

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**"EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ONDAS DE CHOQUE  
SOBRE LA VIABILIDAD DE UNA CEPA ÁCIDO-RESISTENTE DE  
*Listeria monocytogenes* EN SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA Y  
JUGO DE NARANJA"**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**ALMA DELIA BARAJAS ZAMORA**

**DIRIGIDA POR**

**M. en C. ULISES MORA ÁLVAREZ**

A handwritten signature in black ink, appearing to be the initials "U. M. A." followed by a stylized flourish.

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2004.**

**BIBLIOTECA CENTRAL UAQ**  
"ROBERTO RUIZ OBREGÓN"



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**"EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ONDAS DE CHOQUE  
SOBRE LA VIABILIDAD DE UNA CEPA ÁCIDO-RESISTENTE DE  
*Listeria monocytogenes* EN SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA Y  
JUGO DE NARANJA"**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**ALMA DELIA BARAJAS ZAMORA**

**DIRIGIDA POR**

**M. en C. ULISES MORA ÁLVAREZ**

**SINODALES**

**M. en C. ULISES MORA ÁLVAREZ**  
DIRECTOR

---

**Dr. ACHIM MAX LOSKE MEHLING**  
SINODAL

---

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

---

**M. en C. BEATRIZ ÁLVAREZ MAYORGA**  
SINODAL

---

No Adq H68861  
No. Título TS  
Clas. 579.37  
B224e

## RESUMEN

En este trabajo se evaluó el efecto de la aplicación de ondas de choque sobre la viabilidad de una cepa ácido resistente de *Listeria monocytogenes*, suspendida en solución salina isotónica y en jugo de naranja, con el objetivo de utilizar comercialmente la aplicación de ondas de choque como un método no térmico para la conservación de alimentos. Existen pocos estudios que evalúen el efecto bactericida de las ondas de choque. Los existentes se limitan a bacterias suspendidas en solución salina y no hay estudios hechos con *Listeria monocytogenes*. En este trabajo, las ondas de choque se generaron por rompimiento eléctrico, utilizando un generador electrohidráulico, MEXILIT II. Se hicieron ensayos para evaluar el efecto del número de ondas de choque aplicadas, el nivel de cavitación, la luz producida por la descarga eléctrica y la fase de crecimiento celular del microorganismo, sobre la viabilidad de una cepa de *L. monocytogenes*, suspendida en solución salina isotónica. Se evaluó el efecto del número de choques aplicados, el nivel de cavitación, la luz producida por la descarga eléctrica, el tipo de reflector elipsoidal y dos niveles de inóculo sobre la viabilidad de células en fase estacionaria de una cepa ácido resistente de *L. monocytogenes* suspendida en solución salina isotónica y jugo de naranja. Los resultados mostraron disminución logarítmica en las células suspendidas en solución salina isotónica debido a las interacciones dobles. Existe evidencia del efecto bactericida de la luz UV que se produce al generar la onda de choque y del daño a nivel celular que ocasiona la cavitación acústica. Probablemente esto sea la causa de la disminución celular en el tratamiento con ondas de choque. En jugo de naranja la inactivación fue nula. Es posible que los pigmentos del jugo absorbieron la luz generada en la descarga eléctrica que produce a la onda de choque y/o que los componentes del jugo que protegieron a la *Listeria* del efecto de la onda de choque.

La presente investigación se realizó como una co-dirección entre el M. en C. Ulises Mora Álvarez y el Dr. Achim Max Loske Mehling en el Laboratorio de Ondas de Choque del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM con apoyo económico del Proyecto DGAPA-UNAM IN 101202.

A mis padres Rubén y Elodia con todo mi amor, porque me brindaron la oportunidad de superarme personal y profesionalmente, por su amor, comprensión, por creer en mi, por ayudarme a superar los tropiezos del camino, por estar aquí conmigo compartiendo este logro.

A mi hermano Rubén, por su apoyo y cariño, por ofrecerme su compañía y consejos en esta etapa de mi vida.

Agradezco sinceramente:

A Ulises Mora Álvarez por haberme invitado a participar en este proyecto, por su ayuda en la dirección y elaboración de mi tesis.

Al Dr. Achim Max Loske Mehling por abrirme las puertas de su laboratorio, por su amabilidad y disposición a ayudar.

A mis compañeras Maltie Cabello y especialmente a Claudia Herrera por su apoyo y por haber compartido esfuerzos en este trabajo.

A Francisco Fernández E. y Arturo Méndez R. por su interés y ayuda en la parte técnica del Mexilit II.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b><u>RESUMEN</u></b>	
<b><u>ÍNDICE GENERAL</u></b>	i
<b><u>ÍNDICE DE CUADROS</u></b>	v
<b><u>ÍNDICE DE FIGURAS</u></b>	vii
<b>1. <u>INTRODUCCIÓN</u></b>	1
<b>2. <u>ANTECEDENTES</u></b>	2
2.1 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS	2
2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	5
2.2.1 CLASIFICACIÓN DEL GÉNERO <i>Listeria</i>	5
2.2.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES	5
2.2.2.1 ÁCIDO RESISTENCIA	7
2.2.3 LISTERIOSIS	9
2.2.4 INCIDENCIA DE <i>Listeria monocytogenes</i>	12
2.2.5 CONTROL DE <i>Listeria monocytogenes</i>	14
2.3 JUGOS DE FRUTA	15
2.3.1 JUGO DE NARANJA	16
2.3.1.1 FLORA ASOCIADA AL JUGO DE NARANJA	17
2.3.1.2 BROTES ASOCIADOS AL CONSUMO DE JUGO DE NARANJA SIN PASTEURIZAR	19
2.4 MÉTODOS PARA LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS	19
2.4.1 MÉTODOS NO TÉRMICOS PARA LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS	22
2.4.1.1 PRESIÓN HIDROSTÁTICA ELEVADA	22
2.4.1.2 CAMPOS ELÉCTRICOS PULSADOS	24
2.4.1.3 IRRADIACIÓN IONIZANTE	27
2.4.1.4 LUZ ULTRAVIOLETA	30
2.4.1.5 ONDAS DE CHOQUE	33



<b>3. <u>JUSTIFICACIÓN</u></b>	39
<b>4. <u>OBJETIVOS</u></b>	41
4.1 OBJETIVO GENERAL	41
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
<b>5. <u>METODOLOGÍA Y MATERIALES</u></b>	42
5.1 MATERIALES	42
5.1.1 MATERIALES BIOLÓGICOS	42
5.1.2 GENERADOR DE ONDAS DE CHOQUE	42
5.2 METODOLOGÍA	43
5.2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO 1	43
5.2.1.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS	43
5.2.1.2 ESTUDIO DEL EFECTO DEL NÚMERO DE CHOQUES APLICADOS, LA CAVITACIÓN, LA LUZ PRODUCIDA POR LA DESCARGA ELÉCTRICA Y LA FASE DE CRECIMIENTO SOBRE LA VIABILIDAD DE UNA CEPA DE <i>Listeria monocytogenes</i> , SUSPENDIDA EN SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA	45
5.2.1.3 DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA TÉRMICA	47
5.2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO 2	48
5.2.2.1 INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A LA RIFAMPICINA	48
5.2.2.2 INDUCCIÓN A LA ÁCIDO RESISTENCIA	48
5.2.2.3 ESTUDIO DEL EFECTO DEL NÚMERO DE CHOQUES APLICADOS, LA CAVITACIÓN, LA LUZ PRODUCIDA POR LA DESCARGA ELÉCTRICA Y EL TIPO DE REFLECTOR SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS EN FASE ESTACIONARIA DE UNA CEPA ÁCIDO RESISTENTE Y RESISTENTE A RIFAMPICINA DE <i>Listeria monocytogenes</i> , SUSPENDIDA EN SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA	49
5.2.3 OBJETIVO ESPECÍFICO 3	51
5.2.3.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS	51
5.2.3.2 DETERMINACIÓN DE LA FLORA NATIVA DEL JUGO DE NARANJA	51

5.2.3.3 OBTENCIÓN DEL JUGO DE NARANJA	52
5.2.3.4 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL JUGO FRESCO	52
5.2.3.5 ESTUDIO DEL EFECTO DEL NÚMERO DE CHOQUES APLICADOS, LA CAVITACIÓN, LA LUZ PRODUCIDA POR LA DESCARGA ELÉCTRICA Y EL NIVEL DE INÓCULO SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS EN FASE ESTACIONARIA DE UNA CEPA ÁCIDO RESISTENTE Y RESISTENTE A RIFAMPICINA DE <i>Listeria monocytogenes</i> , SUSPENDIDA EN JUGO DE NARANJA	52
<b>6. RESULTADOS</b>	55
6.1 OBJETIVO ESPECÍFICO 1	55
6.1.1 ESTUDIO DEL EFECTO DEL NÚMERO DE CHOQUES APLICADOS, LA CAVITACIÓN, LA LUZ PRODUCIDA POR LA DESCARGA ELÉCTRICA Y LA FASE DE CRECIMIENTO SOBRE LA VIABILIDAD DE UNA CEPA DE <i>Listeria monocytogenes</i> , SUSPENDIDA EN SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA	55
6.1.2 RESISTENCIA TÉRMICA	59
6.2 OBJETIVO ESPECÍFICO 2	65
6.2.1 INDUCCIÓN DE LA ÁCIDO RESISTENCIA	65
6.2.2 ESTUDIO DEL EFECTO DEL NÚMERO DE CHOQUES APLICADOS, LA CAVITACIÓN, LA LUZ PRODUCIDA POR LA DESCARGA ELÉCTRICA Y EL TIPO DE REFLECTOR SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS EN FASE ESTACIONARIA DE UNA CEPA ÁCIDO RESISTENTE Y RESISTENTE A RIFAMPICINA DE <i>Listeria monocytogenes</i> , SUSPENDIDA EN SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA	65
6.3 OBJETIVO ESPECÍFICO 3	77
6.3.1 ESTUDIO DEL EFECTO DEL NÚMERO DE CHOQUES APLICADOS, LA CAVITACIÓN, LA LUZ PRODUCIDA POR LA DESCARGA ELÉCTRICA Y EL NIVEL DE INÓCULO SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS EN FASE ESTACIONARIA DE UNA CEPA ÁCIDO RESISTENTE Y RESISTENTE A RIFAMPICINA DE <i>Listeria</i>	

<i>monocytogenes</i> , SUSPENDIDA EN JUGO DE NARANJA	77
<b>7. <u>DISCUSIÓN</u></b>	83
7.1 OBJETIVO ESPECÍFICO 1	83
7.1.1 ESTUDIO DEL EFECTO DEL NÚMERO DE CHOQUES APLICADOS, LA CAVITACIÓN, LA LUZ PRODUCIDA POR LA DESCARGA ELÉCTRICA Y LA FASE DE CRECIMIENTO SOBRE LA VIABILIDAD DE UNA CEPA DE <i>Listeria monocytogenes</i> , SUSPENDIDA EN SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA	83
7.1.2 RESISTENCIA TÉRMICA	85
7.2 OBJETIVO ESPECÍFICO 2	86
7.2.1 INDUCCIÓN DE LA ÁCIDO RESISTENCIA	86
7.2.2 ESTUDIO DEL EFECTO DEL NÚMERO DE CHOQUES APLICADOS, LA CAVITACIÓN, LA LUZ PRODUCIDA POR LA DESCARGA ELÉCTRICA Y EL TIPO DE REFLECTOR SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS EN FASE ESTACIONARIA DE UNA CEPA ÁCIDO RESISTENTE Y RESISTENTE A RIFAMPICINA DE <i>Listeria monocytogenes</i> , SUSPENDIDA EN SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA	86
7.3 OBJETIVO ESPECÍFICO 3	87
7.3.1 ESTUDIO DEL EFECTO DEL NÚMERO DE CHOQUES APLICADOS, LA CAVITACIÓN, LA LUZ PRODUCIDA POR LA DESCARGA ELÉCTRICA Y EL NIVEL DE INÓCULO SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS EN FASE ESTACIONARIA DE UNA CEPA ÁCIDO RESISTENTE Y RESISTENTE A RIFAMPICINA DE <i>Listeria monocytogenes</i> , SUSPENDIDA EN JUGO DE NARANJA	87
<b>8. <u>CONCLUSIONES</u></b>	88
<b>9. <u>PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES</u></b>	89
<b>10. <u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	90

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
1. Enfermedades, hospitalizaciones y muertes causadas por la ingestión de alimentos contaminados con bacterias en Estados Unidos. 1983 a 1992.	4
2. Manifestaciones de listeriosis de acuerdo al grupo de la población.	11
3. Composición del jugo de naranja (100 g).	18
4. Brotes asociados al consumo de jugo de naranja sin pasteurizar.	20
5. Diseño experimental del objetivo 1.	46
6. Diseño experimental del objetivo 2.	50
7. Diseño experimental del objetivo 3.	54
8. Diseño experimental e inactivación logarítmica lograda en el objetivo 1.	56
9. ANDEVA de la inactivación logarítmica de <i>L. monocytogenes</i> para el objetivo 1.	57
10. Disminución logarítmica de <i>L. monocytogenes</i> después de la aplicación de los tratamientos correspondientes al objetivo 1.	60
11. Valores <i>D</i> (min) en solución salina isotónica para <i>Listeria monocytogenes</i> .	62
12. Resultados de la cuenta viable de <i>L. monocytogenes</i> después del choque térmico.	63
13. Resultados de la inducción a la ácido resistencia de <i>Listeria monocytogenes</i> , suspendida en CSTEEL acidificado con ácido cítrico a pH 5 y 5.8.	67
14. Diseño experimental e inactivación logarítmica lograda en el objetivo 2.	69
15. ANDEVA de la inactivación logarítmica de <i>L. monocytogenes</i> en el objetivo 2.	71
16. Disminución logarítmica de <i>L. monocytogenes</i> después de la aplicación de los tratamientos correspondientes al objetivo 2.	75
17. Diseño experimental e inactivación logarítmica lograda en el objetivo 3.	78

18. ANDEVA de la inactivación logarítmica de <i>L. monocytogenes</i> en el objetivo 3.	79
19. Disminución logarítmica de <i>L. monocytogenes</i> después de la aplicación de los tratamientos correspondientes al objetivo 3.	80
20. Análisis microbiológico del jugo de naranja fresco.	82

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Región de la radiación UV en el espectro electromagnético.	32
2. Generación electrohidráulica de la onda de choque.	34
3. Diagrama de reflexión de rayos en un elipsoide truncado.	36
4. Perfil de presión de una onda de choque.	38
5. Esquema del generador electrohidráulico de ondas de choque MEXILIT II.	44
6. Inactivación logarítmica estimada debida a la interacción entre la luz generada por la descarga eléctrica y el nivel de cavitación.	58
7. Medias de la inactivación logarítmica de <i>L. monocytogenes</i> después de la aplicación de los tratamientos en el objetivo 1, en función del número de ondas de choques aplicadas y de la fase de crecimiento, el nivel de cavitación y el paso de la luz generada por la descarga eléctrica.	61
8. Inactivación térmica de <i>Listeria monocytogenes</i> a 50, 55 y 60° C, suspendida en solución salina isotónica.	64
9. Comportamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> durante la Inducción de la ácido resistencia en caldo soya tripticasa acidificado con ácido cítrico a pH 5 y 5.8, respecto del tiempo.	66
10. Medias de la inactivación logarítmica de <i>L. monocytogenes</i> , después de la inducción a la ácido resistencia, en función del tiempo y del pH (5, 5.8 y 7.0).	68
11. Inactivación logarítmica estimada debida a la interacción entre el reflector utilizado (E3 o E4) y la luz generada por la descarga eléctrica.	72
12. Inactivación logarítmica estimada debida a la interacción entre el reflector utilizado (E3 o E4) y el nivel de cavitación en los viales.	73
13. Inactivación logarítmica estimada debida a la interacción entre el reflector utilizado (E3 o E4) y el número de ondas de choque aplicadas.	74
14. Medias de la inactivación logarítmica de <i>L. monocytogenes</i> después	

de la aplicación de los tratamientos en el objetivo 2, en función del número de ondas de choques aplicadas y el tipo de reflector, el nivel de cavitación y el paso de la luz generada por la descarga eléctrica. 76

15. Medias de la inactivación logarítmica de *L. monocytogenes* después de la aplicación de los tratamientos en el objetivo 3, en función del número de ondas de choques aplicadas y el nivel de inóculo y el paso de la luz generada por la descarga eléctrica. 81

## 1. INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud, *Listeria monocytogenes* se ha visto asociada a brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. *Listeria* tiene mecanismos genéticos y fisiológicos que le confieren la habilidad de desarrollar ácido resistencia, adaptándose y proliferando en los alimentos ácidos. Por esto puede sobrevivir en el jugo de naranja, representando un riesgo para el consumidor, dado el alto consumo de este alimento. Por todos los beneficios a la salud, el jugo de naranja se ha convertido en parte esencial en la dieta del ser humano, aumentando el consumo del jugo recién obtenido. Tradicionalmente, se asegura la calidad sanitaria del jugo de naranja con tratamientos térmicos, sin embargo, esto produce modificaciones en el color, la consistencia y el sabor del jugo. Los tratamientos no térmicos pueden evitar algunos de estos inconvenientes, ofreciendo un producto con apariencia más cercana a la del producto fresco.

El MEXILIT II es un generador electrohidráulico capaz de generar ondas de choque por rompimiento eléctrico entre dos electrodos sumergidos en agua. Las ondas de choque se han aplicado en la litotricia extracorporal para el tratamiento no invasivo de cálculos renales y biliares. El daño a los tejidos, observado durante la aplicación del tratamiento clínico y el efecto destructivo del ultrasonido sobre células bacterianas, condujeron a la idea de aplicar ondas de choque como un método no térmico de conservación de alimentos. Se desconoce el mecanismo de inactivación de bacterias por ondas de choque. Probablemente, algunos factores de influencia son la radiación visible y ultravioleta producida por la descarga eléctrica de alto voltaje utilizada para generar la onda de choque, además de la cavitación generada por el paso de la onda de choque. Este trabajo, tiene como objetivo evaluar el efecto de la aplicación de ondas de choque sobre la viabilidad de una cepa de *Listeria monocytogenes* y una cepa ácido resistente de *L. monocytogenes* suspendida en solución salina isotónica y en jugo de naranja, como nuevo método no térmico de conservación de alimentos.



## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS**

Los alimentos frescos e inocuos son una necesidad humana. Las enfermedades transmitidas por alimentos tienen consecuencias en la salud, la política y la economía (Fernández, 2000; Loaharanu, 2001). Se conocen más de 200 enfermedades que son transmitidas por alimentos. En Estados Unidos, se estima que se originan entre 6 y 81 millones de casos y 9,000 muertes cada año por estas causas (Mead y *col.*, 1999). Las enfermedades transmitidas por alimentos se manifiestan con una variedad de condiciones clínicas: gastrointestinales, respiratorias y patofisiológicas (Lindsay, 1997; Mead y *col.*, 1999). Se estima que anualmente ocurren 1,500 millones de casos de diarrea en el mundo y el 70% se debe a contaminación química o biológica de los alimentos comercializados (Hernández, 1999).

El alimento actúa como vehículo de agentes patógenos para el hombre en un papel activo o pasivo. En el primer caso, el alimento transmite microorganismos en desarrollo, o bien, productos de su metabolismo, como pueden ser sus toxinas. El alimento como papel pasivo, es vehículo de bacterias que no están en desarrollo, virus, parásitos, toxinas biológicamente estables o metales (Lindsay, 1997). Los microorganismos tienen acceso a los alimentos a través de diferentes fuentes y mecanismos. Pueden sobrevivir en el alimento, modificando o no, las características sensoriales de este (Fernández, 2000).

