia más altos se registraron en 48 h.

En la Figura 8 se observa las 20 cepas evaluadas en cuanto a su capacidad de formar polímeros (mediante la técnica cristal violeta) y su potencial para desarrollar una vez adheridas al acero inoxidable.

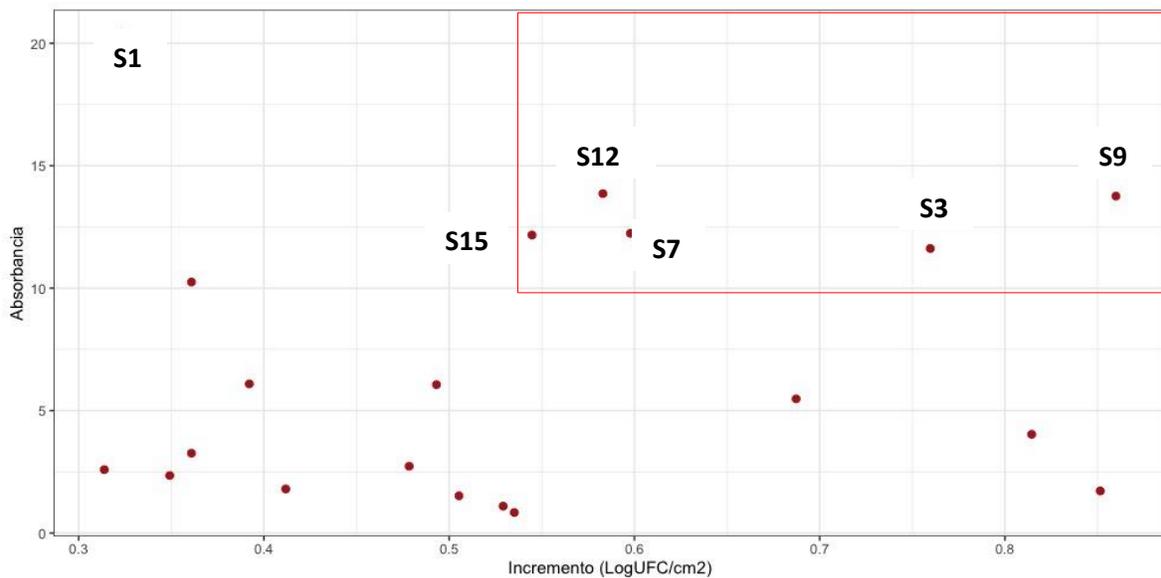


Figura 7. Asociación entre capacidad de formación de biopolímeros y desarrollo de cepas de *Salmonella* (incremento a 48 h).

Estos resultados coinciden con lo reportado con Díez-García, *et al.*, (2012) quienes midieron el crecimiento (Log UFC/ ml) de distintos serovares de *Salmonella enterica* en superficies de poliestireno por 48 h, dónde no encontraron diferencias

significativas en la cinética de crecimiento entre serovares, pero si capacidad de formación de biopelículas. El recuadro rojo incluye a las cepas con mayor capacidad para producir polímeros y que fueron capaces de crecer $>0.5 \text{ Log UFC/cm}^2$. También se incluyó la cepa S1, que no muestra un incremento de la población elevado, pero fue la mejor en producir polímeros.

Schel *et al.*, (2006) mencionan que *Salmonella* tiene la capacidad de formar biopelículas, las cuales pueden resistir condiciones variantes del medio ambiente y condiciones adversas. Las cepas S1 y S15 destacaron por su capacidad para formar biopolímeros, aún cuando no se multiplican en gran proporción al término de las 48 h. Esto concuerda con Carrascosa *et al.*, (2021) que mencionan que no siempre se presenta correspondencia entre estas dos capacidades. Al término del objetivo se concluyó que la S1, S5, S12, S7, S3 y S9 serían seleccionadas para evaluar el desarrollo de *Salmonella* y capacidad de formación de biopolímeros en contacto con la lechuga.

Caracterización de aceite esencial de naranja amarga (AEN).

La caracterización del AEN se muestra en el Cuadro 6. Entre los parámetros físicos, se determinó densidad y mostró valores de 0.8400- 0.8550 g/ ml. También se obtuvo un 73.5 como valor de índice de refracción y finalmente presentó miscibilidad en alcohol y turbidez a partir del 44.4 %. Los resultados observados, fueron comparados con otros autores (Essadik *et al.*, 2015) que mostraron similitud con los valores obtenidos de análisis físicoquímico en aceite esencial de romero. Farahmandfar *et al.*, (2020) reportaron de 1.32 g/ ml densidad a 35 °C en aceite esencial de residuos de cáscara de naranja amarga (*Citrus aurantium* L.)

Cuadro 6. Caracterización física del AEN

PARAMETROS FISICOS	ACEITE ESENCIAL DE NARANJA AMARGA g/ ml.
Densidad a 20 °C	0.8400 g/ ml- 0.8550 g/ ml
Índice de refracción	73.5
Miscibilidad	Soluble en alcohol- Turbidez a partir de 44.4%

También se realizó la caracterización química del aceite esencial de naranja amarga por cromatografía de gases acoplada a masas, dónde los compuestos desconocidos se identificaron comparando los espectros experimentales con la biblioteca espectro de masas NIST 2008, identificando un total de 15 sustancias químicas y 1 no identificado, dónde el limoneno formó el componente mayoritario (63.35 %), seguido por β -pineno (7.07%) (Figura 9; Soto *et al.*, 2022).

Abundance

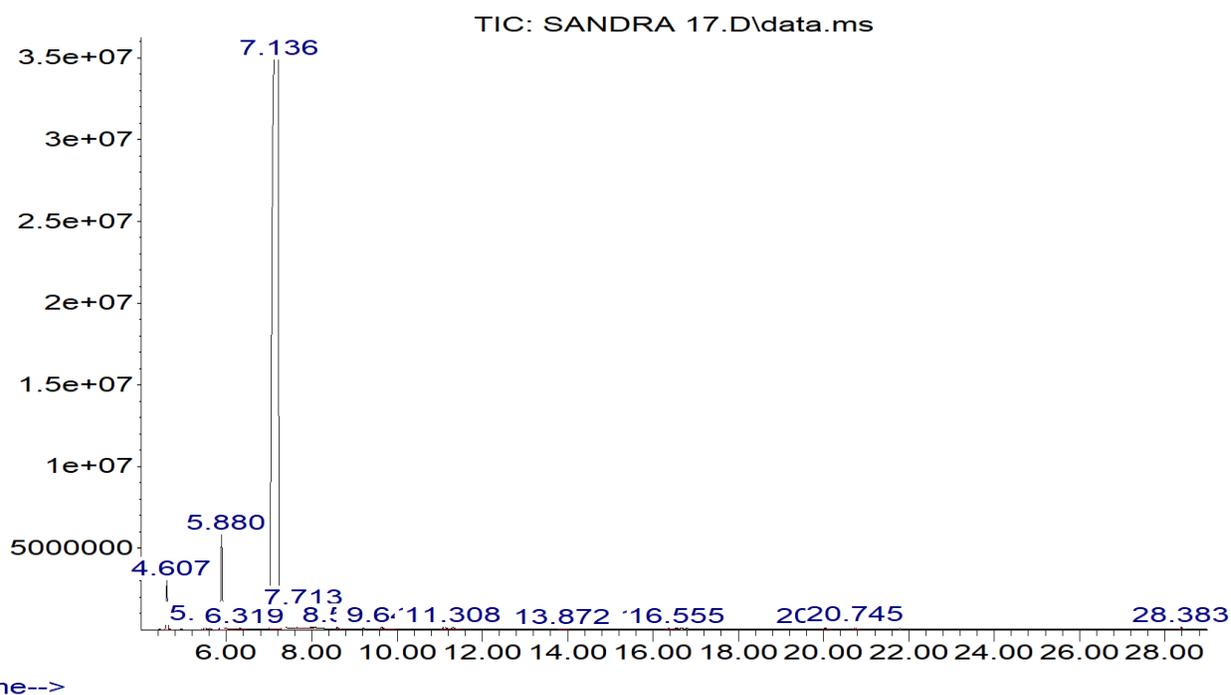


Figura 9. Cromatografía de gases acoplada a masas del AEN

Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura (Fisher *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2014; y Al-Amri *et al.*, 2018), dónde autores mencionan la identificación del limoneno como un componente principal en cítricos, como lima, limón y naranja. En un estudio de especies de lima por Lota *et al.*, (2002), detectaron un total de 59 componentes químicos con d-limoneno, pineno y sabineno como componentes principales. Lawal *et al.*, (2014) analizaron el aceite esencial de *C. aurantifolia* determinando que el d-limoneno (45 %) y el geranial (38 %) forman los principales componentes del aceite.