Algunos de los factores que contribuyen al aumento de las enfermedades transmitidas por alimentos son:

- Cambios demográficos: debido a las grandes distribuciones geográficas de la población, se requiere mayor tiempo de entrega del alimento.

- Cambios en la dieta: debido a las modas en la alimentación, como el aumento en el consumo de frutos y vegetales crudos, así como jugos sin pasteurizar.
- Tecnología e industria: aumento en la manipulación durante la elaboración del producto.
- Viajes internacionales y de comercio: los viajeros pueden contaminarse con patógenos poco comunes en su país, complicando el diagnóstico, porque los síntomas empiezan cuando regresan a casa.
- Velocidad de los sistemas modernos de transporte: en un día el alimento producido en un país se puede consumir en otros países.
- Aumento en el consumo de alimentos en restaurantes de comida rápida y las barras de ensaladas.
- Refrigeración inapropiada de los alimentos.
- Adaptación microbiana a factores estresantes

(Altekruse y col., 1997; Sheridan y McDowell, 1998; Hernández, 1999; Burnett y Beuchat, 2001; Loaharanu, 2001).

Estudios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), han demostrado que anualmente entre el 5 y 10% de la población se ve afectada por el consumo de alimentos contaminados con patógenos. Los principales patógenos que suelen encontrarse en los alimentos son *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Toxoplasma gondii* (Hernández, 1999). El Cuadro 1 es una estimación de las enfermedades, hospitalizaciones y muertes causadas por la ingestión de alimentos contaminados con bacterias en Estados Unidos de 1983 a 1992.

**Cuadro 1.** Enfermedades, hospitalizaciones y muertes causadas por la ingestión de alimentos contaminados con bacterias en Estados Unidos. 1983 a 1992.

<b>Bacterias</b>	<b>Enfermedades</b>	<b>Hospitalizaciones</b>	<b>Muertes</b>
<i>Bacillus cereus</i>	27,360	8	0
<i>Clostridium botulinum</i>	58	46	4
<i>Brucella</i> spp.	777	61	6
<i>Campylobacter</i> spp.	1,963,141	10,539	99
<i>Clostridium perfringens</i>	248,520	41	7
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	62,458	1,843	52
<i>E. coli</i> , no-O157 STEC	31,229	921	26
<i>E. coli</i> , enterotoxigénica	55,594	15	0
<i>E. coli</i> , otra diarreogénica	23,826	6	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,493	2,298	499
<i>Salmonella typhi</i>	659	494	3
<i>Salmonella</i> , spp.	1,341,873	15,608	553
<i>Shigella</i> spp.	89,648	1,246	14
<i>Staphylococcus</i> spp.	185,060	1,753	2
<i>Streptococcus</i> spp.	50,920	358	0
<i>Vibrio cholerae</i>	49	17	0
<i>V. vulnificus</i>	47	43	18
<i>Vibrio</i> , spp	5,122	65	13
<i>Yersinia enterocolitica</i>	86,731	1,105	2
<b>Total</b>	<b>4,175,565</b>	<b>36,467</b>	<b>1,298</b>

(Modificado: Mead y col., 1999)

## **2.2 *Listeria monocytogenes***

### **2.2.1 CLASIFICACIÓN DEL GÉNERO *Listeria***

En la novena edición (1986) del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática, se enlistan 8 especies dentro del género *Listeria*: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. denitrificans*, *L. murrayi* y *L. grayi*. Esta clasificación se mantiene vigente (Pérez, 1998; Fernández, 2000). Dentro del género *Listeria*, sólo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son consideradas patógenas y *L. ivanovii* principalmente se relaciona con enfermedad en animales (Swaminathan, 2001). Existen 13 serotipos de *L. monocytogenes* que pueden causar enfermedad (Swaminathan, 2001). En los brotes de listeriosis asociados al consumo de alimentos, el número de enfermedades se limita a cierto número de serotipos: 1/2a (15 a 25%), 1/2b (10 a 35%), 1/2c (0 a 4%), 3 (1 a 2%), 4b (37 a 64%) y 4 no b (0 a 6%) (Buchanan y Lindqvist, 2000).

### **2.2.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES**

*Listeria monocytogenes* es un bacilo corto, Gram positivo, a veces calificado de cocoide y corineforme, de 1.2 x 0.5 µm (Fernández, 2000). No forma esporas ni cápsulas. *Listeria* es clasificada como microorganismo mesófilo de rápido desarrollo, con temperatura mínima de desarrollo muy baja (-1.5° C), siempre y cuando la incubación sea continua por varias semanas (Galdiero y col., 1997; Pérez, 1998; Te Giffel y Zwietering, 1999). Su movilidad depende de la temperatura de incubación: a 30° C es móvil, a 37° C se atrofian sus flagelos y aparecen como uno solo. La mayor movilidad se da entre 20° y 25° C (Pérez, 1998; Buchanan y Lindqvist, 2000; Fernández, 2000). Es un microorganismo anaerobio facultativo que se favorece con bajas concentraciones de oxígeno (Buchanan y Lindqvist, 2000). En anaerobiosis estricta no desarrolla. El CO<sub>2</sub> puede inhibir su desarrollo, dependiendo del substrato y de la temperatura de incubación (Fernández, 2000).

*L. monocytogenes* puede tomar apariencia filamentosa, hasta de 55  $\mu\text{m}$ , en concentraciones altas de NaCl (8 a 9%), puede desaparecer el efecto si se transfiere al microorganismo a un medio libre de sal después de incubarse por 24 horas (Galdiero y col., 1997; Fernández, 2000). A temperatura ambiente *L. monocytogenes* sobrevive en sal pura por lo menos 150 días y en soluciones con 0.85% de sal sobrevive 545 días (Galdiero y col., 1997). A pH menores de 5.0 o superiores a 9.0 se pueden formar filamentos como mecanismo de adaptación (Fernández, 2000).

En el laboratorio se cultiva en Caldo Soya Trypticasa (CST), adicionado con extracto de levadura al 0.5%, alcanzando en menos de 18 horas una densidad de  $10^9$  unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) (Fernández, 2000). Los factores ecológicos más importantes para el desarrollo de *Listeria* en los alimentos son la temperatura, el pH, la Actividad de agua (Aa) y la concentración de oxígeno (Pérez, 1998). La temperatura mínima para el desarrollo de *Listeria* es  $-1.5^\circ\text{C}$  (Te Giffel y Zwietering, 1999). A temperaturas inferiores la bacteria se inactiva. En almacenamiento a temperaturas de congelación, su supervivencia depende del substrato y del índice de congelamiento. La temperatura óptima para su desarrollo es a  $37^\circ\text{C}$  y la temperatura máxima es a  $45^\circ\text{C}$ . A temperaturas mayores de  $50^\circ\text{C}$  se inactiva el microorganismo (Swaminathan, 2001).

*L. monocytogenes* al ser un microorganismo Gram positivo, tolera valores de Aa más bajos que los microorganismos Gram negativos, debido a la composición de su pared celular (Pérez, 1998; Fernández, 2000). Existen reportes que indican que el microorganismo puede desarrollarse con Aa cercana a 0.93 (Fernández, 2000). A valores menores de Aa 0.83, sólo puede sobrevivir por largos periodos (Swaminathan, 2001). *L. monocytogenes* es capaz de desarrollarse en presencia de NaCl de 10 a 12%, siendo mayor el desarrollo a concentraciones de 6.5% de NaCl (Swaminathan, 2001).

### 2.2.2.1 ÁCIDO RESISTENCIA

A comparación de los organismos superiores, los microorganismos poseen mecanismos genéticos y fisiológicos que les confieren la capacidad de sobrevivir y adaptarse a la acción de agentes que comprometen su viabilidad (McMeekin y *col.*, 1997; Rowan, 1999; Rowbury y Goodson, 1999; Fernández, 2000). El pH afecta la capacidad para sobrevivir o multiplicarse de los microorganismos (Fernández, 2000). De acuerdo a su capacidad de adaptación, los microorganismos pueden sobrevivir o mantenerse activos en el ambiente. Cuando el microorganismo se expone a condiciones de estrés leves (por ejemplo, acidez no letal de pH 5.0), sufre un proceso de adaptación en el que desarrolla tolerancia o resistencia a efectos más intensos del factor estresante (por ejemplo, pH 3.0). Los mecanismos de protección intracelulares se inducen cuando la célula entra en fase estacionaria, o bien, en respuesta a un estímulo ambiental, activando enzimas que regulan cambios en la expresión genética (McMeekin y *col.*, 1997; Rowan, 1999; Rowbury y Goodson, 1999; Fernández, 2000).

Durante la fase estacionaria, la bacteria se encuentra en estado latente (McMeekin y *col.*, 1997). Al inicio de esta fase se induce la síntesis de las proteínas protectoras (que dan resistencia a varios cambios físicos y químicos) codificadas por el gen *rpoS* (Rowan, 1999), que tiene un factor sigma (sigma  $\sigma^B$ ) específico para esta fase (Dykes y Moorhead, 2000). El factor sigma regula la síntesis de las proteínas responsables de la resistencia a los factores estresantes (Gahan y Hill, 1999). Durante la fase de adaptación ácida (a pH moderados) varía la composición de los ácidos grasos de la membrana y se induce la síntesis de proteínas (Saklani-Jusforgues y *col.*, 2000; Hill y *col.*, 2002).

El estrés ácido es ocasionado por la combinación del efecto biológico del pH bajo y los ácidos orgánicos débiles que se presentan en el ambiente. Dentro de los ácidos orgánicos débiles se incluyen ácidos grasos volátiles como butarato, propionato y acetato que se generan en la fermentación. Los ácidos débiles

adquiere resistencia a la acidez a la mitad de la fase exponencial (Phan-Thanh y col., 2000).

Ejemplos de la sobrevivencia de *L. monocytogenes* debido a su ácido resistencia son: el yogur (ácido láctico) a pH 3.8, el requesón (ácido láctico) a pH 4.7, jugo de naranja (ácido cítrico) a pH 3.6, en la preparación de ensaladas (ácido acético) a pH 3.0, en jugo de tomate a pH de 4.1 durante 15 días a 5° C; en jugo de manzana sobrevive a pH de 3.78 y en una mezcla de sidra manzana/frambuesa sobrevive a pH de 3.75, aún manteniendo la sidra en refrigeración (Roering y col., 1999; Rowan, 1999). Por la habilidad de sobrevivir a bajos pH, la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) fija como objetivo eliminar *L. monocytogenes* en jugos de frutas y vegetales, incluyendo la sidra (Roering y col., 1999).

### 2.2.3 LISTERIOSIS

A principios de los ochentas, se reconoció a *Listeria monocytogenes* como un patógeno transmisible al hombre a través de los alimentos (Altekruse y col., 1997). De acuerdo a lo observado en los brotes, la incubación oscila entre 1 y varias semanas. Debido a su amplia ubicuidad, el microorganismo es ingerido por el hombre todos los días (Fernández, 2000). No todos los individuos de la población son igualmente susceptibles a los patógenos y no todas las exposiciones a los patógenos en alimentos resultan en infecciones o en enfermedades, por lo menos no con manifestaciones clínicas (Fernández, 2000; Lammerding y Fazil, 2000). *L. monocytogenes* afecta a los sectores más susceptibles de la población, como son las mujeres embarazadas, sus fetos, los lactantes, los ancianos, los inmunodeprimidos por medicación con corticosteroides, drogas citotóxicas o por cualquier causa, también, quienes son tratados por padecimientos crónicos como: alcoholismo, diabetes, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), cardiopatías; enfermedades hematológicas malignas como: leucemia, linfoma,

mieloma, personas con trasplantes de órganos y pacientes con dolencias hepáticas (Fernández, 2000; Swaminathan, 2001).

La enfermedad se manifiesta de diversas maneras, puede ser asintomática o bien asociarse con malestar general, náusea, diarrea y fiebre ligera. El Cuadro 2 muestra las formas de manifestación de la listeriosis de acuerdo al grupo de la población. En ocasiones se puede presentar la listeriosis cutánea, oculoglandular, granulomatosis séptica, la cervicoglandular y localizadas en forma de abscesos (Fernández, 2000). En Estados Unidos, se reporta que más del 40% de los casos de listeriosis terminan fatalmente (Altekruse y col., 1997).

*L. monocytogenes* es responsable de severas infecciones en animales y humanos (Galdiero y col., 1997). El mecanismo por el cual la bacteria causa enfermedad es muy complejo (Pérez, 1998), pero se sabe que sigue los siguientes pasos:

- a) Penetración al huésped: se ingieren las células a través de los alimentos (Pérez, 1998; Buchanan y col., 2000).
- b) Sobrevivencia y multiplicación dentro del huésped: las células se localizan específicamente a lo largo del aparato gastrointestinal adhiriéndose a la mucosa intestinal (o por otro mecanismo) para evitar su eliminación debido a la peristalsis, y poder situarse en la corriente sanguínea (Brooks y col., 1996; Pérez, 1998; Buchanan y col., 2000).
- c) Invasión del tejido: infectando inicialmente células epiteliales del intestino (gastroenteritis) o el órgano apropiado (septicemia). *L. monocytogenes* es capaz de penetrar varios tipos de células, puede invadir y multiplicarse en células no fagocíticas y en macrófagos. Los tejidos son invadidos y dañados por los factores de virulencia, que son una o más hemolisinas y ciertos componentes de la pared o de la membrana celular. Específicamente, se identifica la listeriolisina O, como hemolisina responsable (Brooks y col., 1996; Pérez, 1998; Buchanan y col., 2000).



**Cuadro 2.** Manifestaciones de listeriosis de acuerdo al grupo de la población.

<b>GRUPO</b>	<b>MANIFESTACIONES</b>
Fetos (neonatal)	La infección puede ser transplacentaria u ocurrir durante el parto. Se caracteriza por trastornos respiratorios y circulatorios con falla cardiaca, cianosis, vómito y convulsiones. Complicaciones en hidrocefalo, retardo mental, meningitis. Aparecen nódulos en diversas vísceras y granulomas en la parte posterior de la faringe.
Recién nacidos	Ocasionalmente se observa un curso fulminante.
Mujeres embarazadas	Fiebre, escalofríos, cefalea, faringitis, pielitis. En la forma típica de septicemia y fiebre, faringitis y un cuadro similar a la mononucleosis infecciosa. En embarazadas puede llevar al aborto.
Adultos	Inicialmente se manifiesta con fiebre, cefalea y malestar general, seguido de dolor muscular, rigidez de cuello, náusea, vómito, fotofobia y puede terminar en somnolencia, convulsiones, deshidratación y coma. En casos severos progresa con meningitis, septicemia, endocarditis y/o encefalitis. En personas mayores a 50 años ocasionalmente se observa un curso fulminante.

(Fernández, 2000)

Es difícil establecer la dosis infectante mínima de *L. monocytogenes* para el humano, generalmente en alimentos, se estima que con unos cuantos miles o varios cientos de células se puede originar la enfermedad, aunque existen reportes donde se observan valores menores (0.3 UFC/g) que producen infección (Buchanan y Lindqvist, 2000; Fernández, 2000; Swaminathan, 2001). Esto depende del estado inmunológico del huésped y su exposición a alimentos contaminados (Swaminathan, 2001). En pacientes sin tratamiento, o cuando éste se aplica tardíamente, la enfermedad tiene un curso fulminante (letalidad de 70%). Los factores que pueden influenciar en la virulencia del patógeno son el serotipo (el 1 y 4 son más invasivos, principalmente el 4b), el aspecto liso de la colonia, la producción de hemolisina y de radicales superóxidos y los componentes de la pared celular (Fernández, 2000).

El medicamento de primera elección contra la listeriosis es una mezcla de una parte de trimetoprim y cinco partes de sulfametoxazol y como medicamento alternativo está la ampicilina con o sin aminoglucósido (gentamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina) que se seleccionan en base a los patrones locales de susceptibilidad. En las clínicas se aplica penicilina más eritromicina (aminoglucósido) y trimetoprim con sulfametoxazol intravenoso (Brooks y col., 1996).

#### **2.2.4 INCIDENCIA DE *Listeria monocytogenes***

Las fuentes de contaminación microbiana en los alimentos son muy variadas. Existe una amplia diseminación de microorganismos en el ambiente y se dificulta encontrar productos o materiales libres de microorganismos, ya sea en desarrollo o en condición viable sin mostrar signos de actividad. Los productos libres de microorganismos son los que han recibido tratamiento antimicrobiano severo, o productos que por su naturaleza y estructura no suelen ser contaminados, como por ejemplo, el huevo (Fernández, 2000).

Los alimentos que se han visto involucrados en brotes de listeriosis son los elaborados a base de leche cruda, con leche pasteurizada inadecuadamente y productos a base de leche pasteurizada que se ha contaminado durante el proceso de elaboración, como son: leche, leches con saborizantes, mantequilla, quesos (de cabra, de oveja, suaves tipo mexicano, de pasta blanda, suaves, semisuaves y madurados), helados. También se ha aislado *L. monocytogenes* de alimentos como pescados ahumados (ahumados en frío y en caliente), productos marinados o ligeramente salados (caviar, camarón cocinado curado en salmuera, arenques), los granos germinados, carnes crudas, la charcutería cruda y charcutería cocinada pero consumida sin calentar (paté, lengua de puerco en jalea, salami), aceitunas en vinagre, ensalada de repollo, col, lechuga, los moluscos con concha, ensalada de atún, legumbres y verduras crudas y en champiñones (Altekruse y col., 1977; Galdiero y col., 1997; Buchanan y Lindqvist, 2000; Huss y col., 2000).

*Listeria monocytogenes* subsiste como saprófito en la tierra (cultivada y no cultivada) y en la materia vegetal, que aparentemente es su hábitat primario. La multiplicación de *L. monocytogenes* en la tierra se favorece con la materia orgánica derivada de plantas en descomposición y está presente en diversos cereales y leguminosas, especialmente cuando la fermentación es deficiente, siendo esto una vía de ingestión del microorganismo para los animales (Fernández, 2000). Es común encontrar a *Listeria* en la superficie de lagos, en agua de las costas, aguas de albañal crudas y tratadas, agua de ríos y lagos, efluentes industriales y de plantas procesadoras de animales (Galdiero y col, 1997; Fernández, 2000; Huss y col., 2000; Phan-Thanh y col., 2000).

*L. monocytogenes* se aísla de ecosistemas relacionados con el procesamiento y manejo de alimentos. Puede sobrevivir en largos periodos de tiempo en el ambiente bajo condiciones adversas y resistiendo factores letales (Fernández, 2000; Swaminathan, 2001). *Listeria* entra a las plantas procesadoras de alimentos a través de diversas fuentes, por ejemplo, por los trabajadores (en la suela de los zapatos, en la ropa), en el equipo de transporte y de procesamiento, en animales,

en tejidos de plantas crudas, en alimentos crudos de origen animal, por posibles portadores de la enfermedad, en agua de drenaje, en aguas estancadas y en superficies (acero inoxidable, cristal, caucho) contaminadas (Swaminathan, 2001). Las posibilidades de contaminación en la industria de alimentos se ven incrementadas con la proximidad a fuentes que son comunes para el patógeno. Por ejemplo, las plantas procesadoras que se encuentran cerca de las granjas que las abastecen de materias primas, tienen mayor probabilidad de aumentar la incidencia de *Listeria* spp. que las plantas procesadoras que no se encuentran cerca. Lo que hace suponer que la contaminación proviene de las propias granjas (Fernández, 2000).

### **2.2.5 CONTROL DE *Listeria monocytogenes***

Las medidas recomendadas para prevenir la listeriosis son:

- Lavarse las manos por lo menos 20 segundos con agua caliente y jabón, antes de manipular cualquier alimento y después de que han estado en contacto con alimentos crudos.
- Lavar todo tipo de superficies, tablas de cortar, platos y utensilios con agua caliente y jabón, después de que han estado en contacto con alimentos crudos.
- Utilizar agua caliente y jabón para limpiar derrames líquidos en el refrigerador.
- Lavar perfectamente la verdura que se consume cruda.
- Separar los alimentos crudos (que pueden contener bacterias peligrosas) de vegetales, frutas, panes y otros alimentos listos para comer.
- No consumir alimentos crudos o insuficientemente cocidos.
- Cocinar completamente todo alimento de origen animal.
- Recalentar los embutidos, los fiambres, carnes y alimentos listos para consumir hasta que emitan vapor. Si no hay manera de recalentarlos, es mejor no consumirlos.
- Refrigerar o congelar alimentos perecederos y listos para su consumo, antes de que pasen dos horas.

- No consumir leche, ni alimentos derivados de esta, cuando la leche no ha sido pasteurizada.
- No consumir quesos blandos (como Feta, Brie, Camembert, variedades con vetas azules o estilo mexicano). Sin embargo se pueden consumir quesos duros, quesos elaborados con leche pasteurizada, quesos crema, requesón y yogur.
- Recalentar suficientemente todo tipo de sobrante, que se encuentre listo para su consumo.
- No consumir frutas y verduras crudas sin lavar o insuficientemente lavados.
- Revisar las fechas de caducidad en los artículos perecederos que están precocidos o listos para consumirse (Anónimo<sup>1</sup>, 1999; Fernández, 2000).

## **2.3 JUGOS DE FRUTA**

Por los beneficios a la salud, el consumo de frutas en forma de jugos se incrementó en los últimos años, siendo ahora parte esencial de la dieta de los humanos (Buchanan y Lindqvist, 2000; Arena y *col.*, 2001; Sharma y *col.*, 2001). Es común consumir jugos de fruta, ya sea de consumo inmediato (en hogares, en servicios de alimentos, en mercados públicos) o envasado herméticamente en la industria (Fernández, 2000). La fruta no es un alimento estéril. Las principales fuentes de contaminación en la elaboración de jugos son la cáscara, las partes externas de la fruta y el equipo de procesamiento. Aunque algunas frutas tienen valores bajos de pH y sustancias antimicrobianas naturales, esto no asegura su inocuidad. Los riesgos en su consumo varían dependiendo del proceso de elaboración del jugo. Los jugos de fruta industriales reciben tratamientos para prolongar su vida de anaquel, además de ser envasados herméticamente para evitar posibles contaminaciones (Buchanan y Lindqvist, 2000; Fernández, 2000).

Hay evidencia que el consumo de jugos frescos, es una fuente significativa de microorganismos patógenos intestinales. Algunas bacterias encontradas en jugos de manzana, naranja, uva, cereza y piña son de *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Shigella*, *Salmonella* y *Vibrio cholerae*, parásitos como *Entamoeba histolytica* y *Giardia*, virus como rotavirus, virus Norwalk, y virus de la hepatitis A (Buchanan y Lindqvist, 2000; Fernández, 2000).

### 2.3.1 JUGO DE NARANJA

El jugo de naranja es el jugo más popular en los Estados Unidos. El consumidor lo prefiere por su contenido vitamínico, por ser benéfico para la salud y por su delicado aroma y sabor. Se estima que aproximadamente el 60% de los jugos que se consumen en Estados Unidos, corresponden al jugo de naranja (Jia y col., 1999; Arena y col., 2001). El jugo de naranja se comercializa de diversas maneras: se puede encontrar concentrado y congelado o pasteurizado y congelado (Lee y Coates, 1999). La producción mundial anual de jugo de naranja concentrado y congelado oscila entre 2.11 y 2.47 millones de toneladas métricas (Anónimo<sup>2</sup>, 2002). La preocupación por una dieta sana y por la nutrición, han hecho que el consumidor prefiera el jugo lo más natural posible y sin un proceso extenso de elaboración (Lee y Coates, 1999). En México, la demanda interna de jugo de naranja concentrado congelado no es tan grande, debido a la preferencia por el jugo natural, exprimido al instante. Por ello el principal demandante del jugo concentrado y congelado es el sector hotelero/restauranero (Anónimo<sup>2</sup>, 2002).

El auténtico jugo de naranja se produce únicamente de la extracción del jugo de la parte carnosa de la naranja, sin agregar azúcares, preservativos u otro tipo de ingredientes (Pupin y col., 1998). El jugo de naranja contiene gran cantidad de vitamina C, vitamina A (en forma de caroteno), B1, B2 y B6. Es rico en potasio y calcio. También contiene ácidos orgánicos como el cítrico y el málico, azúcares (sacarosa, dextrosa y levulosa), celulosa y pectina. (Casado, 1998; Lee y Coates

1999; Pupin y *col.*, 1999). El Cuadro 3 muestra la composición del jugo de naranja. La mayoría de los usos terapéuticos de la naranja son en forma de jugo. Para que no pierda algunas de sus cualidades, se debe consumir inmediatamente después de exprimirlo (Casado, 1998). Algunos de los usos medicinales del jugo de naranja son: antihemorrágico, cicatrizante, antianémico, laxante, diurético, febrífugo, antiinflamatorio, analgésico, para descongestionar pulmones, disminuye la acidez estomacal, el azúcar en la sangre y la litiasis, para mejorar problemas renales, digestivos y cardíacos, también se recomienda para prevenir el cáncer.

### 2.3.1.1 FLORA ASOCIADA AL JUGO DE NARANJA

En el jugo de naranja es frecuente encontrar microorganismos como *Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. La presencia de hongos indica que se ha saneado mal el equipo, que se han utilizado frutas deterioradas o que se han utilizado tratamientos antimicrobianos deficientes. Generalmente, la presencia de microorganismos coliformes, se utiliza como indicador de calidad sanitaria. Se asocian a contaminación por contacto con agua contaminada con desechos fecales, desperdicios orgánicos, desechos animales, excretas humanas, tierra, etc. Los coliformes no necesariamente se relacionan con la materia fecal. En este grupo se encuentran *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Erwina* y *Klebsiella*. Sin embargo, en el caso del jugo de naranja procesado, la presencia de coliformes no se relaciona con malas condiciones sanitarias de elaboración, ya que aunque se extremen las condiciones de sanidad del producto, es probable encontrar coliformes en el producto (Fernández, 2000).

Cuando el jugo de naranja no se encuentra completamente fresco, se generan olores desagradables, debido al desarrollo de organismos acidúricos, por ejemplo, *Lactobacillus* (*L. fermentum* y *L. plantarum*) y levaduras (*Candida maltosa*, *Candida sake*, *Hanseniaspora guilliermondi*, *Pichia membranaefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Schwanniomyces occidentalis*) (Fernández, 2000).

**Cuadro 3.** Composición del jugo de naranja (100 g).

Porción comestible	100 %	Humedad	88.50 %
Fibra	0.10 g	Energía	45 kcal
Hidratos de Carbono	10.40 g	Proteínas totales	0.70 g
Grasas totales	0.20 g	Colesterol	0.00 mg
Saturados totales	0.02 g	Monoinsaturado	0.01 g
Poliinsaturados	0.03g	Calcio	11 mg
Hierro	0.20 mg	Magnesio	11 mg
Sodio	1.00 mg	Potasio	200 mg
Zinc	0.05 mg	Vitamina A	29 mcg
Vitamina C	50 mg	Vitamina B1	0.09 mg
Vitamina B2	0.03 mg	Niacina	0.40 mg
Vitamina B6	0.04 mg	Ac. fólico	0.00 mcg
Vitamina B12	0.00 mcg		

(Muñoz y col, 1997)



### **2.3.1.2 BROTES ASOCIADOS AL CONSUMO DE JUGO DE NARANJA SIN PASTEURIZAR**

Dentro de los agentes etiológicos que ocasionan brotes por consumo de jugos de frutas, se encuentran virus, bacterias y parásitos. Es más frecuente encontrar virus y parásitos, por su baja dosis infectante y por su mayor resistencia a la acidez (Fernández, 2000). El jugo de naranja sin pasteurizar representa un riesgo mayor para la salud pública, ya que carece de un tratamiento físico o químico para eliminar microorganismos patógenos (Sharma y *col.*, 2001). El Cuadro 4 muestra los brotes asociados al consumo de jugo de naranja sin pasteurizar.

## **2.4 MÉTODOS PARA LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS**

Los microorganismos, además de causar infecciones e intoxicaciones alimentarias, causan daño en los alimentos, tales como la pérdida de nutrientes y de propiedades sensoriales. Los alimentos frescos se deterioran por una gran variedad de hongos y bacterias. Cada tipo de alimento es atacado por cierto tipo de microorganismos, de acuerdo a sus propiedades químicas. El deterioro es cualquier cambio del alimento que lo hace inadecuado para su consumo. No todos los alimentos deteriorados son un riesgo para la salud. Sin embargo, su mal aspecto y sabor hace que pierdan la aceptación del consumidor. Por esto uno de los objetivos de la industria de los alimentos es eliminar o disminuir el desarrollo microbiano, para evitar que el alimento se transforme en un vehículo de enfermedades para el consumidor, para prevenir daño a los alimentos y evitar pérdidas económicas por el deterioro. Para cumplir su objetivo, hace uso de los diversos tratamientos de conservación de alimentos (Gould, 1996; Madigan y *col.*, 1999).

**Cuadro 4.** Brotes asociados al consumo de jugo de naranja sin pasteurizar.

AGENTE	LUGAR	AÑO	CASOS	FACTOR	REF.
S. Hartford, S. Rubislaw y S. Newport	Florida, Estados Unidos	1995	62	Superficies del equipo contaminadas por un pobre saneamiento. Se encontraron anfibios en los alrededores de la planta y en las bandas de conducción al área de lavado de naranjas.	1,2
<i>Salmonella</i> <i>Muechen</i>	Estados Unidos (occidente) y Canadá	1999	298	Contaminación de las naranjas, el ambiente, la planta procesadora, las instalaciones para almacenamiento.	2
<i>Salmonella</i> <i>typhi</i>	New York, Estados Unidos	1989	67	Cocineros infectados.	2
<i>Salmonella</i> <i>typhi</i>	Ohio, Estados Unidos	1944	18	No determinado.	2
Virus Norwalk	Australia	1991	3000	Contaminación fecal en la planta de procesamiento.	1,3

1 Fernández, 2000

2 Sharma y col., 2001

3 Fleet y col., 2000

La industria de los alimentos se rige por las necesidades del consumidor. Como ya se mencionó, los consumidores prefieren alimentos mínimamente procesados, con características muy similares a los frescos, con alta calidad sanitaria y una prolongada vida de anaquel. Una consecuencia de esto es la disminución del uso de tratamientos térmicos con altas temperaturas (Cuyás y *col.*, 1994). Los tratamientos térmicos con altas temperaturas se han utilizado para asegurar la calidad sanitaria de los alimentos (Qin y *col.*, 1995); sin embargo, el tratamiento térmico con altas temperaturas produce modificaciones en el color, la textura y en el sabor de los alimentos (Qin y *col.*, 1995; Park y *col.*, 2002).

Los alimentos que se han sometido a tratamientos térmicos con altas temperaturas, pueden sufrir alteraciones en su composición química. Con el calor excesivo, las proteínas pierden su configuración y pueden unirse a proteínas adyacentes, causando la coagulación. Las grasas y los aceites son relativamente estables a las altas temperaturas en ausencia de oxígeno, pero en presencia de oxígeno se descomponen produciendo un sabor a rancio. Las vitaminas liposolubles (A, D, E y K) igualmente son relativamente estables al calor en ausencia de aire. En calentamientos prolongados y en presencia de aire se destruyen. Algunas vitaminas hidrosolubles son muy sensibles al calor, por lo que se destruyen fácilmente. Otro problema es que se solubilizan en agua y el verdadero contenido vitamínico se queda en el líquido dónde se cuecen y no en el alimento (Desrosier, 1997).

Los tratamientos no térmicos pueden evitar algunas de los inconvenientes de los tratamientos térmicos con altas temperaturas. Pueden retener sabores y dar una apariencia más cercana a la del producto fresco (Vega y *col.*, 1997). Algunos de los procesos no térmicos que ayudan a la preservación de los alimentos son los campos eléctricos pulsados, los campos magnéticos oscilantes, la presión hidrostática, los pulsos de luz, la irradiación, entre otros (Qin y *col.*, 1995). Ningún tratamiento puede sustituir las buenas prácticas de fabricación. Simplemente son medidas para mejorar la seguridad del alimento (Mayer, 1993).

## 2.4.1 MÉTODOS NO TÉRMICOS PARA LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS

### 2.4.1.1 PRESIÓN HIDROSTÁTICA ELEVADA

La presión hidrostática elevada (PHE) también es llamada proceso de alta presión (PAP) o presión ultra alta (PUA). Este tratamiento garantiza la inocuidad microbiana de los alimentos, además, no altera el sabor, aroma, color y valor nutricional, ya que no afecta a compuestos de bajo peso molecular, como sustancias aromáticas, pigmentos y vitaminas. En los jugos de fruta, por ejemplo, se logra una mayor retención del sabor original del jugo con PHE, que si se aplicara el tratamiento térmico con altas temperaturas. La PHE es considerada como un tratamiento ecológico, porque se minimiza la cantidad de agua necesaria para tratar los alimentos (Cuyás y *col.*, 1994; García y *col.*, 1998; Ter Steeg y *col.*, 1999; Farkas y Hoover; 2000; Fernández, 2000; González y *col.*, 2000; Furukawa y *col.*, 2001; Butz y *col.*, 2002; Alpas y Bozoglu, 2003).

El tratamiento consiste en aplicar sobre el alimento presiones en un rango de 100 a 1,000 mega pascales (MPa), a temperatura ambiente o cercana a ella. Presiones en un rango de 20 a 130 MPa, inhiben el desarrollo microbiano y presiones entre 130 y 800 MPa matan a los microorganismos por daño celular. La presión se transmite instantánea y homogéneamente en todo el alimento. La duración del tratamiento depende del volumen o masa del alimento (Cuyás y *col.*, 1994; Abee y Wouters, 1999; Fernández, 2000; Gonzáles y *col.*, 2000; Alpas y Bozoglu, 2003). Existen dos tipos de equipo en los que se puede llevar a cabo el tratamiento: el discontinuo y el semicontinuo. El equipo discontinuo es para alimentos sólidos y líquidos envasados. El equipo semicontinuo es para alimentos líquidos no envasados (Cuyás y *col.*, 1994).

En el equipo de alta presión discontinuo, los tiempos de exposición pueden ir de un milisegundo hasta 30 minutos (Cuyás y *col.*, 1994; Farkas y Hoover, 2000). El producto debe llenar completamente el envase, porque la presencia de bolsas de

aire reduce significativamente la eficacia del tratamiento. Los envases deben estar cerrados herméticamente, además de ser flexibles a presiones de 4,000 Kg/cm<sup>2</sup> y a temperatura ambiente (Cuyás y col., 1994).

La PHE afecta diversos componentes y sistemas biológicos. Se puede utilizar para inactivar levaduras, hongos, bacterias y enzimas (Cuyás y col., 1994; García y col., 1998; Ter Steeg y col., 1999). Para eliminar esporas bacterianas, no resulta ser tan efectiva, ya que se requieren presiones superiores a 800 MPa para dañarlas. Con presiones muy elevadas se pueden alterar la textura, el color y las características fisicoquímicas del alimento, especialmente si contienen gran cantidad de proteínas y almidones (Kalchayanand y col., 1998; Alpas y col., 1999; Alpas y col., 2000; Farkas y Hoover, 2000; Furukawa y col., 2001).

Las bacterias Gram positivas y las células en fase estacionaria resisten mejor el tratamiento, que las bacterias Gram negativas y las células en fase exponencial (Alpas y col., 1999; Alpas y col., 2000; Fernández, 2000). Los microorganismos mueren por daño en su membrana celular y en los ribosomas (Kalchayanand y col., 1998; Abee y Wouters, 1999). En general, la destrucción de las células depende de la magnitud de la presión, el tiempo de presurización, la temperatura del tratamiento, el tipo de microorganismo, su fase de desarrollo, el medio en el que se encuentra suspendido y la presencia de sustancias antimicrobianas (Alpas y col., 1999; Alpas y col., 2000).

El precio de los alimentos tratados con PHE, depende del tiempo del tratamiento y del equipo utilizado. La PHE no es una alternativa rentable en productos con alto valor agregado. Este tratamiento es recomendable para productos en los que sea importante resaltar sus características organolépticas y que al someterlos al tratamiento térmico con altas temperaturas se modifiquen sus características organolépticas (Cuyás y col., 1994). Sin embargo, la PHE puede causar cambios indeseables en los alimentos con estructura frágil, como la lechuga y las fresas. Se puede deformar o dañar la membrana de las células del alimento,

haciendo que se ablanden y pierdan líquido, dando la apariencia de un alimento procesado y no la de un alimento fresco y crudo (Farkas y Hoover, 2000).

Los productos más apropiados para la aplicación de la PHE son los alimentos con valores altos de actividad de agua, por ejemplo, los provenientes de las frutas, ya que en estos es suficiente aplicar presiones bajas (300MPa) para inactivar hongos y levaduras. Algunos ejemplos de alimentos en los que se ha aplicado la PHE son jugo de limón, jugo de guayaba, compotas de fresa, puré de albaricoque, trozos de piña frescos, melocotones blancos, frutas y vegetales, cubos de papa, rábanos japoneses, granos, cubitos de cebolla fresca, pimienta negra, vino de uva blanco y rojo, compotas, frutas vestidas, cremas de frutas, yogur, jaleas de frutas, jugo de toronja, jugo de mandarina, frutas tropicales no congeladas, carne de res, surimi, productos de carne de cerdo, leche y productos lácteos, cerveza, y productos derivados de pescados, guacamole, tortas de arroz, calamar crudo, salsas de tomate, ostras frescas, ensaladas, jamón (Ter Steeg y *col.*, 1999; Farkas y Hoover, 2000; Gonzáles y *col.*, 2000; Park y *col.*, 2002) Otras aplicaciones de la PHE son: la modificación de proteínas, los cambios en la transición de fase, la remoción o solubilización de gases, la aglomeración de polvos, el revestimiento de superficie, escaldado a alta presión, secado de frutas y vegetales (Gonzáles y *col.*, 2000).

#### **2.4.1.2 CAMPOS ELÉCTRICOS PULSADOS**

Los campos eléctricos pulsados (CEP) son inducidos entre dos placas mediante alto voltaje (generalmente 20 – 80 kV/cm). El alimento se coloca entre las placas. El tratamiento se lleva a cabo a temperatura ambiente por alrededor de un segundo, reduciendo al mínimo pérdidas de energía por calentamiento. Los CEP reducen, y en algunos casos evitan, el deterioro en las características sensoriales y físicas de los alimentos, sin alterar el valor nutricional del alimento. Este tratamiento es considerado económico a comparación de la pasteurización térmica (Barbosa y *col.*, 2000). Los CEP afectan la permeabilización de las membranas biológicas,

siendo el efecto reversible o irreversible dependiendo de la intensidad del campo eléctrico y del número de los pulsos aplicados (Russell y *col.*, 2000).