El linalol es uno de los componentes principales de algunos AE como de la familia de verbenáceas (*A. sellowii*, *L. alba*) y causa un aumento de la permeabilidad no solo de la carga negativa membranas sino también de células fúngicas. Debido a la naturaleza de su estructura química, los alcoholes poseen una fuerte afinidad de unión a diferentes estructuras moleculares, como proteínas o glicoproteínas (Pérez *et al.*, 2018). Por lo que, tienen una gran afinidad por las membranas celulares y exhiben un alto potencial para penetrar las paredes celulares lo que conduce a la fuga de materia citoplásmica.

6.4 Evaluación de la capacidad de cepas de *Salmonella* para adherirse y formar biopelículas en lechuga (*Lactuca sativa* L).

Salmonella tiene la capacidad de adherirse durante las primeras tres horas de contacto en lechuga. Se estimó el porcentaje de adhesión de las 6 cepas seleccionadas anteriormente y las cepas S5, S9, S1 mostraron mayor capacidad para adherirse a la lechuga (Figura 9).

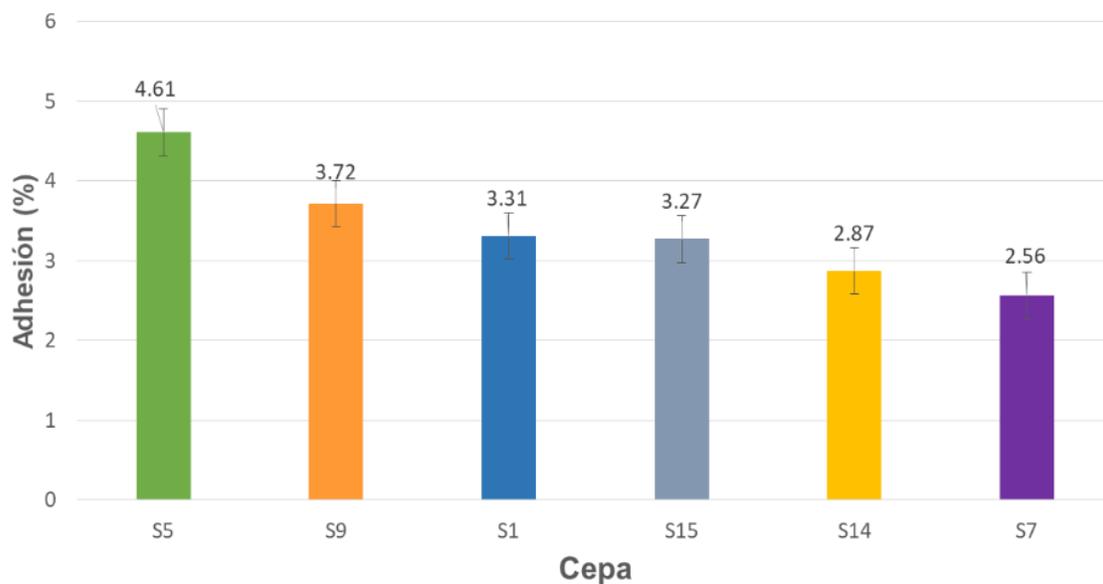


Figura 10. Adhesión de *Salmonella* después 3 horas en contacto con lechuga en 95 % de HR y presencia de extracto de lechuga (3%).

Investigaciones han demostrado que los microorganismos presentes en la naturaleza tienen la capacidad de formar biopelículas, formando estructuras multicelulares que tienen la capacidad de adherirse a distintas superficies sólidas, en toda clase de medio ambiente y que tiene la capacidad de producir una matriz que rodea a las células bacterianas, que incluye polisacáridos extracelulares, proteínas y ADN (Epstein *et al.*, 2011).

Elpers *et al.*, (2022) investigaron los factores que contribuyen a la unión superficial de *S. Typhimurium* a hojas de lechuga, donde mencionan que la participación de flagelos de *S. Typhimurium* en la adhesión a varias hojas verdes es importante, debido a que se han investigado en ensaladas una disminución adhesión a hojas de albahaca, lechuga y *V. locusta* para cepas que carecen de flagelos. Estos resultados concuerdan con la disminución de la adhesión a las hojas de *L. sativa* de una cepa mutante de *S. Typhimurium* que carece de filamentos de flagelos.

Una vez adheridas, todas las cepas mostraron capacidad para desarrollar sobre la superficie de la lechuga desde las 24 h de almacenamiento a 30 °C (Figura 11). Se observa un mayor crecimiento (de hasta 2 Log UFC/ cm²) en las cepas de *Salmonella* S1, S9 y S14.

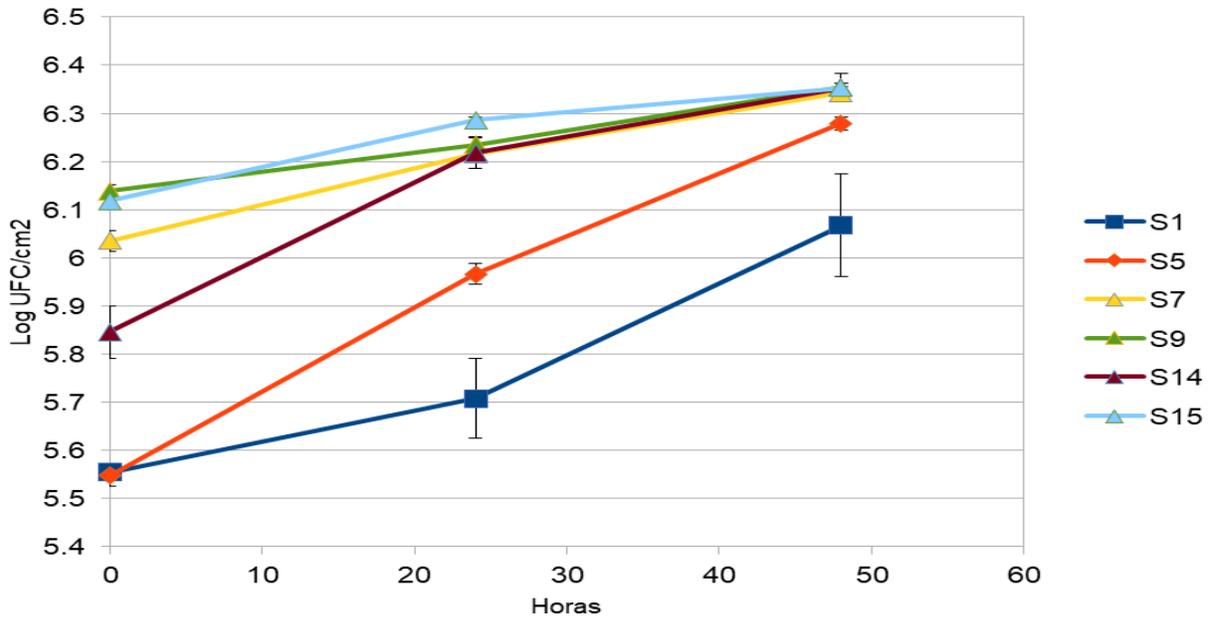


Figura 11. Cinética de crecimiento de *Salmonella* durante 48 horas en contacto con lechuga en presencia de extracto de lechuga (3 %) y almacenadas a 30 °C.