El tratamiento se limita a alimentos que soporten campos eléctricos de alta energía. Los líquidos homogéneos con conductividad eléctrica baja son los ideales para el tratamiento. Los alimentos con alta conductividad eléctrica reducen la resistencia del compartimiento, requiriendo más energía eléctrica para alcanzar un campo eléctrico específico. Las propiedades dieléctricas se relacionan con la estructura física y composición química del alimento. La presencia de burbujas en el alimento puede hacer que el tratamiento no sea uniforme, además de presentar problemas operacionales y de seguridad. Cuando el campo eléctrico aplicado excede la fuerza dieléctrica de las burbujas de gas, ocurren descargas parciales dentro de las burbujas que volatilizan el líquido y aumentan el volumen de las burbujas. Las burbujas pueden ser lo suficientemente grandes como para crear un puente sobre el espacio entre los 2 electrodos y producir una chispa (Barbosa y *col.*, 2000).

Algunos alimentos a los que se les han aplicado los CEP son: pan, leche, jugo de naranja, huevos y jugo de manzana. También se han usado en la fermentación de la levadura cervecera. En estos alimentos no hubo modificaciones en las características físicas, químicas y nutricionales del alimento. Se redujo la flora bacteriana y se alargó la vida de anaquel (Barbosa y *col.*, 2000).

El mecanismo de inactivación consiste en la acumulación de cargas eléctricas en la membrana celular (Barbosa y *col.*, 2000). Cuando la membrana celular se expone a un campo eléctrico, se induce un voltaje transmembranal. Las cargas libres se acumulan en ambos lados de la membrana y se atraen, originando que se comprima la membrana de la célula. Cuando el potencial transmembranal inducido es mayor que el potencial natural de la célula (1 V), la membrana pierde estabilidad electromagnética. En cuestión de nano- o microsegundos aumenta la

permeabilidad de la membrana celular, provocando electroporación reversible (Calderón y *col.*, 1999; Barbosa y *col.*, 2000; Fernández, 2000).

La electroporación es la desestabilización temporal de la bicapa lipídica y las proteínas de la membrana de la célula. Después del tratamiento con los CEP, la membrana se hace permeable por la formación de pequeños poros, provocando hinchazón. Las descargas se conducen inmediatamente sobre la membrana, produciendo la descomposición temporal de ésta (Vega y *col.*, 1997; Barbosa y *col.*, 2000). Si se suspende el tratamiento los poros se cierran y la membrana recobra su permeabilidad inicial, siempre y cuando los poros sean pequeños en relación a la superficie total de la membrana. Si el número y tamaño de los poros llegan a ser grandes respecto al área total de la membrana, el daño es irreversible. Además de la formación de poros, se sabe que los CEP, producen un aumento en la aspereza superficial, alargamiento, daño en organelos y fractura de la pared celular (Calderón y *col.*, 1999; Barbosa y *col.*, 2000; Fernández, 2000).

Las bacterias Gram positivas son más resistentes a CEP que las Gram negativas. Por su tamaño más grande, las levaduras son más sensibles que las bacterias, aunque son más resistentes que las células Gram negativas. En general las células en fase exponencial son más sensibles que las células en fase estacionaria (Calderón y *col.*, 1999; Barbosa y *col.*, 2000). Los factores que influyen en la inactivación microbiana son de tres tipos: a) de proceso; es decir, relacionados con la intensidad del campo eléctrico, la anchura del pulso, el tiempo, la temperatura del tratamiento y el perfil de onda del pulso; b) de entidad microbiana; es decir, el tipo, la concentración y la etapa del desarrollo del microorganismo y c) de los medios del tratamiento; es decir, el pH, los compuestos antimicrobianos, los compuestos iónicos, la conductividad y la fuerza iónica media (Barbosa y *col.*, 2000).



### 2.4.1.3 IRRADIACIÓN IONIZANTE

Las radiaciones ionizantes pueden destruir insectos, reducir o eliminar el contenido de hongos, bacterias y detener el deterioro físico de algunos productos (Thakur y Singh, 1995; Farkas, 1998; Fernández, 2000). Este tratamiento consiste en exponer al alimento a niveles determinados de energía radiante, procedente de los radioisótopos Cobalto 60 ( $\text{Co}^{60}$ ) o de Cesio 137 ( $\text{Cs}^{137}$ ) (Thakur y Singh, 1995; Farkas, 1998; Madigan y *col.*, 1999; Fernández, 2000). Por su menor costo, la radiación gama es la utilizada en la preservación de alimentos. La unidad de radiación es el roentgen (medida de la emisión de radiación de una fuente). La cantidad de energía que llega al alimento (dosis de radiación absorbida) se mide en rads (1 rad = 100 erg/g) o en gray (1 Gy = 100 rads) (Madigan y *col.*, 1999; Fernández, 2000).

Algunos efectos indeseables en los alimentos irradiados son los iones y los radicales libres que se originan por la interacción de la energía radiante con los constituyentes del alimento (Thakur y Singh, 1995; Madigan y *col.*, 1999). El radical hidroxilo  $\text{OH}^\cdot$  y el radical hidruro  $\text{H}^\cdot$  son ejemplos de radicales libres; el más importante es el radical hidroxilo  $\text{OH}^\cdot$  (Madigan y *col.*, 1999). Estos pueden dañar macromoléculas como el ADN (ácido desoxiribonucleico) y daño en enzimas debido a su gran reactividad química. El efecto letal de las radiaciones ionizantes se debe a la generación de productos radiolíticos dentro de las células (Mayer, 1993; Madigan y *col.*, 1999; Fernández, 2000).

Los alimentos irradiados no quedan con radiación residual. Los radicales libres que se generan son muy pocos. Se calcula que el 0.01% de las ligaduras químicas son afectadas en el material irradiado (Desrosier, 1997; Fernández, 2000). A dosis bajas el alimento no experimenta cambios sensoriales. La disminución de las propiedades nutricionales del alimento son menores que las observadas en el tratamiento térmico (Fernández, 2000). A diferencia del proceso térmico, muy poca energía de radiación se gasta en elevar la temperatura del

alimento, considerándose proceso de esterilización fría (Desrosier, 1997). Otra ventaja de este tipo de radiación es la longitud de onda extremadamente corta, que permite uniformidad y gran poder de penetración, pudiendo atravesar envases de vidrio y metálicos (Desrosier, 1997; Madigan y *col.*, 1999; Fernández, 2000).

La dosis que se deberá aplicar, depende del propósito. Para la esterilización comercial (radapertización): hasta 40 kGy. Para la inactivación de patógenos (radacidación): 2.5 a 10 kGy. Para prolongar la vida de anaquel (radurización): < 2.5 kGy. Las bacterias se muestran más sensibles a las radiaciones, siguiendo las levaduras y los hongos. Las más resistentes son las esporas bacterianas y los virus. De las bacterias, las Gram negativas son más sensibles que las Gram positivas (Mayer, 1993; Fernández, 2000). También se pueden irradiar granos y especias para eliminar el uso de pesticidas después de la cosecha (Thakur y Singh, 1995). La eficiencia del tratamiento depende de las condiciones de la célula y del alimento. Las condiciones de la célula son: su naturaleza, el número, la fase de desarrollo (es más sensible en la fase exponencial), el daño en los sitios vitales y su capacidad para soportar el daño y repararlo. En el alimento depende de la temperatura, su composición química, el pH, la presencia de oxígeno, la presencia de sustancias antimicrobianas, el contenido de agua, entre otras (Mayer, 1993; Farkas, 1998; Fernández, 2000).

Una dosis demasiado alta, también puede modificar las características del alimento. Por ejemplo, puede decolorar la carne (Farkas, 1998). Otros cambios químicos en los alimentos debido a las dosis de radiación utilizada son, oxidación de iones y metales, oxidación y reducción de carbonilos (formando hidroxilos), eliminación de dobles enlaces, disminución e hidroxilación de compuestos heterocíclicos y aromáticos. Estos productos también se forman en grandes cantidades en otros tratamientos de procesamiento de alimentos (Fernández, 2000).

Para evitar los efectos desagradables en los alimentos se puede combinar la radiación con otros tratamientos, por ejemplo:

- **Temperaturas criogénicas:** ayudan a prevenir daño en el tejido. Por la viscosidad del medio se inmovilizan los radicales libres y los iones formados por la irradiación.
- **Calentamiento:** para inactivar enzimas con radiación se requiere de dosis altas; sin embargo, con el calentamiento antes de la irradiación, se inactivan las enzimas, se elimina el aire y se incrementa la sensibilidad de las bacterias a las radiaciones ionizantes.
- **Eliminación de oxígeno:** el oxígeno puede producir cambios químicos en el alimento; actúa como oxidante durante la radiación y puede formar ozono ( $O_3$ ), un oxidante muy poderoso. El beneficio de la eliminación de oxígeno es principalmente para alimentos ricos en grasas. Además, si no se elimina el oxígeno, durante el almacenamiento se puede degradar el contenido de vitamina E y tiamina. Debe tomarse en cuenta que eliminando el oxígeno, algunas esporas anaerobias pueden producir toxinas después de la irradiación si no se aplica una dosis suficiente para eliminar el riesgo.
- **Empacado con carbón:** El carbón activado ayuda a la absorción de compuestos volátiles que producen olores desagradables.
- **Aditivos:** inhiben los radicales libres y los iones para que no actúen con diferentes componentes del alimento. Por ejemplo, el ácido sórbico (Ácido 2,4-hexadienoico), es de los más usados en el mundo y tan seguro como la sal (NaCl), inhibe, hongos y levaduras. Los sorbatos inhiben el desarrollo de malos olores, reducen la pérdida de vitamina C y reducen las reacciones de oscurecimiento. Otros aditivos son el nitrito de sodio, fumarato de sodio, glutamato de sodio y algunos antioxidantes (Thakur y Singh, 1995).

Algunos alimentos en los que se pueden utilizar las radiaciones ionizantes son carne de aves, carnes rojas (empaquetadas y congeladas), huevos frescos y productos de huevo, camarones congelados, productos pesqueros, especias e

ingredientes secos (Mayer, 1993; Farkas, 1998). Se sabe que en algunos países se encuentra establecida esta tecnología para descontaminar los alimentos, sin embargo, todavía no es muy extendida esta práctica, debido principalmente a la ignorancia del tema, que origina miedos y suposiciones erróneas acerca del tratamiento, por ejemplo, miedo a una posible contaminación radiactiva, a la formación de productos tóxicos o cancerígenos, a la producción de sabores extraños en los alimentos irradiados e incluso a la muerte del consumidor (Farkas, 1998; Madigan y *col.*, 1999; Fernández, 2000). No existen evidencias de efectos tóxicos genéticos o actividad teratogénica en los alimentos procesados por radiación. Las pruebas indican que no se detectan consecuencias nocivas en animales y humanos cuando el 100 % de los alimentos ingeridos fueron irradiados (Fernández, 2000).

#### **2.4.1.4 LUZ ULTRAVIOLETA**

La esterilización con luz ultravioleta (UV) implica la utilización de radiación en la región ultravioleta del espectro electromagnético. La luz ultravioleta viaja en forma de ondas. Su longitud de onda abarca la región de 100 a 400 nm, entre la región de la luz visible y los rayos X (Figura 1). El espectro de luz ultravioleta se puede dividir en:

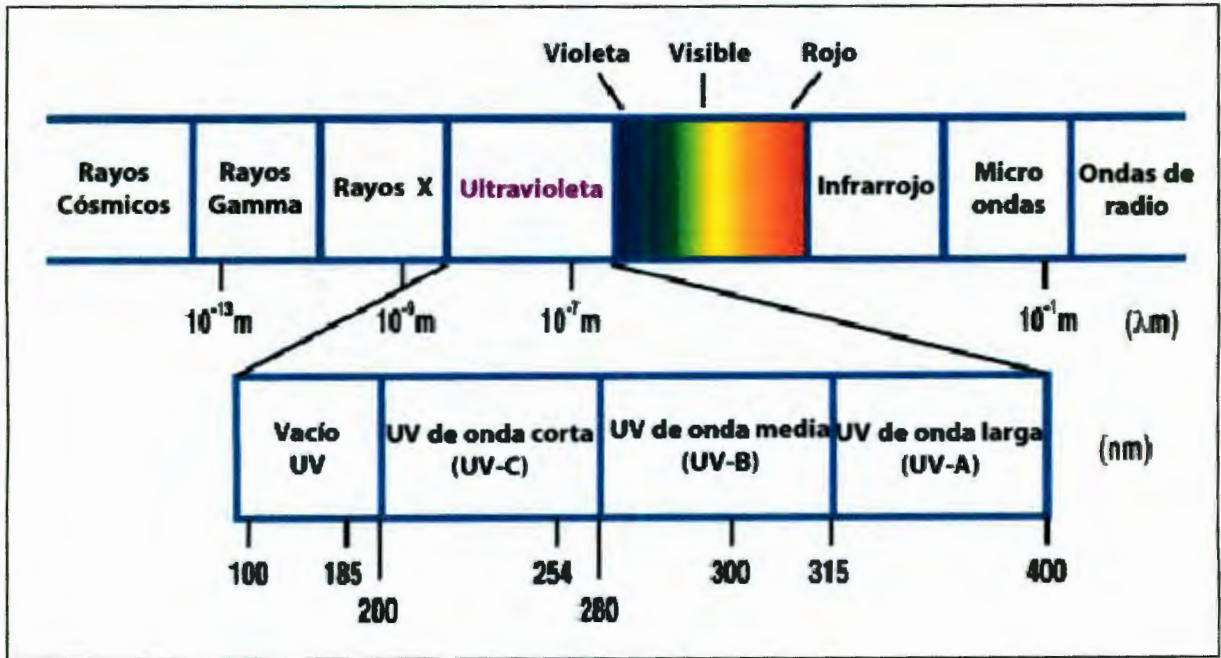
- Zona UVA (315 a 400 nm): se originan cambios de pigmentación en la piel humana al broncearse.
- Zona UVB (280 a 315 nm): causa quemaduras en la piel.
- Zona UVC (200 a 280 nm): denominada zona germicida, aquí se inactivan las bacterias y los virus. La zona UVC es absorbida por el ADN por lo que puede ocasionar mutaciones en la molécula, causando cáncer.
- Zona UVV (100 a 200 nm): llamada zona UV vacío. Es absorbida por casi todas las sustancias y se transmite solamente en el vacío.

(Sastry y *col.*, 2000; Anónimo<sup>3</sup>, 2001; Anónimo<sup>4</sup>, 2001)

El efecto germicida de la irradiación UV se basa en su alto poder mutagénico. La luz UV es absorbida por la molécula del DNA originando mutaciones (Madigan y *col.*, 1999; Sastry y *col.*, 2000). Las bases púricas y pirimidínicas de los ácidos nucleicos absorben la radiación ultravioleta a 260 nm (Madigan y *col.*, 1999; Anónimo<sup>4</sup>, 2001). Un efecto de la radiación ultravioleta es la formación de dímeros de pirimidina, es decir, la unión covalente de dos bases pirimidínicas adyacentes, por lo que durante la replicación del ADN, la ADN polimerasa insertará un nucleótido incorrecto en esa posición (Madigan y *col.*, 1999), de tal modo que la transcripción y la réplica del ADN se bloquea y eventualmente se produce la muerte (Sastry y *col.*, 2000; Anónimo<sup>5</sup>, 2003).

La aplicación más común de radiación UV es el uso de lámparas microbicidas. Estas emiten dosis muy grandes de radiación a 260 nm y llegan a matar entre un 90 – 95% de la población microbiana (Madigan y *col.*, 1999). Este tratamiento se puede utilizar para desinfectar superficies, aire, agua y materiales que no absorben las ondas UV. Las ondas UV no pueden penetrar superficies sólidas opacas o materiales turbios que no absorban la luz (Madigan y *col.*, 1999; Sastry y *col.*, 2000). Su utilidad se limita a superficies expuestas (Madigan y *col.*, 1999).

La radiación UV se utiliza para potabilizar agua, el equipo puede estar debajo de fregaderos, o en máquinas despachadoras de agua, en aviones, en barcos, granjas, ranchos, escuelas, hoteles, en pozos de agua, en cisternas de agua, en piscinas, tinas calientes, acuarios, criaderos, etc. En la industria de alimentos se utiliza en la elaboración de vinos y edulcorantes dulcificantes, aceites de mesa, lubricantes con base de agua, en agua pura para beber, en embotelladoras, etc. Sus aplicaciones médicas son en la producción farmacéutica, desinfectando áreas de trabajo en laboratorios, hospitales y clínicas. En la industria en general se utiliza en cosméticos, productos electrónicos, recuperación de agua de lagos, etc. (Anónimo<sup>5</sup>, 2003).



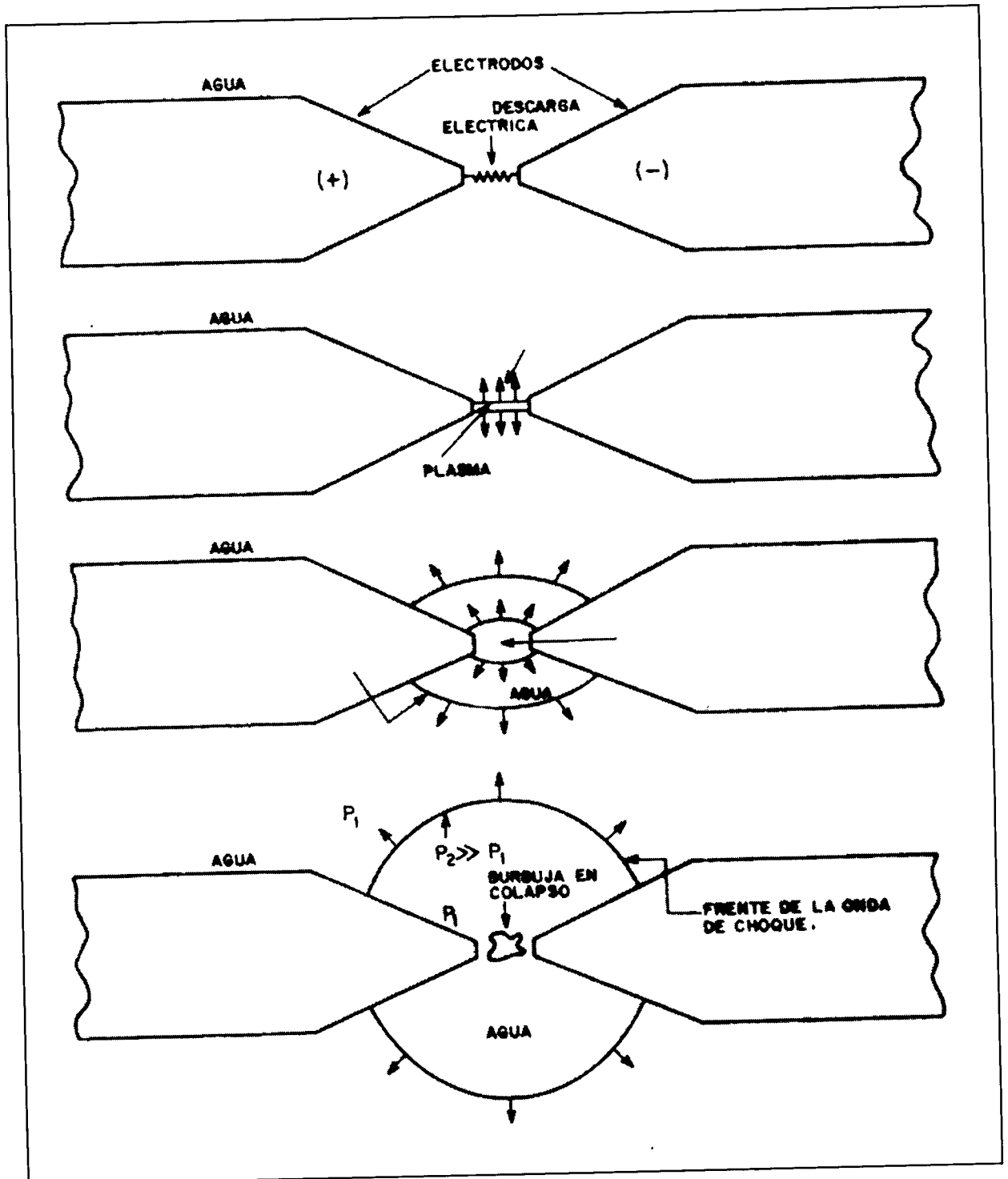
(Modificado: An3nimo<sup>6</sup>, 2003).

**Figura 1.** Regi3n de la radiaci3n UV en el espectro electromagn3tico.

### 2.4.1.5 ONDAS DE CHOQUE

Las ondas de choque son pulsos de presión extremadamente cortos que se propagan a través de un medio. Tienen propiedades diferentes a las ondas electromagnéticas y a las ondas sonoras, sin embargo, siguen algunas leyes de la acústica. Las ondas de choque no son visibles, pero, producen un sonido intenso y se pueden sentir (Loske y Prieto, 1999). Una onda de choque se denomina onda de choque “débil” cuando en amplitud es inferior a aproximadamente 5 Kbars (Loske, 1990; Loske, 1994). Las ondas se propagan a través del medio sin transportar materia; sólo transportan energía (Loske y Prieto, 1999). Las ondas de choque débiles se pueden generar de diversas maneras. Existen los generadores electrohidráulicos, los microexplosivos, el piezoeléctrico, el electromagnético y el de rayo láser. El objetivo de todos estos generadores es el mismo: generar ondas de choque y concentrar la energía en un punto específico (Loske, 1994; Loske y Prieto, 1999).

La generación electrohidráulica de ondas de choque, también se llama generación por rompimiento eléctrico en agua (Loske, 1990). En el generador electrohidráulico, la onda de choque es producida por una descarga eléctrica de alto voltaje (miles de voltios) entre dos electrodos que se encuentran sumergidos en agua y separados 1 a 3 milímetros. La onda de choque se forma en cuestión de microsegundos cuando se aplica alto voltaje a los electrodos (Loske y Prieto, 1991). En un principio sólo fluye una corriente muy pequeña, debido a la resistencia entre los electrodos, creando un canal de plasma de fracciones de milímetro, formado de gas altamente ionizado. La resistencia eléctrica disminuye debido a las colisiones entre los electrones y los átomos dentro del canal de plasma, comenzando a fluir grandes cantidades de corriente que expanden el plasma a altas velocidades. El plasma está formado por átomos y moléculas de agua, de oxígeno, de hidrógeno, de ozono y por átomos de los electrodos en todos los estados de excitación (Loske, 1990). La Figura 2 muestra la generación electrohidráulica de la onda de choque.



(Loske, 1990)

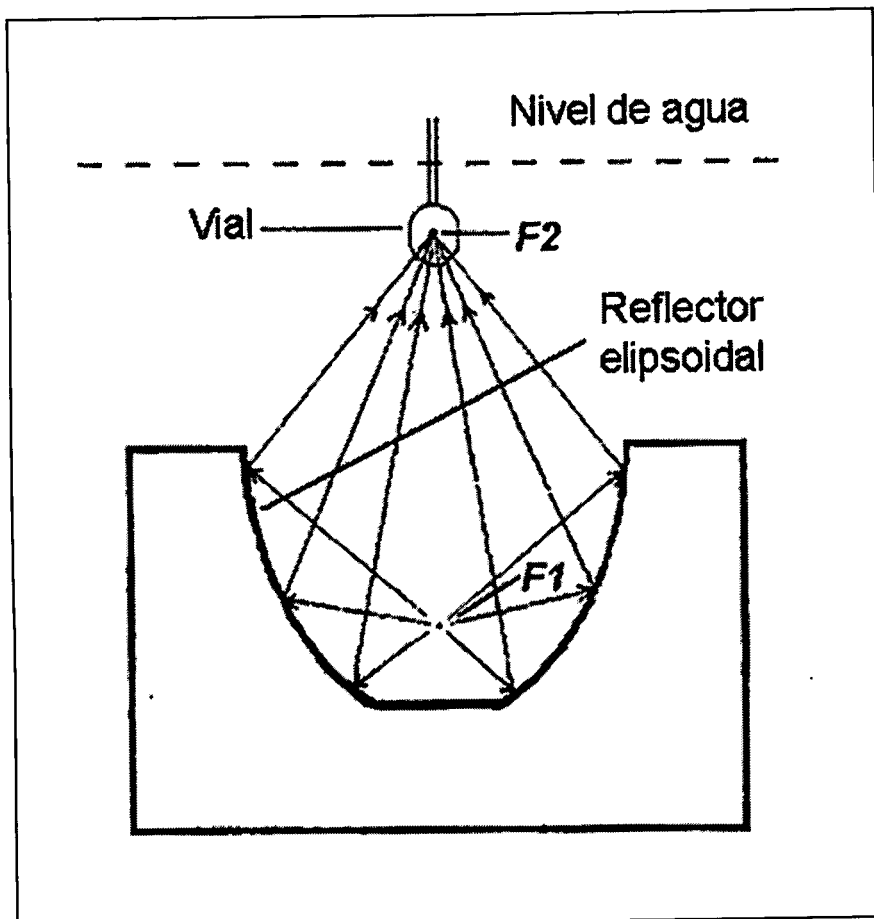
**Figura 2.** Generación electrohidráulica de la onda de choque.  $P_1$  es la presión hidrostática de equilibrio y  $P_2$  es la presión en el frente de choque.



El canal de plasma comprime al medio (agua). Esta compresión se transforma en una onda de choque al propagarse algunos centímetros a través del agua. Durante la expansión de la burbuja de plasma, la presión dentro de la burbuja disminuye. En realidad, la onda de choque, es un frente de choque. El frente de choque es el cambio de propiedades físicas del medio conforme se propaga, es decir, se tiene un incremento en la presión, la densidad y la temperatura (Loske y Prieto, 1991; Loske y Prieto, 1999).

La onda de choque posee un pulso de presión positivo (compresión), seguido de un pulso de presión negativo” o de tensión (dilatación). Cuando la presión negativa es superior a la presión que puede soportar el líquido se origina cavitación acústica (Preminger, 1991). La cavitación es la formación, oscilación e implosión de burbujas de gas en líquido (Segebarth y *col.*, 2002). Existen dos tipos de cavitación: pseudocavitación (formación de burbujas a partir de gases disueltos en el líquido) y cavitación real (rompimiento de los enlaces moleculares del líquido). Una onda de choque puede producir ambos tipos de cavitación (Loske, 1990; Loske 1994). Las temperaturas y presiones que alcanzan las burbujas durante el colapso pueden generar luz, en un intervalo espectral aproximado de 340 a 690 nanómetros (sonoluminiscencia), ruido de la cavitación y cambios químicos (sonoquímica) en el medio, como son excitación de moléculas, recombinación molecular y rompimiento de moléculas (Loske, 1990, Segebarth y *col.*, 2002).

En los generadores de ondas de choque electrohidráulicos se usa un elipsoide truncado para concentrar la energía liberada por la descarga eléctrica en agua. El elipsoide de revolución refleja el frente de onda generado en el primer foco (F1) y lo concentra en el segundo foco (F2), como se muestra en la Figura 3 (Loske, 1990, Loske y Prieto, 1999; Von Eiff y *col.*, 2000). Durante la generación de ondas de choque, se pierde energía: en el trabajo mecánico que hace el plasma para generar la onda de choque, en la radiación y en la conducción térmica que se transmite al medio que rodea al plasma. En realidad, la pérdida por conducción térmica es tan pequeña que se puede despreciar (Loske, 1990).



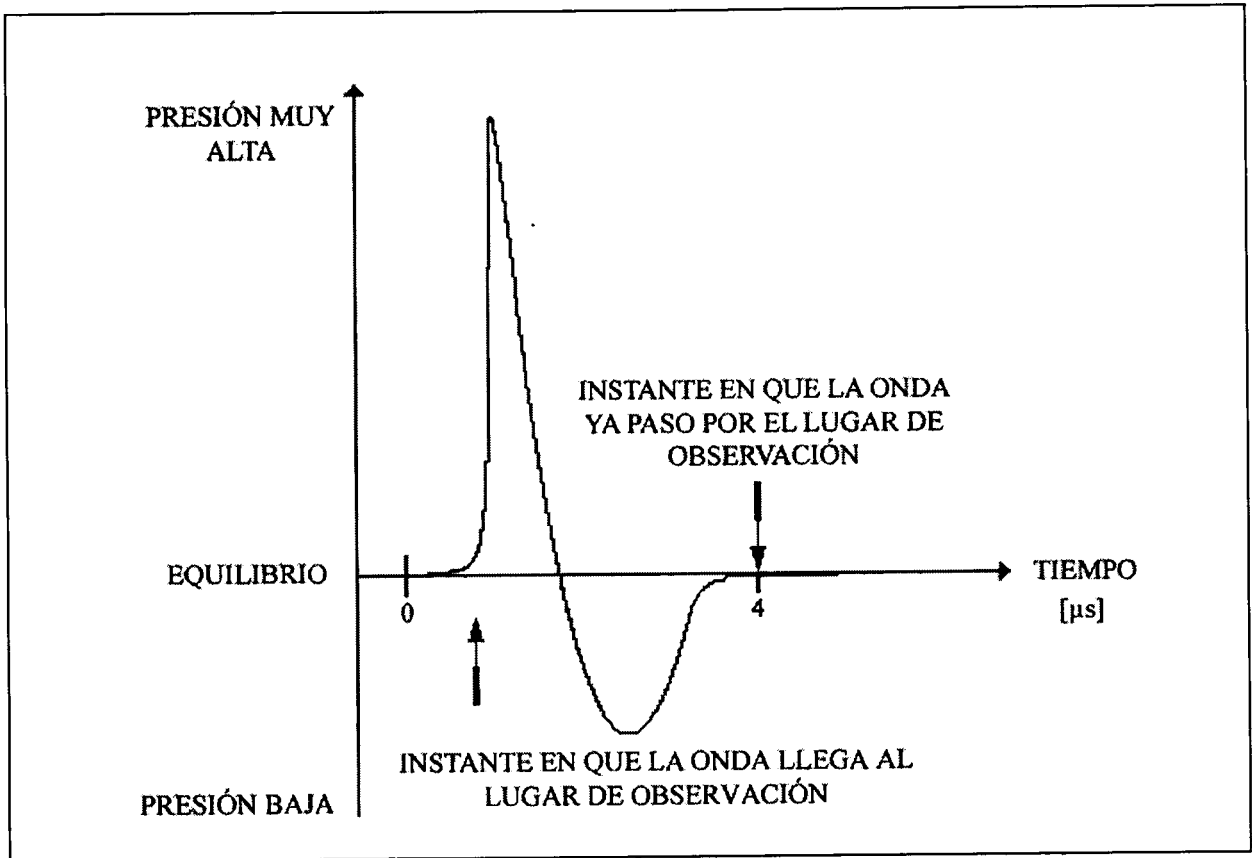
(Loske y col. 2002)

**Figura 3.** Diagrama de reflexión de rayos en un elipsoide truncado.

En las regiones de alta presión aumenta la temperatura, lo que aumenta la velocidad de propagación de la onda. Lo opuesto sucede en las regiones de baja presión, donde la temperatura y la velocidad son menores. Esto da como consecuencia un perfil de diente de sierra para la onda. Sus crestas (máximos) se propagan a mayor velocidad que los valles (mínimos) (Loske y Prieto, 1999). La Figura 4 muestra el perfil de presión de una onda de choque.

Algunas ventajas del generador electrohidráulico son: la relativa sencillez del equipo, que se pueden generar presiones muy grandes, la propagación del plasma generado por la descarga es muy rápida, el agua es isotrópica, por tanto la velocidad de propagación es homogénea y en todas direcciones y es fácil la repetición de los experimentos. Sus inconvenientes son: después de muchas descargas los electrodos se desgastan, por lo que se debe cambiar la bujía por una nueva, además conforme se desgastan los electrodos se producen variaciones de presión (Loske, 1990; Loske, 1994).

Algunas de las razones por las que se utiliza agua como medio de generación y propagación son: agua es un fluido poco compresible y es un líquido de fácil y económico manejo. Su compresibilidad es miles de veces menor que la del aire, por esto, con energías de generación relativamente pequeñas se pueden generar ondas de choque con presiones muy grandes (Loske, 1990; Loske, 1994; Loske y Prieto, 1999).



(Modificado: Loske y Prieto, 1999)

**Figura 4.** Perfil de presión de una onda de choque.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las ondas de choque se han aplicado en la litotricia extracorporal para el tratamiento no invasivo de cálculos renales, uretales, biliares, pancreáticos y en glándulas salivales. A nivel experimental se han usado en tratamientos de tumores. Además, se aplican clínicamente en fracturas difíciles de cicatrizar, en pseudoartrosis, en tendinopatias y en otros problemas ortopédicos (Delius, 1994; Cleveland y *col.*, 1997; Loske y *col.*, 1999; Loske y *col.*, 2000). El daño observado en los tejidos durante la aplicación de tratamientos clínicos y el efecto destructivo del ultrasonido sobre células bacterianas, condujeron a la idea de utilizar ondas de choque como un método de conservación no térmico de alimentos (Delius, 1994; Loske y *col.*, 1999; Loske y *col.*, 2000).

A la fecha, se han hecho pocos estudios sobre el efecto de la aplicación de ondas de choque en la viabilidad de los microorganismos. Ohshima y *col.*, 1991; Kerfoot y *col.*, 1992; Loske y *col.*, 1999; Von Eiff y *col.*, 2000, realizaron estudios sobre la viabilidad de diversas bacterias suspendidas en solución salina isotónica. Los resultados de este conjunto de trabajos sugieren que las ondas de choque pueden ser un método para inactivar microorganismos; sin embargo, se requieren más estudios para entender el mecanismo de inactivación de los microorganismos.

Para este trabajo, se utilizó el MEXILIT II (Prieto y *col.*, 1991), que es un generador electrohidráulico de ondas de choque, debido a las ventajas que ofrece: se pueden generar altas presiones y la velocidad de propagación es rápida y homogénea; además, el agua es un líquido fácil de manejar y de obtener (Loske y Prieto, 1999).

Se eligió el jugo de naranja por varias razones: por su contenido nutricional y popularidad entre los consumidores; por su baja viscosidad y presenta propiedades acústicas semejantes a las del agua, por lo que la onda de choque generada en agua puede atravesar la muestra sin sufrir reflexiones; existe evidencia de que este

tipo de alimento puede contener gran cantidad de microorganismos patógenos intestinales; y al recibir tratamiento térmico con la pasteurización se alteren sus propiedades sensoriales, situación que se podría evitar aplicando un tratamiento no térmico (Buchanan y Lindqvist, 2000; Fernández, 2000; Arena y col., 2001; Sharma y col., 2001).

Se estudio *Listeria monocytogenes* porque es un microorganismo que infecta fácilmente a personas con el sistema inmunológico comprometido, además que se requieren pocas células para causar infección. *Listeria* está ampliamente diseminado en el ambiente y tiene mecanismos genéticos y fisiológicos que le confieren habilidad para desarrollar en casi cualquier alimento, incluido el jugo de naranja (Hernández, 1999; Rowan, 1999; Fernández, 2000; Loaharanu, 2001).

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la aplicación de ondas de choque sobre la viabilidad de una cepa ácido resistente de *Listeria monocytogenes* suspendida en solución salina isotónica y en jugo de naranja.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Estudiar el efecto del número de choques aplicados, la cavitación, la luz producida por la descarga eléctrica y la fase de crecimiento sobre la viabilidad de una cepa de *Listeria monocytogenes*, suspendida en solución salina isotónica.
2. Estudiar el efecto del número de choques aplicados, la cavitación, la luz producida por la descarga eléctrica y el tipo de reflector sobre la viabilidad de células en fase estacionaria de una cepa ácido resistente y resistente a rifampicina de *Listeria monocytogenes*, suspendida en solución salina isotónica.
3. Estudiar el efecto del número de choques aplicados, la cavitación, la luz producida por la descarga eléctrica y el nivel de inóculo sobre la viabilidad de células en fase estacionaria de una cepa ácido resistente y resistente a rifampicina de *Listeria monocytogenes*, suspendida en jugo de naranja.

## **5. METODOLOGÍA Y MATERIALES**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Ondas de Choque del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) del Instituto de Física de la UNAM, Campus Juriquilla.

### **5.1 MATERIALES**

#### **5.1.1 MATERIALES BIOLÓGICOS**

Se utilizó una cepa de *Listeria monocytogenes* L8, aislada de una muestra de guacamole de la ciudad de Querétaro, donada por el Dr. Eduardo Fernández Escartín del Laboratorio de Microbiología Sanitaria, División Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. La cepa se mantuvo en tubos inclinados de Agar Nutritivo (Merk, Alemania) entre 4 y 7° C y se sembró una vez al mes.

#### **5.1.2 GENERADOR DE ONDAS DE CHOQUE**

Se utilizó el generador de ondas de choque experimental electrohidráulico MEXILIT II (Prieto y *col.*, 1991), diseñado y construido en el Instituto de Física de la UNAM (IFUNAM). Para la descarga eléctrica, se utilizaron bujías intercambiables de baja impedancia con electrodos de tungsteno, separados 1 mm. La capacitancia se fijó en 80 nF. Las bujías se precalentaron con 100 descargas a  $18 \pm 0.1$  kV DC. Se utilizaron dos reflectores elípticos de acero inoxidable: E3 y E4. El E3 con eje mayor de 12.0 cm, eje menor de 8.6 cm y 21.7 cm de altura. El E4 con eje mayor de 13.9 cm, eje menor de 7.8 cm y 13.6 cm de altura.