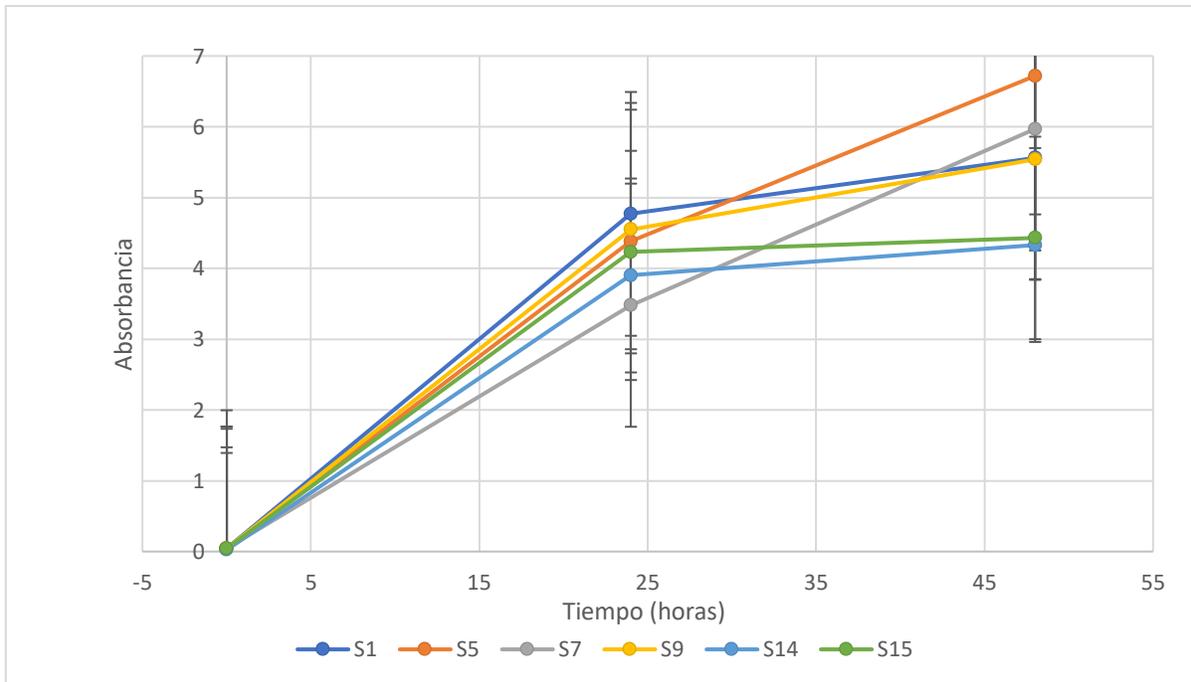


Figura 12. Cinética de formación de polímeros por cepas de *Salmonella* durante 48 horas en contacto con lechuga.

El incremento de la población de *Salmonella* observado sobre la superficie de lechuga fue superior que lo observado en esferas de acero inoxidable, lo que implica que las células obtienen nutrientes no sólo del extracto, si no de la misma superficie de la lechuga. En relación a la formación de biopolímeros por *Salmonella* en contacto con la lechuga, todas las cepas mostraron un aumento en los valores de densidad óptica, considerando que los valores son proporcionales a la cantidad de polímeros sintetizados, se observa un incremento en la cantidad de biopolímeros con el transcurso del tiempo con los valores muy similares entre las cepas, tanto a las 24 y a las 48h de contacto con la lechuga (Figura 12). Los niveles de polímeros producidos por las cepas fueron menores a los que se produjeron con las células adheridas a las esferas de acero inoxidable.

Se reconoce que la formación de biopelículas es un mecanismo que las células utilizan para responder a condiciones adversas, la menor disposición de nutrientes en el sistema de esferas de acero inoxidable, podría ser la razón de estas diferencias entre los niveles de polímeros generados (Carrascosa *et al.*, 2021).

6.5 Efecto antimicrobiano del aceite esencial de naranja sobre *Salmonella* entérica.

El AEN mostró efecto antimicrobiano sobre todas las cepas de *Salmonella* (Figura 13; Cuadro 7). El efecto antimicrobiano se observó aún en la dilución 1:100 v/v, dónde el aceite esencial muestra potencial para controlar patógenos sobre alimentos. Los resultados obtenidos coinciden con lo encontrado por autores que utilizaron extractos de cítricos mostrando inhibición microbiana. Parra, (2011) evaluó extractos de lima dulce (*Citrus limetta* Risso) sobre *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, dónde los extractos acuosos de favedo y pulpa fueron los que mostraron mayor actividad inhibitoria con halos de 20 mm. Farahmandfar *et al.*, (2020) reportaron inhibición de que *S. aureus* con aceite esencial de residuos de cáscara de naranja amarga (*Citrus aurantium* L.) con MIC (10 µg/ mL) y MBC (40µg/ mL); mientras que para *E. coli* la MIC fue de 40 µg/ mL y la MBC de 80µg/ mL. La actividad antibacteriana está bien correlacionada con la cantidad de compuestos fenólicos dentro de los aceites esenciales, específicamente por contener los más

conocidos y caracterizados compuestos de los aceites esenciales cítricos como limoneno, α -pineno, sabineno, β -mirceno y linalol que, debido a su efecto sinérgico, pueden aplicar un fuerte y amplio espectro de actividades antimicrobianas (Calo *et al.*, 2015). Placencia *et al.*, (2020) evaluaron las propiedades antimicrobianas de aceites esenciales de toronja y limón contra *Salmonella Typhi* mediante pruebas preliminares de difusión en papel, donde el concentrado de limón resultó más efectivo que el de toronja con CMB en rangos >13.5 mg/mL. Esta diferencia en las respuestas bacterianas puede estar influenciadas por el tipo de pared celular y características fisiológicas, que varían dependiendo de cada tipo microorganismo (Nazzaro *et al.*, 2013). También se considera principalmente a los monoterpenos oxigenados, que pueden actuar sinérgicamente con otros compuestos para aumentar la actividad antimicrobiana (Espina *et al.*, 2011).

Cuadro 7. Inhibición de cepas de *Salmonella* por AEN en medio de cultivo.

Cepa	Sin dilución	1/10 v/v	1/100 v/v
Zona de inhibición (mm)			
S1	4	5	2
S5	4	2.5	1.75
S9	3.75	2	1.75
S15	3.75	2.75	1
S2	3.5	2.5	1.5
S4	3.5	3.75	3.5
S7	3.5	3.25	1.75
S14	3.5	3	1.25
S24	3.5	3.5	1.5
S40	3.5	2	0.5
S3	3.25	2.25	2.5
S10	3.25	2.25	1
S17	3.25	1.5	1.25
S18	3.25	2.5	1.25
S37	3.25	2.5	1.5
S12	3	3.26	1.5
S25	3	2.5	1.25
S26	3	1.5	1.25
S22	2.5	2.5	1
S23	2.25	1.5	1



Figura 13. Efecto antimicrobiano de AEN sobre *Salmonella* en medio de cultivo.

6.6 Efecto del encapsulado de AEN sobre *Salmonella* adherida sobre lechuga.

El objetivo fue evaluar si el AEN encapsulado es capaz de inhibir el desarrollo o la sobrevivencia de *Salmonella*. Se llevó a cabo la cinética de crecimiento de *Salmonella* sobre lechuga a 10° y 30° C en presencia y ausencia del AEN encapsulado y sin encapsular y HR al 95 %. Los resultados se muestran en las Figuras 14 y 15, en ambas condiciones se observó desarrollo del microorganismo; sin presencia del AEN, el patógeno fue capaz de incrementar su población en aproximadamente 0.8 y 2.0 Log de UFC/ cm² a 30 y 10 °C, respectivamente. La presencia del AEN, tanto encapsulado, como sin encapsular, redujo la población alcanzada por *Salmonella* al final del almacenamiento. Dunn *et al.*, (2019) compararon una emulsión de aceite de yema de clavo (CBO; 0,2 y 0,5 %) o aceite de tomillo (0,2 y 0,5 %) como sanitizante contra la eficacia antimicrobiana de hipoclorito de sodio (200 ppm) en pimientos inoculados con *Salmonella*; los tratamientos de emulsión de aceite de tomillo y de clavo fueron los menos afectados por la carga microbiana y se obtuvo una reducción. Por lo que el uso de agentes químicos como el hipoclorito de sodio puede ser reemplazado o complementado por la eficacia antimicrobiana de emulsiones de aceites esenciales.