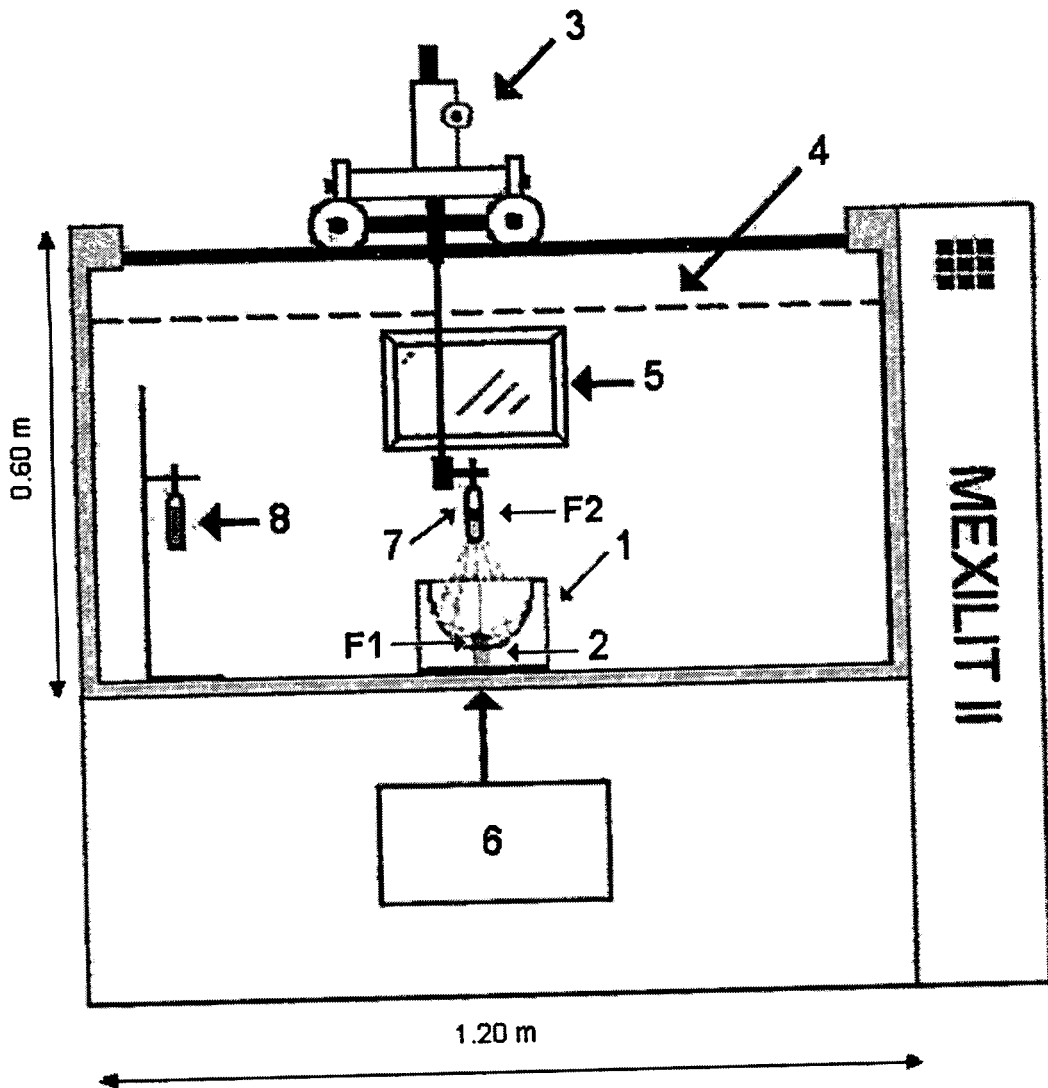
Los viales del tratamiento se colocaron en el foco geométrico F2 del reflector elíptico. El nivel de agua se mantuvo 30 cm arriba del foco F2. A cada tratamiento se le asignó un vial de control, que fue colocado dentro de la misma tina de experimentos a la misma altura que el vial de tratamiento, lejos del efecto de la onda de choque y de la luz producida. La temperatura del agua donde se generaron las ondas de choque fue de  $22 \pm 2^\circ \text{C}$ . Antes del experimento, los viales se atemperaron dos minutos en el agua. La velocidad de generación de las ondas de choque fue de 0.4 Hz. El voltaje de la descarga se fijó en 20 kV DC. La Figura 5 es la representación gráfica de la colocación del vial en el foco F2. También se muestra el vial control.

## **5.2 METODOLOGÍA**

### **5.2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO 1**

#### **5.2.1.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

Los medios de cultivo utilizados en el estudio fueron marca Bioxon (Becton Dickinson, México). La cepa se activó incubándola en Caldo Soya Triptica con extracto de levadura (CSTEL) al 0.6% (p/v), a  $35^\circ \text{C}$  por 24 hrs. Para la obtención de células en fase estacionaria se tomaron dos asadas del cultivo activado y se inocularon en 40 ml de CSTEL por 20 horas a  $35^\circ \text{C}$ . Para las células en fase exponencial se inoculó 1:4 partes (v/v) del cultivo activado en 8 ml de CSTEL, este subcultivo se incubó 3 horas a  $35^\circ \text{C}$ . Posteriormente, se inoculó 1:4 partes (v/v) del subcultivo en 32 ml de CSTEL, incubándose 1.5 horas a  $35^\circ \text{C}$ . Las células se recuperaron mediante centrifugación (Hamilton Bell, E.U.A., modelo VanGuard V6000) a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.



(Modificado: Loske y Prieto, 1991; Loske y *col.*, 1998)

**Figura 5.** Esquema del generador electrohidráulico de ondas de choque MEXILIT II: (1) reflector, (2) bujía, (3) grúa de precisión, (4) nivel de agua, (5) ventana, (6) circuito eléctrico, (7) vial muestra, (8) vial control.

Las células se resuspendieron en SSI al 0.9% (p/v), con esta suspensión se llenaron viales de polipropileno Kendall Lquipette (Elkay Products INC., E.U.A., modelo 127-P507-STR) de 4 ml de capacidad, sellándolos después con calor. Los tiempos para la obtención de células en fase estacionaria y exponencial fueron determinados a partir de cinéticas de crecimiento en CSTEL a 35° C.

#### **5.2.1.2 ESTUDIO DEL EFECTO DEL NÚMERO DE CHOQUES APLICADOS, LA CAVITACIÓN, LA LUZ PRODUCIDA POR LA DESCARGA ELÉCTRICA Y LA FASE DE CRECIMIENTO SOBRE LA VIABILIDAD DE UNA CEPA DE *Listeria monocytogenes*, SUSPENDIDA EN SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA**

En este experimento se utilizó el reflector E4. Para evaluar el efecto de la fase de crecimiento, la mitad de los viales se llenaron con células en fase estacionaria y la otra mitad con células en fase exponencial a un nivel de  $10^8 - 10^9$  UFC/ml. Morgan y *col.* (1988) observaron que en viales llenos al 75%, la cavitación generada por las ondas de choque es aproximadamente 3 veces mayor a la cavitación generada en los viales llenos al 100%. Para estudiar el efecto de la cavitación, los viales se llenaron al 75% y al 100% (cavitación aumentada y normal, respectivamente) de su capacidad. Para estudiar el efecto de la luz producida por la descarga, la mitad de los viales de los tratamientos se cubrieron con una bolsa de polipropileno negra para bloquear la luz y la otra mitad de los viales se cubrió con una bolsa de polipropileno transparente. A la mitad de los viales se les aplicaron 150 ondas de choque (6 min 15 s) y a la otra mitad 350 (14 min 35 s) ondas de choque. El Cuadro 5 muestra el diseño experimental del objetivo 1.

Para evaluar la efectividad de los tratamientos sobre la viabilidad del microorganismo se hicieron diluciones en diluyente de peptona al 0.1% (p/v) y se hicieron recuentos por vaciado en placa en Agar Soya Trypticosa enriquecido con Extracto de Levadura (ASTEL) al 0.6% (p/v). Las placas se incubaron a 35° C por 24 horas. El experimento se realizó por triplicado y los resultados se analizaron con

**Cuadro 5.** Diseño experimental del objetivo 1.

<b>Tratamiento</b>	<b>Luz</b>	<b>Cavitación</b>	<b>Fase</b>	<b>Choques</b>
1	Si	75 %	Estacionaria	350
2	No	100 %	Estacionaria	350
3	Si	100 %	Estacionaria	150
4	No	100 %	Exponencial	150
5	Si	75 %	Exponencial	150
6	No	75 %	Estacionaria	150
7	Si	100 %	Exponencial	350
8	No	75 %	Exponencial	350

el programa R (Ihaka y Gentleman, 1996), mediante un análisis de varianza (ANDEVA). Las réplicas se trataron estadísticamente como bloques. Para este objetivo se utilizó la mitad de un diseño factorial  $2^4$  (Box y col., 1978).

### 5.2.1.3 DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA TÉRMICA

Se hicieron modificaciones al método de Bradshaw y col. (1987) para determinar los valores  $D$  a 50, 55 y 60° C. La metodología utilizada fue: en cada tubo de vidrio de 10 x 100 mm se colocó 1 ml de la células en suspensión SSI. Los tubos se colocaron en baño de agua a la temperatura correspondiente, con una precisión de  $\pm 0.2^\circ$  C, controlada con un circulador (Precision Scientific, E.U.A.). Los tiempos del tratamiento fueron: para 50° C, 0, 5, 10, 15, 20 minutos; para 55° C, 0, 2, 4, 6, 8 minutos; para 60° C, 0, 0.5, 1, 1.5, 2 minutos. Inmediatamente después del tratamiento, los tubos se enfriaron en baño de hielo por 5 minutos.

Este procedimiento se hizo para células en fase estacionaria y células en fase exponencial, obtenidas de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.2.1.1. Después se determinó la viabilidad del microorganismo mediante recuentos por vaciado en placa en ASTEL. El experimento se realizó por triplicado y los resultados se analizaron con el programa R (Ihaka y Gentleman, 1996), mediante un análisis de regresión lineal. Las réplicas se trataron estadísticamente como bloques.

## 5.2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO 2

### 5.2.2.1 INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A LA RIFAMPICINA

Se obtuvieron células en fase estacionaria, suspendidas en CSTEEL, de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 5.2.1.1, y se estrieron en una caja de ASTEL con 150 ppm de rifampicina (ASTEL R<sup>+</sup>), la caja se incubó a 35° C entre 48 y 72 horas, hasta obtener crecimiento con colonias bien definidas, después se resembraron en ASTEL R<sup>+</sup> un total de 10 veces. Las células resistentes a rifampicina (células R<sup>+</sup>) se sembraron en un tubo inclinado de ASTEL R<sup>+</sup>. El tubo se mantuvo entre 4 y 7°C y se resembró una vez al mes.

### 5.2.2.2 INDUCCIÓN A LA ÁCIDO RESISTENCIA

Phan-Thanh y *col.*, (2000) observaron que en la fase estacionaria de crecimiento *Listeria monocytogenes* es capaz de desarrollar ácido resistencia, si antes se adapta a un ambiente ácido con valores no letales por unas horas. Primero se hicieron pruebas con la cepa de *L. monocytogenes* para identificar un pH ácido no letal para *Listeria monocytogenes* L8, se probaron con valores de pH 4 y 5 y se tomaron 1.5 y 2 horas como tiempo prueba de la ácido resistencia durante la incubación.

Se obtuvieron células en fase estacionaria, suspendidas en CSTEEL, de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 5.2.1.1. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 3000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante, se suspendieron en SSI y se hizo cuenta viable en ASTEL. A continuación, se inocularon tubos con CSTEEL acidificado con ácido cítrico a pH 5 y 5.8, tomando como control inóculo en CSTEEL a pH 7. Los tubos se incubaron en baño de agua a 1.5 y 2 horas a 35° C. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 3000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y se suspendieron en solución de ácido cítrico

a pH 2.5. Este subcultivo se incubó en baño de agua por una hora a 35° C. Inmediatamente se hicieron recuentos por vaciado en placa con ASTEL. Todas las diluciones se hicieron en buffer de fosfatos 0.25 M, pH 7 con cloruro de sodio al 0.9% (p/v).

### **5.2.2.3 ESTUDIO DEL EFECTO DEL NÚMERO DE CHOQUES APLICADOS, LA CAVITACIÓN, LA LUZ PRODUCIDA POR LA DESCARGA ELÉCTRICA Y EL TIPO DE REFLECTOR SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS EN FASE ESTACIONARIA DE UNA CEPA ÁCIDO RESISTENTE Y RESISTENTE A RIFAMPICINA DE *Listeria monocytogenes*, SUSPENDIDA EN SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA**

Con el valor de pH y el tiempo de incubación identificados para la inducción a la ácido resistencia, se prepararon las células R<sup>+</sup> para los tratamientos con las ondas de choque. Las células R<sup>+</sup> se obtuvieron en fase estacionaria, suspendidas en CSTEEL R<sup>+</sup> de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 5.2.1.1, se recuperaron mediante centrifugación a 3000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y se suspendieron en SSI acidificada con ácido cítrico a pH 5. Esta suspensión se incubó a 35° C por 1.5 horas. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 3000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y se suspendieron en buffer de fosfatos pH 6.4 con NaCl al 0.9% (p/v). Con esta suspensión se llenaron los viales de propileno.

En la aplicación del tratamiento se utilizaron los reflectores E3 y E4. El efecto de la cavitación y de la luz se evaluó de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.2.1.1. A la mitad de los viales se les aplicaron 350 ondas de choque (14 min 35 s) y a la otra mitad 500 (20 min 50 s) ondas de choque. Para evaluar la efectividad de los tratamientos sobre la viabilidad del microorganismo se hicieron diluciones en diluyente de peptona al 0.1% (p/v) y se hicieron recuentos por vaciado en placa con ASTEL R<sup>+</sup>. Las placas se incubaron a 35° C por 24 horas. El Cuadro 6 muestra el diseño experimental del objetivo 2.

**Cuadro 6.** Diseño experimental del objetivo 2.

<b>Tratamiento</b>	<b>Reflector</b>	<b>Luz</b>	<b>Cavitación</b>	<b>Choques</b>
1	E4	Si	100 %	500
2	E4	Si	75 %	350
3	E4	No	100 %	350
4	E4	No	75 %	500
5	E3	No	75 %	350
6	E3	No	100 %	500
7	E3	Si	100 %	350
8	E3	Si	75 %	500



El experimento se realizó por triplicado y los resultados se analizaron con el programa R (Ihaka y Gentleman, 1996), mediante un análisis de varianza (ANDEVA). Las réplicas se trataron estadísticamente como bloques. Para este objetivo se utilizó la mitad de un diseño factorial  $2^4$  (Box y col., 1978).

### **5.2.3 OBJETIVO ESPECÍFICO 3**

#### **5.2.3.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

Se obtuvieron células R<sup>+</sup> en fase estacionaria suspendidas en CSTEEL R<sup>+</sup>, de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 5.2.1.1. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 3000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y se suspendieron en SSI acidificada con ácido cítrico a pH 5. Este subcultivo se incubó en baño de agua por 1.5 horas a 35° C. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en buffer de fosfatos 0.25 M, pH 6.4 (NaCl) al 0.9% (p/v). En esta suspensión se obtuvieron aproximadamente  $10^9$  UFC/ml, esta suspensión se utilizó para preparar los niveles de inóculo evaluados:  $\sim 10^8$  UFC/ml (inóculo alto) y  $\sim 10^4$  UFC/ml (inóculo bajo). En ambos casos se utilizan 0.01 ml de inóculo por ml de jugo.

#### **5.2.3.2 DETERMINACIÓN DE LA FLORA NATIVA DEL JUGO DE NARANJA**

Se agregaron 10 ml de jugo de naranja inoculado a 90 ml de buffer de fosfatos con NaCl, y se hizo un recuento por vaciado en placa con ASTEL y ASTEL R<sup>+</sup>. La diferencia entre las cuentas obtenidas en los 2 medios se consideró como flora nativa. Esto se hizo con el inóculo alto y el inóculo bajo.

### **5.2.3.3 OBTENCIÓN DEL JUGO DE NARANJA**

El jugo se obtuvo asépticamente en el laboratorio a partir de naranjas obtenidas del supermercado en buen estado, libres de daños físicos, de tamaño y color uniforme. Las naranjas se lavaron con detergente, frotando enérgicamente y se secaron. Se partieron y exprimieron manualmente en condiciones asépticas. El jugo de la naranja se filtró dos veces utilizando una malla metálica estéril.

### **5.2.3.4 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL JUGO FRESCO**

El jugo de naranja se diluyó en buffer de fosfatos con NaCl, y se realizaron recuentos por vaciado en placa de bacterias mesófilas aerobias en Agar cuenta estándar (ACE), de organismos coliformes en Agar rojo bilis violeta (ARBV) y para identificar hongos y levaduras en Agar papa dextrosa (APD) adicionado de 130 ppm de Rosa de Bengala y 0.02% de Gentamicina.

### **5.2.3.5 ESTUDIO DEL EFECTO DEL NÚMERO DE CHOQUES APLICADOS, LA CAVITACIÓN, LA LUZ PRODUCIDA POR LA DESCARGA ELÉCTRICA Y EL NIVEL DE INÓCULO SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS EN FASE ESTACIONARIA DE UNA CEPA ÁCIDO RESISTENTE Y RESISTENTE A RIFAMPICINA DE *Listeria monocytogenes*, SUSPENDIDA EN JUGO DE NARANJA**

Se utilizó el reflector E3. Los viales se llenaron al 75% con los dos niveles de inóculo. La mitad de los viales de los tratamientos se cubrieron con una bolsa de polipropileno negra para bloquear la luz y la otra mitad de los viales se cubrió con una bolsa de polipropileno transparente. A la mitad de los tratamientos se les aplicaron 350 ondas de choque (14 min 35 s) y a la otra mitad 500 ondas de choque (20 min 50 s). Para evaluar la efectividad de los tratamientos sobre la viabilidad del microorganismo se hicieron diluciones en buffer de fosfato con NaCl

al 0.9% y se realizaron recuentos por vaciado en placa con ASTEL R<sup>+</sup>. Las placas se incubaron a 35° C por 24 horas. El Cuadro 7 muestra el diseño experimental del objetivo 3.

El experimento se realizó por duplicado y los resultados se analizaron con el programa R (Ihaka y Gentleman, 1996), mediante un análisis de varianza (ANDEVA). Las réplicas se trataron estadísticamente como bloques. Para este objetivo se utilizó un diseño factorial 2<sup>3</sup> (Box y *col.*, 1978). En todos los objetivos, para comprobar la eficacia de los tratamientos se determinó la diferencia entre la población viable de las muestras sometidas a los diferentes tratamientos (N) con sus respectivos controles (N<sub>0</sub>), de acuerdo con la Ecuación (1):

$$\text{Eficiencia} = \log (N_0) - \log (N) = \log N_0/N \quad \text{Ec. (1)}$$

**Cuadro 7.** Diseño experimental del objetivo 3.

<b>Tratamiento</b>	<b>Inóculo</b>	<b>Luz</b>	<b>Choques</b>
1	alto	No	350
2	alto	Si	350
3	alto	No	500
4	alto	Si	500
5	bajo	Si	500
6	bajo	No	350
7	bajo	Si	350
8	bajo	No	500

alto  $\sim 10^8$  UFC/ml

bajo  $\sim 10^4$  UFC/ml

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 OBJETIVO ESPECÍFICO 1**

#### **6.1.1 ESTUDIO DEL EFECTO DEL NÚMERO DE CHOQUES APLICADOS, LA CAVITACIÓN, LA LUZ PRODUCIDA POR LA DESCARGA ELÉCTRICA Y EL TIPO DE REFLECTOR SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS EN FASE ESTACIONARIA DE UNA CEPA ÁCIDO RESISTENTE Y RESISTENTE A RIFAMPICINA DE *Listeria monocytogenes*, SUSPENDIDA EN SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA**

En solución salina isotónica *L. monocytogenes* mostró susceptibilidad a las ondas de choque. La mayor inactivación, de 3.19 log<sub>10</sub>, se logró en células en fase estacionaria, aplicando 350 ondas de choque, permitiendo el paso de la luz, en viales con cavitación aumentada (Cuadro 8, Tratamiento 1). La segunda mejor inactivación, 2.71 log<sub>10</sub>, se obtuvo en las células de fase exponencial aplicando 150 ondas de choque, permitiendo el paso de la luz, en viales con cavitación aumentada (Cuadro 8, Tratamiento 5). La inactivación fue menor a un log<sub>10</sub> en los tratamientos donde se bloqueó el paso de la luz, independientemente del nivel de cavitación y en los tratamientos donde se permitió el paso de la luz con nivel de cavitación normal.