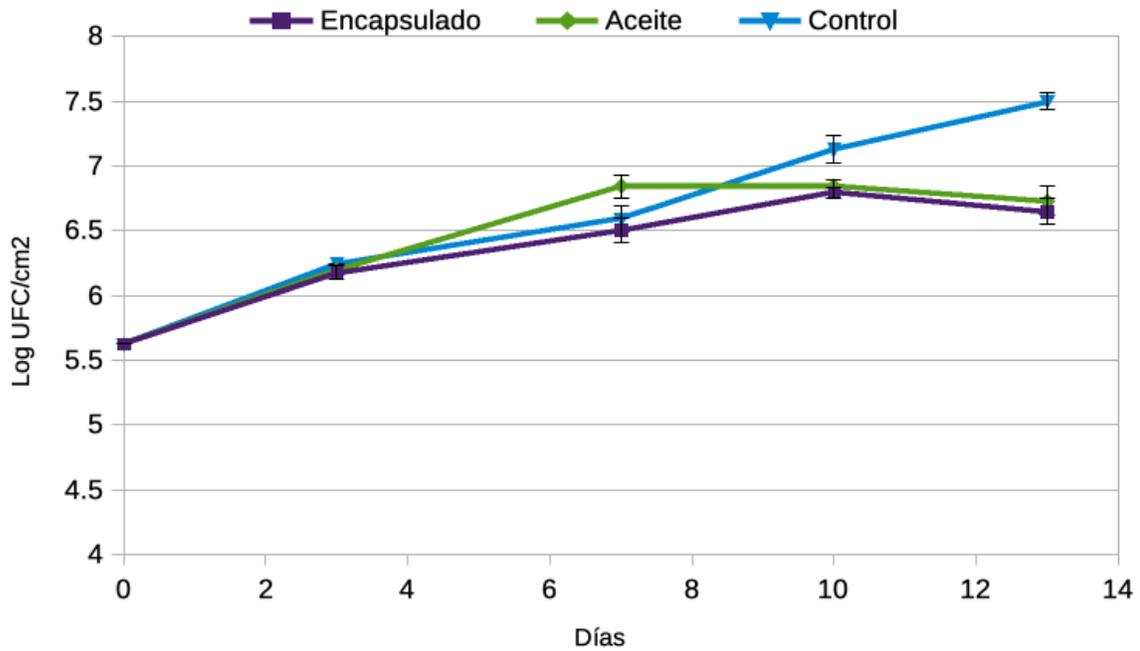


Figura 14. Comparación de cinética de crecimiento de *Salmonella* sobre lechuga a 10 °C de temperatura, HR 95%.

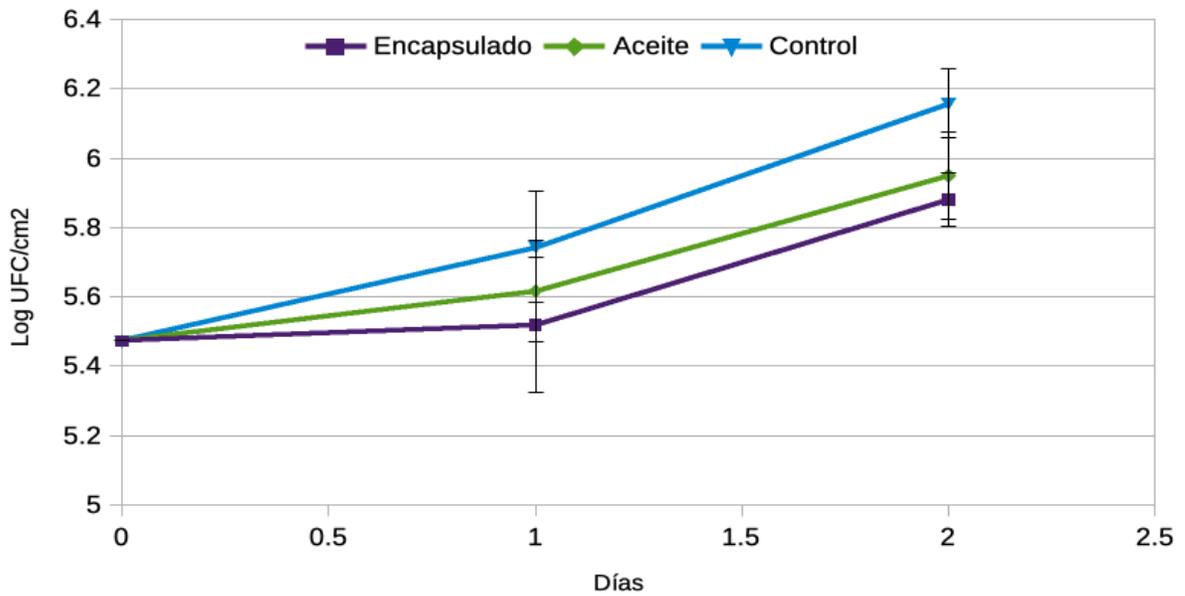


Figura 15. Resultados obtenidos del almacenamiento de *Salmonella* sobre lechuga a 30 °C de temperatura, HR 95%.

Autores mencionan que *Salmonella* presenta la capacidad para crecer y desarrollarse a temperaturas menores a su temperatura óptima, y que los biopolímeros que se sintetizan juegan un papel fundamental en la adhesión de las bacterias a las superficies (Schöbitz *et al.*, 2009). Aunque el AEN presenta principios bioactivos como terpenos, aldehídos y ácidos orgánicos, se ha observado que una célula adherida y dentro de una biopelícula es más resistente a la mayoría de los agentes sanitizantes que las células suspendidas. La reducción en la población alcanzada de *Salmonella* a 13 y 2 días de almacenamiento a 10° y 30°C respectivamente es pequeña (1 Log/ UFC/ cm²), pero puede ser un elemento de un conjunto de medidas que logren inocuidad del alimento. Es factible que proteínas y polisacáridos de las biopelículas que se van formando interactúan químicamente con los antimicrobianos, limitando así el contacto de éstos con los microorganismos.

All- Nabulsi *et al.*, (2022) evaluaron los aceites esenciales de tomillo (TO) y canela (CO) mostrando la actividad antimicrobiana contra *Salmonella* spp. a 37 y 10 °C usando un método de ensayo de difusión en disco en tahini, la adición de 2.0% de CO redujo el número de *Salmonella* spp. por 2.87 o 2.35 Log CFU.

Shen *et al.*, (2012) mencionan que las estructuras celulares pueden facilitar la unión y crecimiento de futuras células bacterianas, ya que uno de los primeros pasos para la formación y crecimiento de biopelícula es la unión con la superficie.

VII. CONCLUSIONES

El extracto de lechuga entre 0.5 % y 3 % contiene nutrientes suficientes para permitir el desarrollo de *Salmonella*.

El AEN tiene como principal componente al limoneno y ejerce un efecto inhibitorio homogéneo sobre las diferentes cepas de *Salmonella* (de hasta 1 o 2 Log UFC/cm²).

El AEN mostró actividad antibacteriana en su forma libre o encapsulado contra *Salmonella* adherida a lechuga almacenada a 10 ° C y 30 ° C, y podría ser parte de un sistema de barreras múltiples.

El AEN encapsulado muestra potencial para ser aplicado en alimentos almacenados en bajas temperaturas. Estos resultados pueden ayudar a establecer condiciones optimizadas para la continuación de estudios de actividad antibacteriana de aceites esenciales encapsulados.

VIII. REFERENCIAS.

Agbaje, M., Begum, R. H., Oyekunle, M. A., Ojo, O. E., & Adenubi, O. T. (2011). Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note. *Folia Microbiologica*, 56 (6), 497-503.

Al-Nabulsi, A. A., Osaili, T. M., Olaimat, A. N., Almasri, W. E., Ayyash, M., Al-Holy, M. A., ... & Holley, R. A. (2020). Inactivation of *Salmonella* spp. in tahini using plant essential oil extracts. *Food microbiology*, 86, 103338.

Angelo, K. M., Chu, A., Anand, M., Nguyen, T. A., Bottichio, L., Wise, M., Williams, I., Seelman, S., Bell, R., Fatica, M., Lance, S., Baldwin, D., Shannon, K., Lee, H., Trees, E., Strain, E., Gieraltowski, L., & Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2015). Outbreak of *Salmonella* Newport infections linked to cucumbers--United States, 2014. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 64 (6), 144–147.

Amor, G., Sabbah, M., Caputo, L., Idbella, M., De Feo, V., Porta, R., ... y Mauriello, G. (2021). Aceite esencial de albahaca: composición, propiedades antimicrobianas y microencapsulación para producir películas activas de quitosano para el envasado de alimentos. *Alimentos*, 10(1), 121.

Araneda, J., Pinheiro, A. C., Rodriguez Osiac, L., & Rodriguez, A. (2018). Consumo aparente de frutas, hortalizas y alimentos ultraprocesados en la población chilena. *Revista Chilena de Nutrición*, 43 (3), 271-278.

Barak, L. Gorski, P. Naraghi-Arani, and A. O. Charkowski (2005). *Salmonella enterica* virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (10), 5685–5691.

Bedoya-Serna, C. M., Dacanal, G. C., Fernandes, A. M., & Pinho, S. C. (2018). Antifungal activity of nanoemulsions encapsulating oregano (*Origanum vulgare*) essential oil: in vitro study and application in Minas Padrão cheese. *Brazilian journal of microbiology*, 49, 929-935.

Benítez, S., Achaerandio, I., Pujolà, M., & Sepulcre, F. (2015). *Aloe vera* as an alternative to traditional edible coatings used in fresh-cut fruits: A case of study with kiwifruit slices. *Food Science and Technology*, 61(1), 184-193.

Boletín epidemiológico (2020). <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico> (Consultado en octubre del 2020).

Brandl, M. T. (2006). Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology*, 44 (1), 367-392.

Cabellos Espinoza, Y. D. R. (2022). Contaminación por enteroparásitos en lechuga (*Lactuca sativa*) en establecimientos de consumo público de alimentos en Zonas Urbanas de los Distritos de Tacna.

Cabrera-Diaz, E., Barbosa-Cardenas, C. M., Perez-Montaña, J. A., Gonzalez-Aguilar, D., Pacheco-Gallardo, C., & Barba, J. (2013). Occurrence, serotype diversity, and antimicrobial resistance of *Salmonella* in ground beef at retail stores in Jalisco state, Mexico. *Journal of Food Protection*, 76 (12), 2004-2010.

Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. *Food Control*, 54 (2), 111-119.

Campos, J. (2012). Evaluación del efecto de uso de fertilizantes foliares con acción bioestimulantes, sobre la producción y calidad de las lechugas. Tesis. Santiago: *Universidad de Chile*.

Carpio Jiménez, E. (2022). Métodos de detección y eliminación de *Salmonella* spp en vegetales de hoja.

Carrascosa C, Raheem D, Ramos F, Saraiva A, Raposo, A. Microbial Biofilms in the Food Industry—A Comprehensive Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2021, 18, 2014. <https://doi.org/10.3390/ijerph18042014>.

Castelijin G, Van der Vee S, Zwietering M, Moezelaar R, Abee T. (2012). Diversity in biofilm formation and production of curli fimbriae and cellulose of *Salmonella Typhimurium* strains of different origin in high and low nutrient medium. *Biofouling*, 28 (1), 51-63.

Castillo, A. del C. G., Martínez, L. H. P., & Apodaca, N. L. C. (2008). Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo. *Veterinaria Mexico*, 39 (1), 81–90.

Castillo-López, K., (2015). Elaboración y caracterización de biopelículas de quitosán adicionadas con aceites esenciales y su empleo para mejorar los atributos de calidad de papaya. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Chiapas, 26 pp.

Cavalli, J. F., Ranarivelo, L., Ratsimbason, M., Bernardini, A. F., & Casanova, J. (2001). Constituents of the essential oil of six *Helichrysum* species from Madagascar. *Flavour and Fragrance Journal*, 16 (4), 253-256.

CDC, (2012a). Brote multiestatal de infecciones por *E. coli* O157: H7 vinculado a Romaine lechuga (actualización final). Disponible en: <https://www.cdc.gov/ecoli/2011/romaine-lettuce-3-23-12.html> (Consultado el 1 de febrero de 2021).

CDC, (2012b). Brote multiestatal de infecciones por *Salmonella* Braenderup asociado with Mangoes (Actualización final). Disponible en: <https://www.cdc.gov/salmonella/braenderup-08-12/index.html> (Consultado el 1 de febrero de 2021).

CDC, (2012c). Brote multiestatal de *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Infecciones de Newport relacionadas con el melón (actualización final). Disponible en: <https://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-cantaloupe-08-12/index.html> (Consultado el 1 de febrero de 2021)

CDC, (2016b). Brote multiestatal de infecciones por *Salmonella* Poona vinculado a Pepinos importados (actualización final). Disponible en: <https://www.cdc.gov/salmonella/poona-09-15/index.html> (Consultado el 8 de febrero de 2021).

CDC, (2017a). Brote multiestatal de infecciones por *Salmonella* vinculado a productos importados Maradol Papayas (Actualización final). Disponible en: <https://www.cdc.gov/salmonella/kiambu-07-17/index.html> (Consultado el 10 de marzo de 2021).

CDC, (2017d). Sistema Nacional de Notificación de Brotes (NORS). Disponible en: <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/> (Consultado el 10 de marzo de 2021).

Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA) (2018). Estudios e investigaciones: nueva ruralidad; enfoques y propuestas para América Latina. *Cuadernos de Geografía: Revista Colombiana de Geografía*, 23 (1), 189-193.

Chaieb, I., Zarrad, K., Sellam, R., Tayeb, W., Hammouda, A. B., Laarif, A., & Bouhachem, S. (2018). Chemical composition and aphicidal potential of *Citrus aurantium* peel essential oils. *Entomol Gen*, 37, 63-75.

Chen, Y., Luo, Y., Pettengill, J., Timme, R., Melka, D., Doyle, M. (2017). Secuencia singleton tipo 382, un grupo clonal emergente de *Listeria monocytogenes* asociado con tres brotes multiestatales relacionados con frutas de hueso contaminadas, manzanas acarameladas y ensalada de hojas verdes. *Journal of Clinical Microbiology*, 55 (3), 931–941.

Chlebicz, A. y Slizewska, K. (2018). Campylobacteriosis, salmonellosis, yersiniosis and listeriosis foodborne diseases : A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15 (5), 1–29.

Cholán Pacheco, K., Zavaleta Espejo, G., Saldaña Jiménez, J., & Blas Cerdán, W. (2019). Efecto del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) sobre el crecimiento de *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*. *Arnaldoa*, 26(2), 699-712.

Cherrat, L.E., Mohammed, B., García-Gonzalo, D., Pagán, R. y Laglaouia, A. (2014). Chemical composition and antioxidant properties of *Laurus nobilis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils from Morocco and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94 (6), 1197–1204.

Da Silva, A. M. A., Gomes, L. M. D., de Carvalho, J. T. F., Barbosa, F. R., & Pereira, D. E. (2018). Características da *Salmonella* Spp. *International Journal of Nutrology*, 11(S 01), Trab 228.

Desiree, K., Schwan, C. L., Ly, V., Hok, L., Bello, N. M., Nwadike, L., ... & Vipham, J. L. (2021). Investigating *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and Coliforms on fresh vegetables sold in informal markets in Cambodia. *Journal of Food Protection*, 84(5), 843-849.