El análisis de varianza (ANDEVA) (Cuadro 9), mostró que la interacción entre el nivel de cavitación y la luz producida por la descarga eléctrica (Figura 6) contribuyó significativamente a la inactivación observada ( $p \leq 0.05$ ). Así mismo, mostró que la inactivación fue independiente del número de ondas de choque aplicadas y que las células en fase estacionaria son tan susceptibles a la cavitación y a la luz como las células en fase exponencial (Cuadro 9).

**Cuadro 8.** Diseño experimental e inactivación logarítmica lograda en el objetivo 1.

Tratamiento	Luz	No. de ondas de choque	Nivel de cavitación	Fase de crecimiento	Reducción de viabilidad $\log_{10} (N_0/N)^a$ (UFC/ml) <sup>b</sup>
1	Si	350	Aumentada	Estacionaria	$3.19 \pm 0.02$
2	No	350	Normal	Estacionaria	$0.03 \pm 0.08$
3	Si	150	Normal	Estacionaria	$0.18 \pm 0.18$
4	No	150	Normal	Exponencial	$0.1 \pm 0.11$
5	Si	150	Aumentada	Exponencial	$2.71 \pm 0.66$
6	No	150	Aumentada	Estacionaria	$-0.06 \pm 0.11$
7	Si	350	Normal	Exponencial	$0.24 \pm 0.69$
8	No	350	Aumentada	Exponencial	$0.81 \pm 1.1$

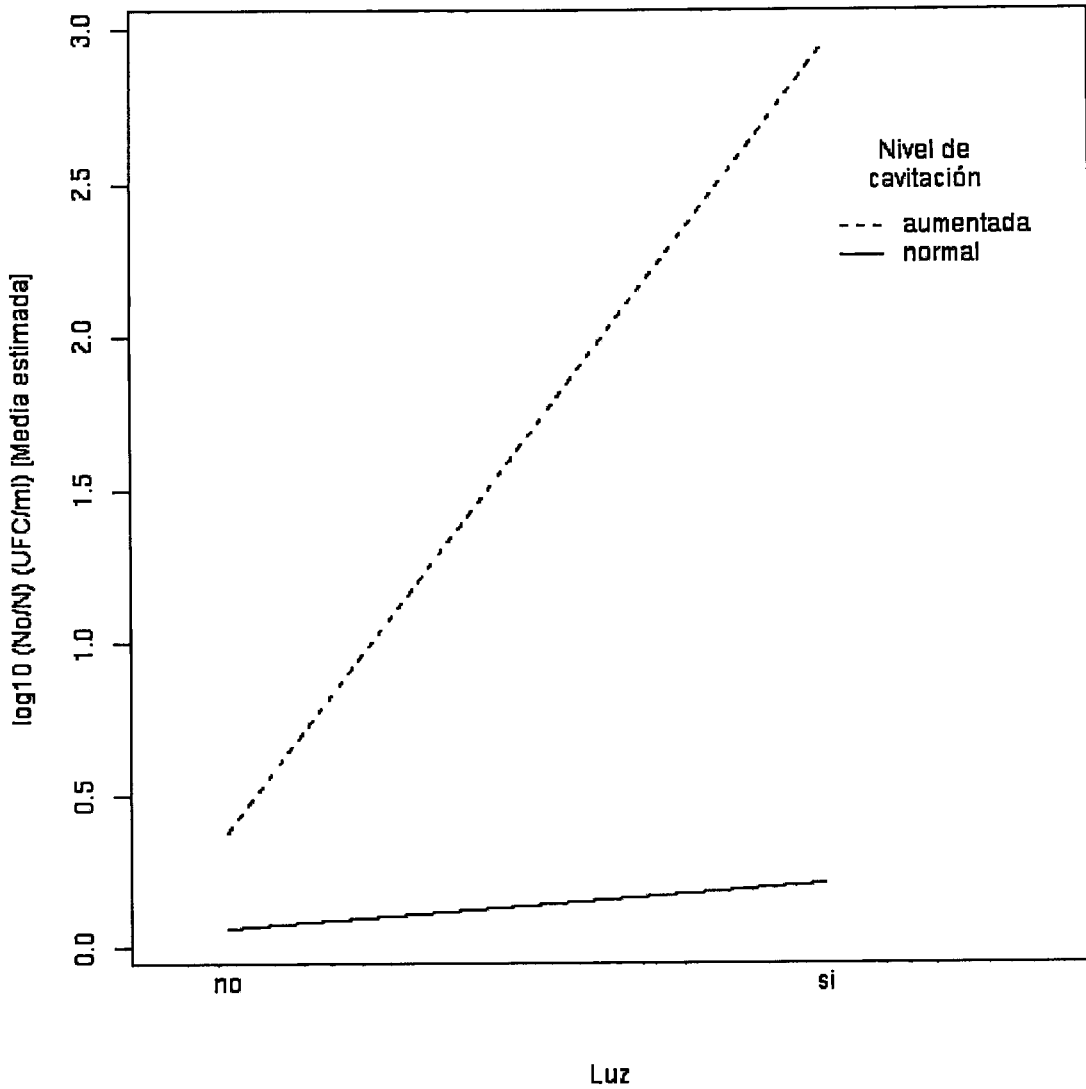
<sup>a</sup> Media de tres réplicas independientes  $\pm$  una desviación estándar.  $N_0$  representa la cuenta viable en los viales control;  $N$  representa la cuenta viable en los viales tratados.

<sup>b</sup> Inóculo inicial: 8-9  $\log_{10}$  UFC/ml.

**Cuadro 9.** ANDEVA de la inactivación logarítmica de *L. monocytogenes* para el objetivo 1.

<b>Fuente</b>	<b>Grados libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrados medios</b>	<b>Valor F</b>	<b>P (&gt;F)</b>	
Luz	1	11.0976	11.0976	57.4080	0.0002747	***
Cavitación	1	13.9538	13.9538	72.1829	0.0001455	***
Fase crecimiento	1	0.1014	0.1014	0.5245	0.4961680	
Choques	1	0.6733	0.6733	3.4832	0.1112410	
Bloque	2	0.7275	0.3638	1.8817	0.2320894	
Luz:cavitación	1	8.8088	8.8088	45.5681	0.0005153	***
Luz:fase	1	0.6936	0.6936	3.5880	0.1070269	
Luz:choques	1	0.0280	0.0280	0.1449	0.7165420	
Luz:bloques	2	0.7951	0.3976	2.0565	0.2088364	
Cavitación:bloques	2	0.1497	0.0748	0.3872	0.6947705	
Fase:bloque	2	0.9325	0.4663	2.4119	0.1703377	
Choques:bloque	2	0.6156	0.3078	1.5923	0.2787961	
Residuales	6	1.1599	0.1933			

Códigos de significancia: 0 \*\*\* 0.001 \*\* 0.01 \* 0.05 . 0.1 ' 1



**Figura 6.** Inactivación logarítmica estimada, debida a la interacción entre la luz generada por la descarga eléctrica y el nivel de cavitación.



La Figura 6 muestra que la mayor inactivación se logró en viales con la cavitación aumentada, permitiendo el paso de la luz. En los viales con nivel de cavitación normal, la disminución fue cercana a cero, tanto en los viales donde se permitió el paso de la luz como donde se bloqueó la misma. En el Cuadro 10 se observa la disminución logarítmica de *L. monocytogenes* en las tres réplicas hechas después de la aplicación de los tratamientos correspondientes al objetivo 1. En la Figura 7 se pueden ver las medias de la inactivación logarítmica después de la aplicación de los tratamientos en el objetivo 1.

### 6.1.2 RESISTENCIA TÉRMICA

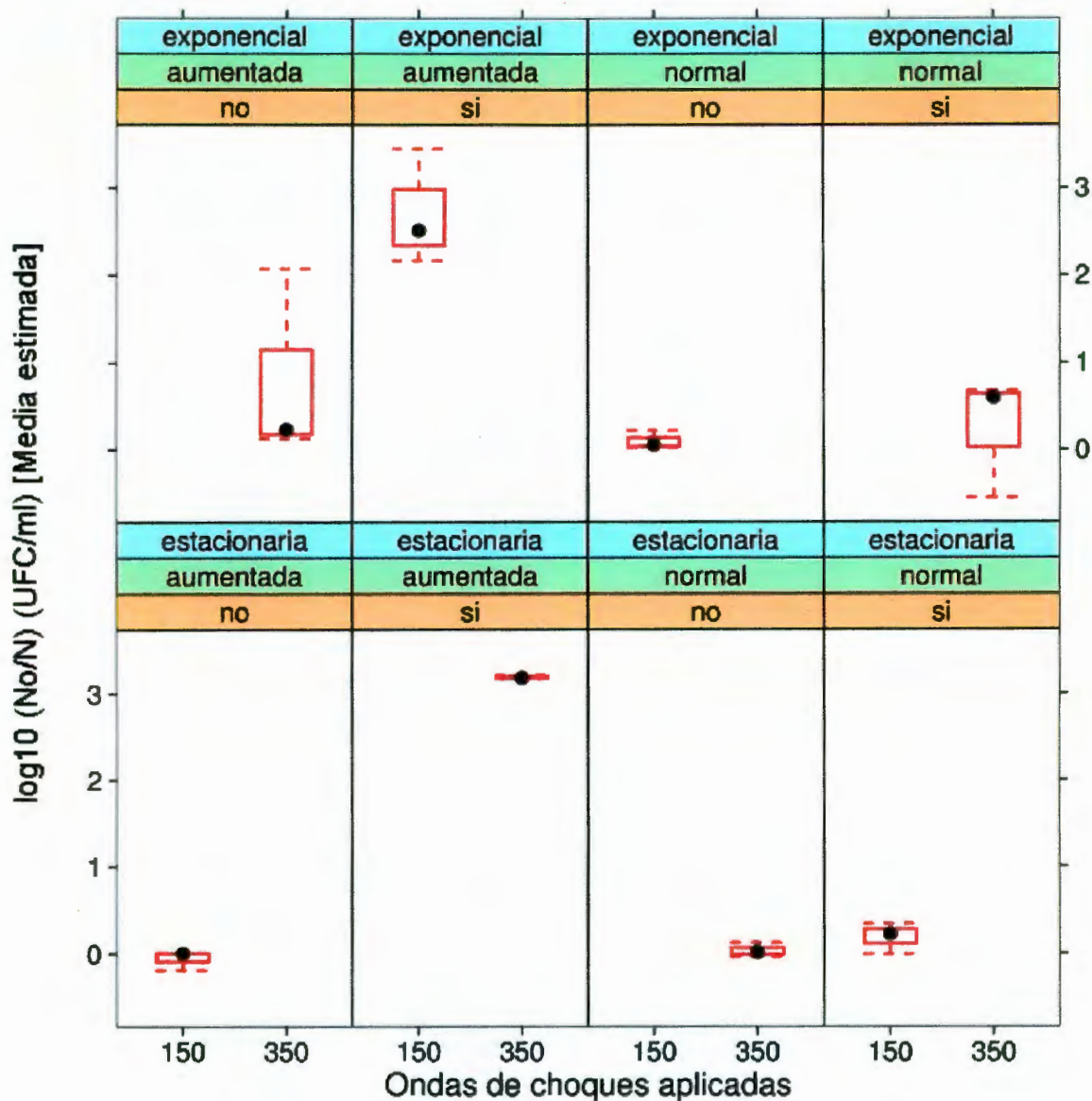
Los valores  $D$  observados (Cuadro 11) a 50, 55 y 60° C para la fase exponencial fueron 9.6, 1.77 y 0.37 min, respectivamente. Para la fase estacionaria fueron 57.57, 1.79, 0.44 min a 50, 55 y 60° C, respectivamente. A 55 y 60° C los valores  $D$  fueron muy similares para ambas fases de crecimiento; sin embargo, fueron muy diferentes a 50° C, donde el valor  $D$  para la fase estacionaria fue casi 6 veces mayor que el de la fase exponencial. El Cuadro 12 presenta los resultados obtenidos de la cuenta viable de *L. monocytogenes* después del choque térmico. La Figura 8 muestra la inactivación térmica de *Listeria* a 50, 55 y 60° C, suspendida en solución salina isotónica.

**Cuadro 10.** Disminución logarítmica de *L. monocytogenes* después de la aplicación de los tratamientos correspondientes al objetivo 1.

OBJETIVO 1							
Tratamiento	Luz	Nivel de cavitación	Fase de crecimiento	No. de ondas de choque	$\log_{10} (N_0/N)^a$ (UFC/ml) <sup>b</sup>		
					1ª réplica	2ª réplica	3ª réplica
1	Si	75 %	Estacionaria	350	3.21	3.17	3.18
2	No	100 %	Estacionaria	350	-0.04	0.12	0.01
3	Si	100 %	Estacionaria	150	0.22	0.34	0
4	No	100 %	Exponencial	150	0.05	0.02	0.22
5	Si	75 %	Exponencial	150	3.45	2.17	2.51
6	No	75 %	Estacionaria	150	0	-0.19	0.01
7	Si	100 %	Exponencial	350	0.68	0.44	0.60
8	No	75 %	Exponencial	350	0.13	0.23	2.08

<sup>a</sup>  $N_0$  representa la cuenta viable en los viales control;  $N$  representa la cuenta viable en los viales tratados.

<sup>b</sup> Inóculo inicial: 8-9  $\log_{10}$  UFC/ml.



**Figura 7.** Medias de la inactivación logarítmica de *L. monocytogenes* después de la aplicación de los tratamientos en el objetivo 1, en función del número de ondas de choques aplicadas y de la fase de crecimiento, el nivel de cavitación y el paso de la luz generada por la descarga eléctrica. El punto negro representa la media de las réplicas independientes, las cajas los cuantiles a 25 y 75% y las barras los valores extremos observados.

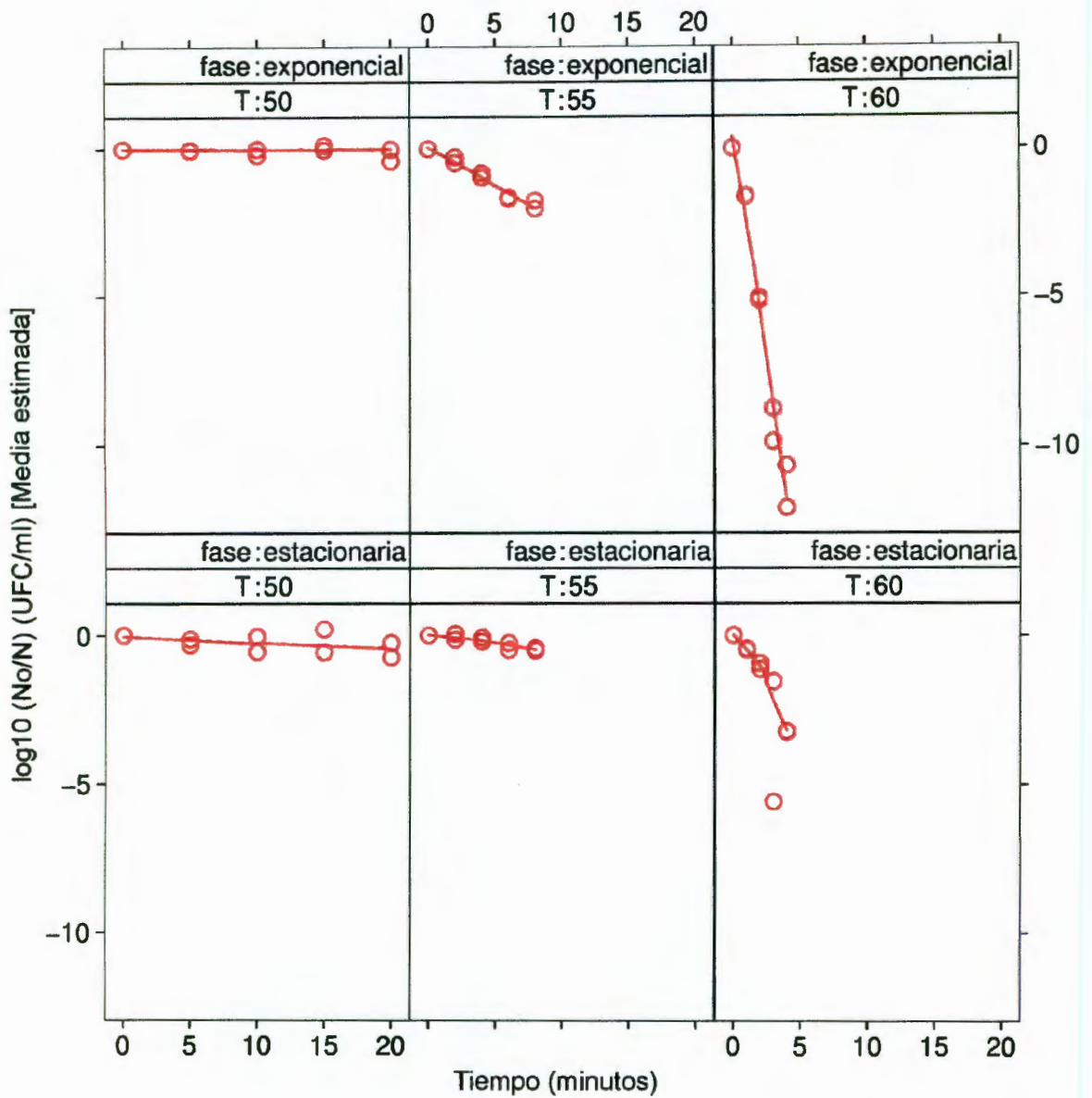
**Cuadro 11.** Valores *D* (min) en solución salina isotónica para *Listeria monocytogenes*.

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Valores <i>D</i> (min)</b>	
	<b>Fase exponencial</b>	<b>Fase estacionaria</b>
<b>50</b>	9.6	57.57
<b>55</b>	1.77	1.79
<b>60</b>	0.37	0.44

**Cuadro 12.** Resultados de la cuenta viable de *L. monocytogenes* después del choque térmico.

		<b>log<sub>10</sub> N<sup>a</sup> (UFC/ml)</b>			
		<b>FASE EXPONENCIAL</b>		<b>FASE ESTACIONARIA</b>	
<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>1<sup>a</sup> réplica</b>	<b>2<sup>a</sup> réplica</b>	<b>1<sup>a</sup> réplica</b>	<b>2<sup>a</sup> replica</b>
50° C	0	7.25	8.31	8.77	11.58
	5	7.69	0	8.77	11.58
	10	7.16	7.61	8.63	11.57
	15	5.84	6.82	8.02	11.54
	20	0	6.77	7.89	12.01
	55° C	0	7.82	0.57	8.85
55° C	2	7.15	7.34	8.56	8.35
	4	4.65	5.23	7.10	7.28
	6	4.06	4.29	5.62	5.81
	8	3.63	3.45	4.04	4.99
	60° C	0	8.07	7.75	8.88
60° C	0.5	7.83	7.66	8.72	8.61
	1	5.97	6.27	8.14	8.13
	1.5	3.86	6.83	5.11	5.49
	2	4.02	2.28	4.99	4.81

<sup>a</sup> N representa la cuenta viable después de cada experimento.



**Figura 8.** Inactivación térmica de *Listeria monocytogenes* a 50, 55 y 60° C, suspendida en solución salina isotónica.