Dhowlaghar, N., Abeyundara, P. D. A., Nannapaneni, R., Schilling, M. W., Chang, S., Cheng, W. H., & Sharma, C. S. (2018). Biofilm formation by *Salmonella* spp. in catfish mucus extract under industrial conditions. *Food Microbiology*, 70, 172-180.

Díez-García, M., Capita, R., & Alonso-Calleja, C. (2012). Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology*, 173–180.

Dinu Laura Dorina & Susan Bach. (2011). Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 in the phyllosphere of lettuce: a food safety risk factor. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (23), 8295–8302.

Di Ciccio, P., Vergara, A., Festino, A. R., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini, S., & Ianieri, A. (2015). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity, *Food Control*. 50, 930-936.

Dougnac, C., Pardo, C., Meza, K., Arredondo, C., Blank, O., Abalos, P., & Retamal, P. (2015). Detection of *Salmonella enterica* in Magellanic penguins (*Spheniscus*

magellanicus) of Chilean Patagonia: evidences of inter-species transmission. *Epidemiology & Infection*, 143 (6), 1187-1193.

Doulgeraki, A. I., M. Papaioannou, and G. J. E. Nychas. (2016). Targeted gene expression study of *Salmonella enterica* during biofilm formation on rocket leaves. *LWT. Food Science and Technology*, 65, 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.017>

Dunn, L. L., Harness, M. L., Smith, D. M., Gorman, S. J., Zhong, Q., Davidson, P. M., & Critzer, F. J. (2019). Essential oil emulsions as postharvest sanitizers to mitigate *Salmonella* cross-contamination on peppers. *Journal of Food Protection*, 82(1), 159-163.

Elpers, L., Lüken, L., Lange, F. y Hensel, M. (2022). Factores necesarios para la adhesión de *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium a *Lactuca sativa* (lechuga). *Microbiology Spectrum*, e03436-22.

Epstein, A. K., Pokroy, B., Seminara, A., & Aizenberg, J. (2011). Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(3), 995-1000.

Estrada, A. L. (2019). Comportamiento de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* adheridas a jitomate cherry y su tolerancia a desinfectantes.

Essadik, H.S., Kribii, F. Z., A., Habsaoui, A., Ounine, K., Benmoumen, A. y Kribii, A. (2015). Estudio de la composición química del aceite esencial de romero del oeste de Marruecos y evaluación de la actividad antioxidante y antibacteriana de sus extractos. *Mundo J. Pharmaceut. Res*, 4(7), 307-323.

Estrella-Gómez N, Escalante-Réndiz D, González-Burgos A, Sosa-Cordero D, Rojas-Herrera R. (2016). Microbiological analysis of the red octopus in fishing ports of Campeche, Mexico. *Salud Pública Mexicana*, 58 (4), 453–460

Faour-Klingbeil, M. Murtada, V. Kuri & ECD Todd (2016). Comprender las rutas de contaminación de las verduras listas para comer en el Medio Oriente. *Control de alimentos*, 62, 125-133.

FAO, 2011. Aumenta la producción hortofrutícola. AGRONoticias América Latina y el Caribe. Disponible en: <http://www.fao.org/agronoticias/agronoticias/detalle/es/c/213583/> (Consultado el 20 de octubre de 2020).

FAO, 2014. Aumenta la producción hortofrutícola. AGRONoticias América Latina y el Caribe. Disponible en: <http://www.fao.org/agronoticias/agronoticias/detalle/es/c/213583/> (Consultado el 23 de octubre de 2020).

Farahmandfar, R., Tirgarian, B., Dehghan, B. y Nemati, A. (2020). Comparación de diferentes métodos de secado en residuos de cáscara de naranja amarga (*Citrus aurantium* L.): Cambios en las propiedades físicas (densidad y color) y de aceite esencial (rendimiento, composición, antioxidantes y antibacterianos) de los polvos. *Revista de medición y caracterización de alimentos*, 14(2), 862-875.

FDA, (2013a). Resumen de la investigación de la FDA: Brote multiestatal de *Salmonella* Infecciones por Typhimurium y *Salmonella* Newport vinculadas al melón cultivado en Chamberlain Farms en el suroeste de Indiana. *Food Microbiology*, 24 (1), 106–112.

Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health, *Journal of Food Protection* 77 (1), 150-170.

Ferris Pla, S. (2022). *Detección de Salmonella spp. y Listeria monocytogenes en frutas y verduras ecológicas mediante técnicas clásicas y moleculares* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).

Fidan, H., Stefanova, G., Kostova, I., Stankov, S., Damyanova, S., Stoyanova, A., & Zheljazkov, V. D. (2019). Chemical composition and antimicrobial activity of *Laurus nobilis* L. essential oils from Bulgaria, *Molecules*, 24 (4), 804.

Franz, E., Visser, A. A., Van Diepeningen, A. D., Klerks, M. M., Termorshuizen, A. J., & Van Bruggen, A. H. (2007). Quantification of contamination of lettuce by GFP-expressing *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Food Microbiology*, 24 (1), 106-112.

Galie, S., Garcia-Gutierrez, C., Miguelez, E. M., Villar, C. J., and Lombo, F. (2018). Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. *Front. Microbiol.* 9:898. doi: 10.3389/fmicb.2018.00898

Gal-Mor, O., Boyle, E. C., & Grassl, G. A. (2014). Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal. *Salmonella enterica* serovars differ. *Frontiers in microbiology*, 5 (1), 391.

Galvis, J.A., Arjona, H. (2010). Influencia de la temperatura y el tiempo de almacenamiento en la conservación del mango (*manguifera Indica* L) Variedad van Dique. En: Memorias 2º Congreso Iberoamericano de Tecnología poscosecha y agroexportaciones. Vol. 3. Páginas: 79 – 86.

Godínez-Oviedo, A., Tamplin, M. L., Bowman, J. P., & Hernández-Iturriaga, M. (2020). *Salmonella enterica* in Mexico 2000–2017: Epidemiology, antimicrobial

resistance, and prevalence in food. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17 (2), 98-118.

Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., & Castro-Rosas, J. (2013). Frequency and correlation of some enteric indicator bacteria and *Salmonella* in ready-to-eat raw vegetable salads from Mexican Restaurants. *Journal of Food Science*, 78 (8), 201-207.

González Blair, G., & Galvis, J. A. (2010). Desarrollo tecnológico para la optimización en la conservación de lechuga, tomate y zanahoria precortadas (alimentos mínimamente procesados).

Gonzalez Vallejo, L. D., & Ortiz Ramirez, M. C. (2021). Aplicación de métodos cualitativos y cuantitativos en comunidades rurales para el estudio de la percepción social debido a la implementación de una estructura de almacenamiento subterráneo para productos hortofrutícolas.

Gundogdu, A., Kilic, H., Ulu-Kilic, A., Parkan, O. M., & Ture, Z. (2017). Distribution and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Serovars Isolated in Kayseri Region/Kayseri Bolgesinde Soyutlanan *Salmonella* Serovarlarının Dagilimi ve Antimikrobiyal Duyarliliklari. *KLIMIK Journal*, 30 (1), 22-27.

Gutiérrez-Cogco, L., Montiel-Vázquez, E., Aguilera-Pérez, P. and González-Andrade, M. C. (2000) *Salmonella* serotypes identified in Mexican health services. *Salud Publica Mexicana*, 42 (6), 490–495.

Gu, L., Chen, Q., Guo, A., Liu, W., Ruan, Y., Zhang, X., & Nou, X. (2020). Differential effects of growth medium salinity on biofilm formation of two *Salmonella enterica* strains. *Journal of Food Protection*, 83 (2), 196-203.

Heiman, K. E., Mody, R. K., Johnson, S. D., Griffin, P. M., & Gould, L. H. (2015). *Escherichia coli* O157 outbreaks in the United States, 2003–2012. *Emerging Infectious Diseases*, 21 (8), 1293.

Infecciones de Newport relacionadas con el melón (actualización final). Disponible en: <https://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-cantaloupe-08-12/index.html>. (Consultado el 24 de marzo de 2021).

Joerger, R. D., Sartori, C. A., & Kniel, K. E. (2009). Comparison of genetic and physiological properties of *Salmonella enterica* isolates from chickens reveals one major difference between serovar Kentucky and other serovars: response to acid. *Foodborne pathogens and disease*, 6(4), 503-512.

Juarez, J., Castro, A. J., Jaúregui, J. F., Lizano, J. V., Carhuapoma, M., Choquesillo, F. F., ... & Ramos, N. (2010). Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. (naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica. *Ciencia e investigación*, 13(1), 9-13.

Jung, J. y Schaffner, D. W. (2021). Modelar la supervivencia de *Salmonella* en pepinos enteros en función de la temperatura y la humedad relativa. *Microbiología de Alimentos*, 100, 103840.

Koukkidis, G., Haigh, R., Allcock, N., Jordan, S., & Freestone, P. (2017). Salad leaf juices enhance *Salmonella* growth, colonization of fresh produce, and virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(1), e02416-16.

Lawal, O.A., Ogunwande, I.A., Owolabi, M.S., Giwa, A.O., Ajeniya, A.A., Kasali, F.A. A budu., Sanni, A.A., Opoku A.R. Análisis comparativo de aceites esenciales de *Citrus aurantifolia* Swingle y *Citrus reticulata* Blanco, de dos localidades diferentes del

estado de Lagos, Nigeria. *Am Journal Essent Oils Natural Produce*, 2 (2) (2014), pp. 8-12

Leyva Abascal, L. (2022). Factores de contaminación microbiológica en el agua de uso agrícola del sistema productivo de cilantro (*Coriandrum sativum L.*), propuesta de medidas preventivas (Master's thesis, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

Liu, D., Lawrence, ML, Ainsworth, AJ y Austin, FW (2005). Comparativa evaluación de la tolerancia a ácidos, álcalis y sales en *Listeria monocytogenes* cepas virulentas y avirulentas. *FEMS Microbiology*, 243, 373–378. doi: 10.1016 / j.femsle.2004.12.025.

Lochan Barman, K. y Kumar Jha, D. (2013). Comparative chemical constituents and antimicrobial activity of normal and organic ginger oils (*Zingiber officinale roscoe*). *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 4(1), 259-266.

Loo E, A. (2017). Comportamiento de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* adheridas a jitomate cherry y su tolerancia a desinfectantes. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma De Querétaro.

López, A., Ruiz, A. C., Cabrera, C., León, G., & Tejeda, F. (2014). Prevalencia de cepas multirresistentes de *Salmonella* spp y *Escherichia coli* 0157: H7 en alimentos crudos en la Ciudad de Puebla. *Ciencias Naturales y Exactas, Guanajuato*. Disponible en: https://www.ecorfan.org/handbooks/Ciencias%20Naturales%20T-II/Articulo_23.pdf. (Consultado en enero 2021)

Lota, M.L., de Rocca Serra, D., Tomi, F., Jacquemond, C., Casanova, J. Componentes volátiles de los aceites de cáscara y hoja de las especies de limón y lima. *Journal Agricultural Food Chem*, 50 (2002), págs. 796-805

Lynch, RV Tauxe y CW Hedberg. (2009). Creciente carga de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos debido a productos frescos contaminados: riesgos y oportunidades. *Epidemiología e Infección*, 137 (3), 307–315.

Manoj, H., Sreenivas, K., Shankarappa, T., Krishna, H., (2016). Studies on chitosan and *Aloe vera* gel coatings on biochemical parameters and microbial population of bell pepper (*Capsicum annuum L.*) under ambient condition. *Journal Microbiology*, 5 (1), 399-405.

Mattos De Oliveira, M.M., Florisvaldo Brugnera, D. y Hilsdorf Piccoli, R. (2013). Essential oils of thyme and rosemary in the control of *Listeria monocytogenes* in raw beef. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44 (4), 1181-1188.

Mba-Jonas, W. Culpepper, T. Hill (2011). A multistate brote de humanos *Salmonella* Infecciones de Agona asociadas con el consumo de papayas enteras frescas importadas de México-Estados Unidos. *Enfermedades Clínicas Infecciosas*, 66 (11), 1756-1761.

Mendoza, J. A. M. (2015). Evaluación de la formación de biopelículas de *Salmonella* spp. en equipo de procesamiento cárnico de acero inoxidable (Doctoral dissertation, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo).

Moraes, J. O., Cruz, E. A., Souza, E. G., Oliveira, T. C., Alvarenga, V. O., Peña, W. E., & Magnani, M. (2018). Predicting adhesion and biofilm formation boundaries on stainless steel surfaces by five *Salmonella enterica* strains belonging to different serovars as a function of pH, temperature and NaCl concentration. *International Journal of Food Microbiology*, 281, 90-100.

Muñoz, C. A. (2018). Identificación morfológica de los hongos causantes de la pudrición radicular en lechuga (*Lactuca sativa* L.) en el Valle de Tumbaco. Quito: Tesis de Licenciatura. *Universidad Central del Ecuador*.

Link: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/15114>

(Consultado en enero 2021).

Nafis, A., Kasrati, A., Jamali, C. A., Custódio, L., Vitalini, S., Iriti, M., & Hassani, L. (2020). A Comparative Study of the in Vitro Antimicrobial and Synergistic Effect of Essential Oils from *Laurus nobilis* L. and *Prunus armeniaca* L. from Morocco with Antimicrobial Drugs: New Approach for Health Promoting Products. *Antibiotics*, 9 (4), 140.

Nostro, A., Cellini, L., Di Giulio, M., D'Arrigo, M., Marino, A., Blanco, A. R., & Bisignano, G. (2012). Effect of alkaline pH on staphylococcal biofilm formation. *Apmis*, 120 (9), 733-742.

Nou, X., Luo, Y., Hollar, L., Yang, Y., Feng, H., Millner, P., (2011). Chlorine stabilizer T-128 enhances efficacy of chlorine against cross-contamination by *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* in fresh-cut lettuce processing. *Journal of Food Science*, 76, 218–224.

Núñez, I. C., Rondón, L. P., Paumier, K. H., & Acosta, J. C. (2022). Influencia de variables meteorológicas en la especie medicinal *Citrus x aurantium* L. *Revista Científica del Amazonas*, 5(9), 14-25.

Olea, A., Díaz, J., Fuentes, R., Vaquero, A., & García, M. (2012). Vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 29 (5), 504-510.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Proyecto “Ayuda Humanitaria de Asistencia y Recuperación para Comunidades Afectadas por la sequía en el Chaco” 2011. (Consultado el 27 de octubre de 2020). <file:///F:/INVEST.%20HORTALIZAS/a-as972s.pdf>

Oscar, T. P. (2009). Predictive model for survival and growth of *Salmonella* Typhimurium DT104 on chicken skin during temperature abuse. *Journal of Food Protection*, 72 (2), 304-314.

Pachepsky Y, Shelton D, McLain J, Patel J, Mandrell R. (2011). Irrigation waters as a source of pathogenic microorganisms in produce: a review. *Adv Agronomy*, 113, 73-138.

Parra, M. D. G. (2013). Estudio de extractos de lima dulce (*Citrus limetta* Risso) sobre *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Paterlini, H., González, V., & Inés Picone, I. (2019). Producción de lechuga en un suelo con aplicación de compost de cama de pollo. *Ciencia del Suelo*, 37 (1), 38-50.

Patrignani, F., Siroli, L., Serrazanetti, D. I., Gardini, F., & Lanciotti, R. (2015). Innovative strategies based on the use of essential oils and their components to improve safety, shelf-life and quality of minimally processed fruits and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 46 (2), 311–319.

Pérez-López, U., Sgherri, C., Miranda-Apodaca, J., Micaelli, F., Lacuesta, M., Mena-Petite, A., ... & Muñoz-Rueda, A. (2018). La concentración de compuestos fenólicos aumenta en

lechugas cultivadas con alta intensidad de luz y CO₂ elevado. *Fisiología y bioquímica vegetal*, 123, 233-241.

Pérez Miravete, A. (2014). Fuentes de infección y transmisión de salmonelosis. *Salud pública de México*, 16 (1), 37-48.

Pérez Zamora, C. M., Torres, C. A., & Nuñez, M. B. (2018). Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Verbenaceae species growing in South America. *Molecules*, 23(3), 544.

Qi, Q. Huang, & Y.-C. Hung. (2018). Efficacy of activated persulfate in inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 284, 40–47.

Ramayoni, S., & Martín, C. (2007). *Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos: posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento*. Universitat Autònoma de Barcelona.

Rodgers, J. N. Cash, M. Siddiq, & E. T. Ryser. (2014). A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. *Journal of Food Protection*, 67 (4), 721–731.

Rossi, C., Chaves-López, C., Možina, S. S., Di Mattia, C., Scuto, S., Luzzi, I., & Serio, A. (2019). *Salmonella enterica* adhesion: Effect of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil on lettuce. *Food Science and Technology*, 111, 16-22.

Ruiz Turushina, N. V. (2022). *Evaluación de la adaptabilidad de cultivares de lechuga (Lactuca sativa L.), en el cantón Pujilí, provincia de Cotopaxi* (Bachelor's thesis).

Salas, R. G., del Río, M. M. V., & Guamán, A. A. M. (2023). Diagnóstico y transmisión de la infección alimentaria salmonelosis. *Dilemas contemporáneos: Educación, Política y Valores*.

Salvatierra, G., Pinto, C., Inga, E., Siuce, J., & Calle, S. (2015). Detección de *Salmonella* sp en carcasas porcinas en camales de Lima, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26 (4), 682-688.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (2017). “Aumenta 30 por ciento producción de papaya “Hecho en México” en la presente administración”. (Consultado en octubre del 2020).

Schel, A. J., Marsh, P. D., Bradshaw, D. J., Finney, M., Fulford, M. R., Frandsen, E., y otros. (2006). Comparison of the Efficacies of Disinfectants To Control Microbial Contamination in Dental Unit Water Systems in General Dental Practices across the European Union. *Applied Environmental Microbiology*, 1380-1387.

Schlisselberg, D. B., & Yaron, S. (2013). The effects of stainless steel finish on *Salmonella* Typhimurium attachment, biofilm formation and sensitivity to chlorine. *Food Microbiology*, 35(1), 65–72.

Schöbitz, R., Ciampi, L., & Nahuelquin, Y. (2009). *Listeria monocytogenes*: Un peligro latente para la industria alimentaria. *Agro Sur*, 37(1), 1–8.

Self, J. L., Conrad, A., Stroika, S., Jackson, A., Burnworth, L., Beal, J., & Basler, C. (2016). Outbreak of listeriosis associated with consumption of packaged salad—United States and Canada, 2015–2016. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65 (33), 879-881.

Serrano, A. M., Calderón-Parra, J., & Pascual, I. P. (2022). Infecciones por *Salmonella* y *Yersinia*. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 13(51), 2981-2991.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Panorama Agroalimentario 2021. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural 2021.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Panorama Agroalimentario 2020. Primera Edición 2020. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural 2021. (Consultado en enero de 2021)

https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2020/Atlas-Agroalimentario-2020

Shen, D. W., Pouliot, L. M., Hall, M. D., & Gottesman, M. M. (2012). Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacological reviews*, 64(3), 706-721

Shahhen, R. (2010). Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiology*, 27 (3), 347-355.

Skandamis, P.N. & Nychas, G.J.E. (2000). Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade 17 eggplant salad at various temperatures, pHs and oregano essential oil concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (4), 1646–1653.

SIAP (2022). Panorama agroalimentario 2020. https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2020/Atlas-Agroalimentario-2020. (Consultado en febrero de 2021).

Silva-Hidalgo, H., González-Núñez, M. A., Pinales, A., & Villalobos, A. (2017). Proyecto de manejo de recarga de acuíferos en los ojos de Chuvíscar, Chihuahua, México. Manejo de la recarga de acuíferos: *Un enfoque hacia Latinoamérica*, 191-225.

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de México, 2020. (Consultado en noviembre 2020).

Soto, J. A., Mendoza, S.O., Quintanar D. (2022). Desarrollo y caracterización de una película comestible a base de aislado proteico de semilla de yaca obtenida por la técnica de electrohilado incorporando complejo b- ciclodextrina: aceite esencial de naranja. Tesis de Maestría.

Suresh T, Hatha AAM, Sreenivasan D, Sangeetha N, Lashmanaperumalsamy P. (2006). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella Enteritidis* and other salmonellas in the eggs and egg-storing trays from retails markets of Coimbatore, South India. *Food Microbiology*, 23 (3), 294–299.

Tomar, O., Akarca, G., Gök, V., & Ramadan, M. F. (2020). Composition and antibacterial effects of laurel (*Laurus nobilis* L.) leaves essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23 (2), 414-421.

Torres-Vitela, M. R., Navarro Hidalgo, V., Villaruel Lopez, A., Olea Rodriguez, M.A., (2011). Prevalence of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in chorizo and longaniza (sausages). *Nacameh*, 5 (1), 96-107.

USDA (2018). Sistema de datos de disponibilidad de alimentos (per cápita). "Fruta y Vegetales". Disponible en: <https://www.ers.usda.gov/data-products/foodavailability-per-capita-data-system>. (Consultado el 2 de febrero de 2020).

Van Der Linden, I., Cottyn, B., Uyttendaele, M., Berkvens, N., Vlaemynck, G., Heyndrickx, M., & Maes, M. (2014). Enteric pathogen survival varies substantially in irrigation water from Belgian lettuce producers. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(10), 10105-10124.

Vanegas, J. A. G., Blair, G. H. G., & Vergara, A. F. (2010). Manual de procesamiento y conservación de lechugas (*Lactuca sativa* L.) variedades verde y morada crespa mínimamente procesadas. *Fundación Universitaria Agraria de Colombia (Uniagraria)*.

Vázquez-Garcidueñas, M. S., Romero-Perez, N. L., Figueroa-Aguilar, G. A., Jaime-Sanchez, J. L. & Vazquez-Marrufo, G. (2014) Investigation of a food-borne *Salmonella* Oranienburg outbreak in a Mexican prison. *Journal Infection*, 8 (2), 143–153.

Wang, L., Liu, F., Jiang, Y., Chai, Z., Li, P., Cheng, Y., & Leng, X. (2011). Synergistic antimicrobial activities of natural essential oils with chitosan films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (23), 12411-12419.

Worthington, R. J., J. J. Richards, & C. Melander. (2012). Small molecule control of bacterial biofilms. *Organic Biomolecular Chemistry*, 10 (37), 7457-7474. <https://doi.org/10.1039/c2ob25835h>.

Youcef-Ettoumi K, Zouambia Y, Moulai-Mostefa N. (2020). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Algerian Citrus sinensis essential oil extracted by hydrodistillation assisted by electromagnetic induction heating. *Journal of Food Science and Technology*. 2020;1(1):1-7. [Consultado el 03 de Febrero del 2021].

Xylia, P., Chrysargyris, A., Botsaris, G., Skandamis, P., & Tzortzakos, N. (2022). *Salmonella Enteritidis* survival in different temperatures and nutrient solution pH levels in hydroponically grown lettuce. *Food Microbiology*, 102, 103898.

Zhang, G Y. Chen, L. Hu. (2018). Survey of foodborne patógenos, recuentos aeróbicos en placa, recuentos totales de coliformes y *Escherichia coli* cuenta en verduras de hoja verde, brotes y melones comercializados en los Estados Unidos. *Revista de protección alimentaria*, 81 (3), 400–411.

Zhong, W., Chen, K., Yang, L., Tang, T., Jiang, S., Guo, J. y Gao, Z. (2022). Aceites esenciales de Citrus unshiu Marc. Mata eficazmente a *Aeromonas hydrophila* destruyendo la integridad de la membrana celular, influyendo en el potencial celular y filtrando sustancias intracelulares. *Fronteras en Microbiología* , 13 , 869953.