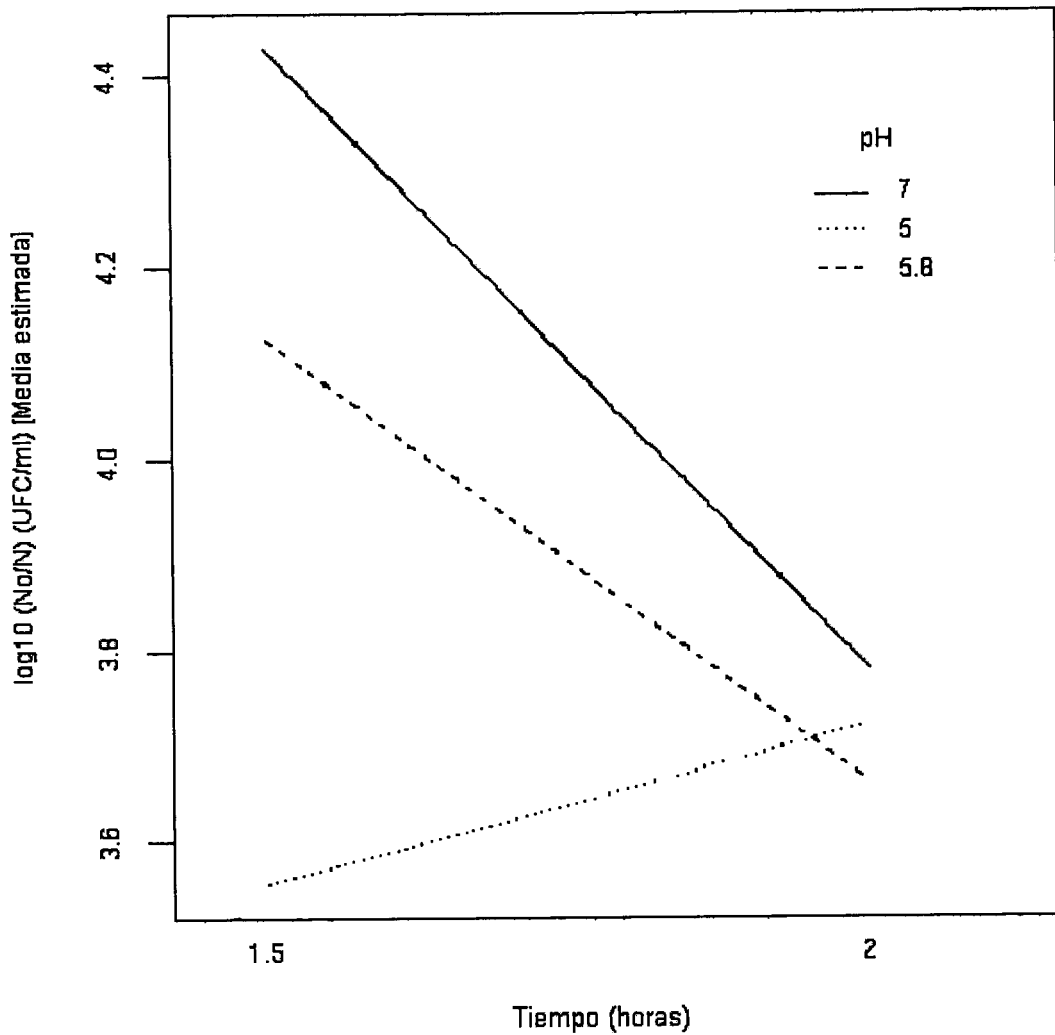
## 6.2 OBJETIVO ESPECÍFICO 2

### 6.2.1 INDUCCIÓN DE LA ÁCIDO RESISTENCIA

Los resultados muestran que la interacción entre el tiempo y el pH es esencial para inducir la ácido resistencia. *Listeria monocytogenes* desarrolló ácido resistencia en un medio acidificado a pH 5 con ácido cítrico después de 1.5 horas de incubación. La Figura 9 muestra el comportamiento de *L. monocytogenes* a diferentes valores de pH, respecto del tiempo. A valores de pH 5.8 y 7 se observa un comportamiento similar, después de 1.5 y 2 horas de incubación; la inactivación es continua. A pH 5, 1.5 horas de incubación en el medio acidificado fueron suficientes para desarrollar ácido resistencia. El Cuadro 13 presenta los resultados de la inducción a la ácido resistencia de *L. monocytogenes*, suspendida en CSTEEL acidificado con ácido cítrico a pH 5 y 5.8. La Figura 10 muestra las medias de la inactivación logarítmica después de la inducción a la ácido resistencia, en función del tiempo y del pH.

### 6.2.2 ESTUDIO DEL EFECTO DEL NÚMERO DE CHOQUES APLICADOS, LA CAVITACIÓN, LA LUZ PRODUCIDA POR LA DESCARGA ELÉCTRICA Y EL TIPO DE REFLECTOR SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS EN FASE ESTACIONARIA DE UNA CEPA ÁCIDO RESISTENTE Y RESISTENTE A RIFAMPICINA DE *Listeria monocytogenes*, SUSPENDIDA EN SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA

La mayor inactivación fue de 7.04  $\log_{10}$ ; se logró aplicando 500 ondas de choque, permitiendo el paso de la luz, en viales con cavitación aumentada y utilizando el reflector E3 (Cuadro 14, Tratamiento 8). La segunda mejor inactivación, de 3.59  $\log_{10}$ , se obtuvo aplicando 350 ondas de choque; permitiendo el paso de la luz, en viales con cavitación aumentada, utilizando el reflector E4 (Cuadro 14, Tratamiento 2). Comparando con el reflector E4, la disminución logarítmica se incrementó casi al doble utilizando el reflector E3.



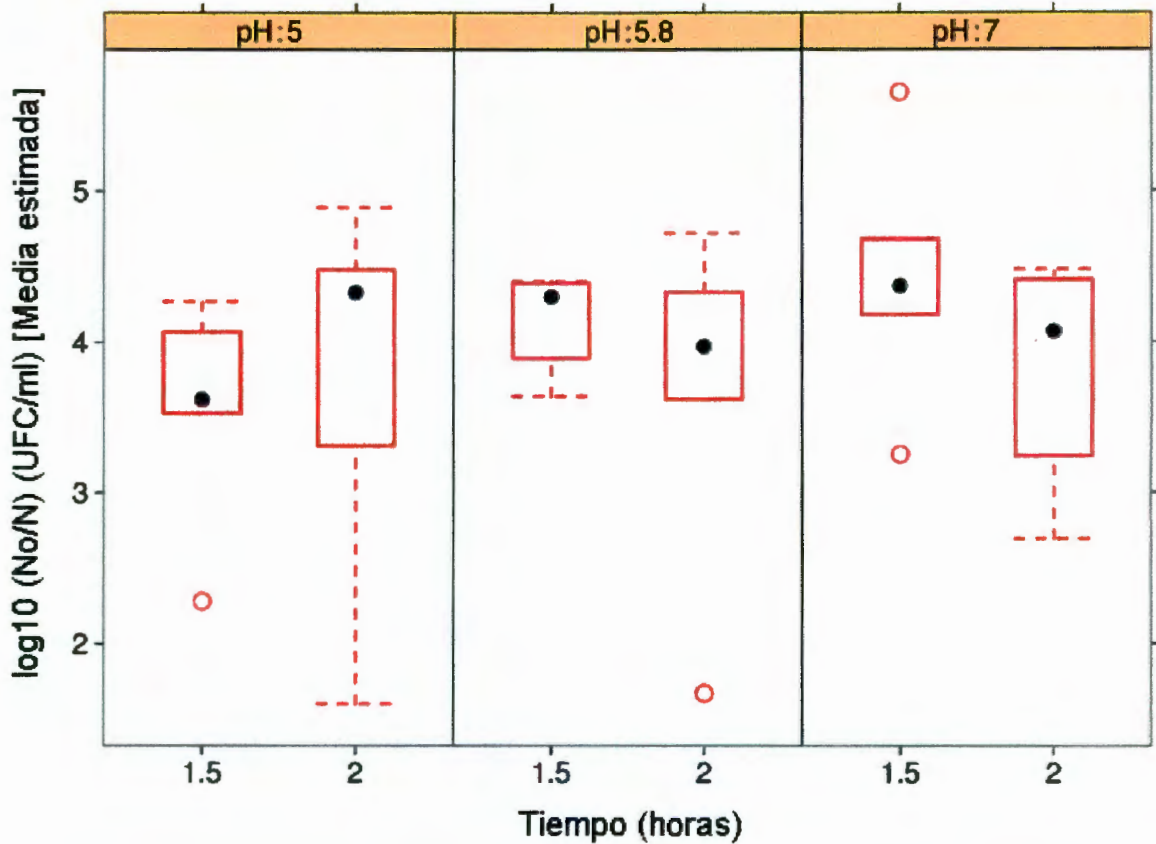
**Figura 9.** Comportamiento de *Listeria monocytogenes* durante la Inducción de la ácido resistencia en caldo soya tripticasa acidificado con ácido cítrico a pH 5 y 5.8, respecto del tiempo. El control fue en CSTEL a pH 7.



**Cuadro 13.** Resultados de la inducción a la ácido resistencia de *Listeria monocytogenes*, suspendida en CSTEEL acidificado con ácido cítrico a pH 5 y 5.8.

		<b>log<sub>10</sub> N<sup>a</sup> (UFC/ml)</b>				
		<b>Réplicas</b>				
<b>Tiempo</b>	<b>pH</b>	<b>1<sup>a</sup></b>	<b>2<sup>a</sup></b>	<b>3<sup>a</sup></b>	<b>4<sup>a</sup></b>	<b>5<sup>a</sup></b>
1.5 h	5	3.80	5.84	4.23	6.32	3.52
	5.8	3.64	5.01	4.04	5.53	3.49
	7	3.56	5.62	3.70	6.62	2.56
2 h	5	3.01	6.52	3.30	7.45	3.53
	5.8	4.05	6.51	4.30	6.97	3.33
	7	4.16	6.16	3.70	6.65	3.87

<sup>a</sup> N representa la cuenta viable después de cada experimento.



**Figura 10.** Medias de la inactivación logarítmica de *L. monocytogenes*, después de la inducción a la ácido resistencia, en función del tiempo y del pH (5, 5.8 y 7.0). El punto negro representa la media de las réplicas independientes, las cajas los cuantiles a 25 y 75% y las barras los valores extremos observados.

**Cuadro 14.** Diseño experimental e inactivación logarítmica lograda en el objetivo 2.

Tratamiento	Reflector	Luz	Nivel de cavitación	No. de ondas de choque	Reducción de viabilidad $\log_{10} (N_0/N)^a$ (UFC/ml) <sup>b</sup>
1	E4	Si	normal	500	$0.62 \pm 0.08$
2	E4	Si	umentada	350	$3.59 \pm 0.88$
3	E4	No	normal	350	$-0.25 \pm 0.39$
4	E4	No	umentada	500	$-0.02 \pm 0.04$
5	E3	No	umentada	350	$-0.07 \pm 0.09$
6	E3	No	normal	500	$0.08 \pm 0$
7	E3	Si	normal	350	$0.95 \pm 0.12$
8	E3	Si	umentada	500	$7.04 \pm 0.39$

<sup>a</sup> Media de tres réplicas independientes  $\pm$  una desviación estándar.  $N_0$  representa la cuenta viable en los viales control;  $N$  representa la cuenta viable en los viales tratados.

<sup>b</sup> Inóculo inicial: 8-9  $\log_{10}$  UFC/ml.

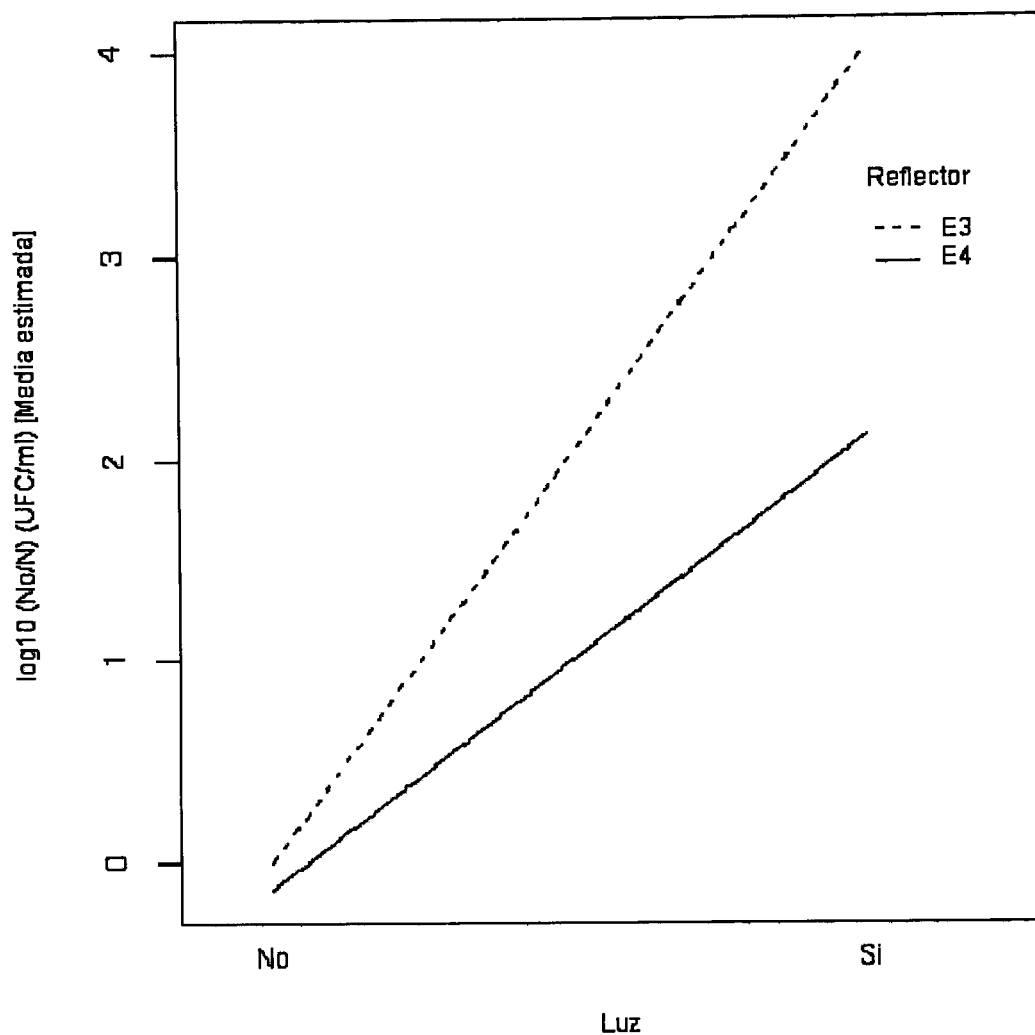
Al igual que en el objetivo 1, en los tratamientos donde se bloqueó el paso de la luz la inactivación fue menor a un  $\log_{10}$ , independientemente del nivel de cavitación. El ANDEVA (Cuadro 15), indicó que las interacciones estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) fueron entre el reflector y la luz (Figura 11), el reflector y el nivel de cavitación (Figura 12) y entre el reflector y el número de ondas de choque aplicadas (Figura 13). La Figura 11 muestra que la mejor inactivación se logró utilizando el reflector E3, permitiendo el paso de la luz. En la Figura 12 se observa que la mejor inactivación logarítmica se obtuvo en los viales con el nivel de cavitación aumentada, utilizando el reflector E3, en los viales con el nivel de cavitación normal la inactivación fue menor a 1 para el reflector E3 y el E4.

La Figura 13 presenta la mayor inactivación utilizando el reflector E3, aplicando 500 ondas de choque, y la mejor inactivación que se logra utilizando el reflector E4, es con 350 ondas de choque. El Cuadro 16 muestra la disminución logarítmica después de la aplicación de los tratamientos en las tres réplicas hechas. En la Figura 14 se observan las medias de la inactivación logarítmica de *Listeria* después de la aplicación de los tratamientos en el objetivo 2.

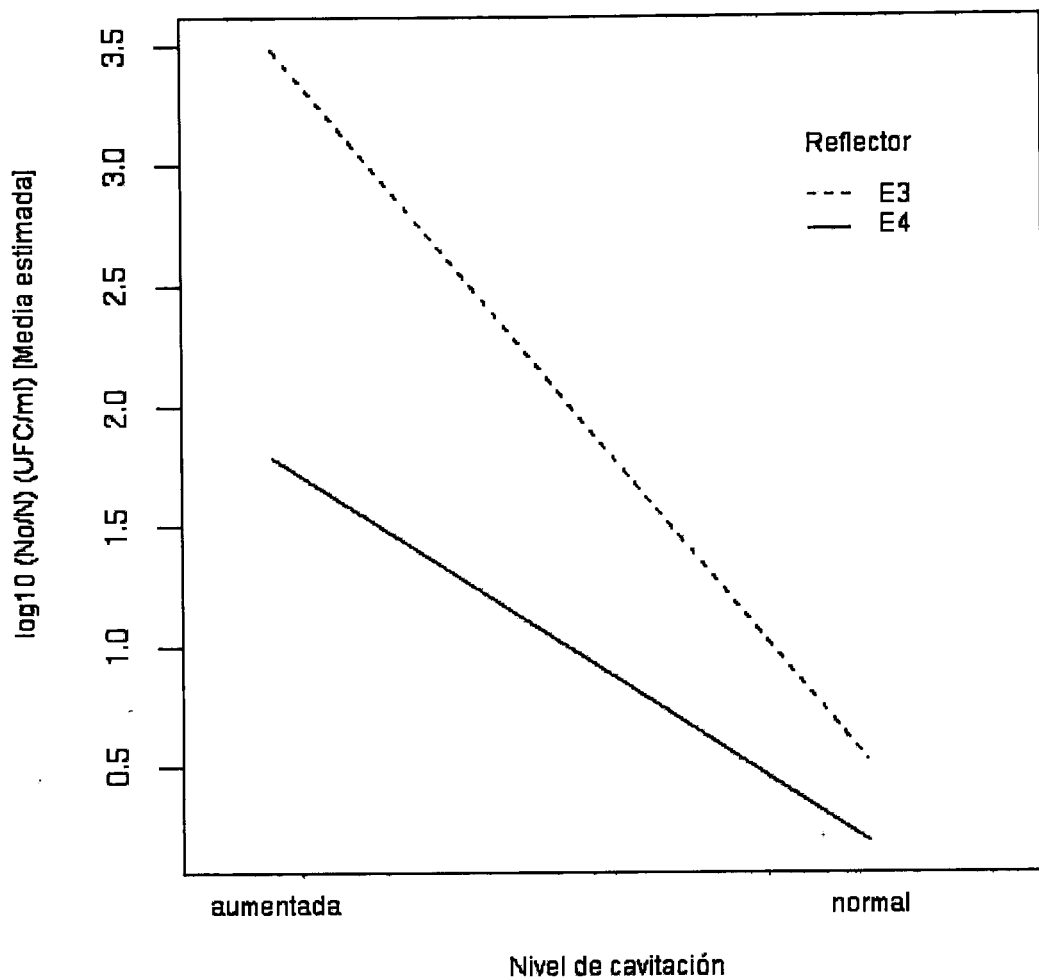
**Cuadro 15.** ANDEVA de la inactivación logarítmica de *L. monocytogenes* en el objetivo 2.

Fuente	Grados libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	P (>F)	
Luz	1	38.969	38.969	365.511	1.324E-06	***
Cavitación	1	20.908	20.908	196.106	8.269E-06	***
Choques	1	3.071	3.071	28.807	0.001716	**
Reflector:luz	1	3.071	3.071	28.807	0.001716	**
Reflector: cavitación	1	1.856	1.856	17.412	0.005860	**
Reflector: choques	1	20.183	20.183	189.304	9.167E-06	***
Residuales	6	0.640	0.107			

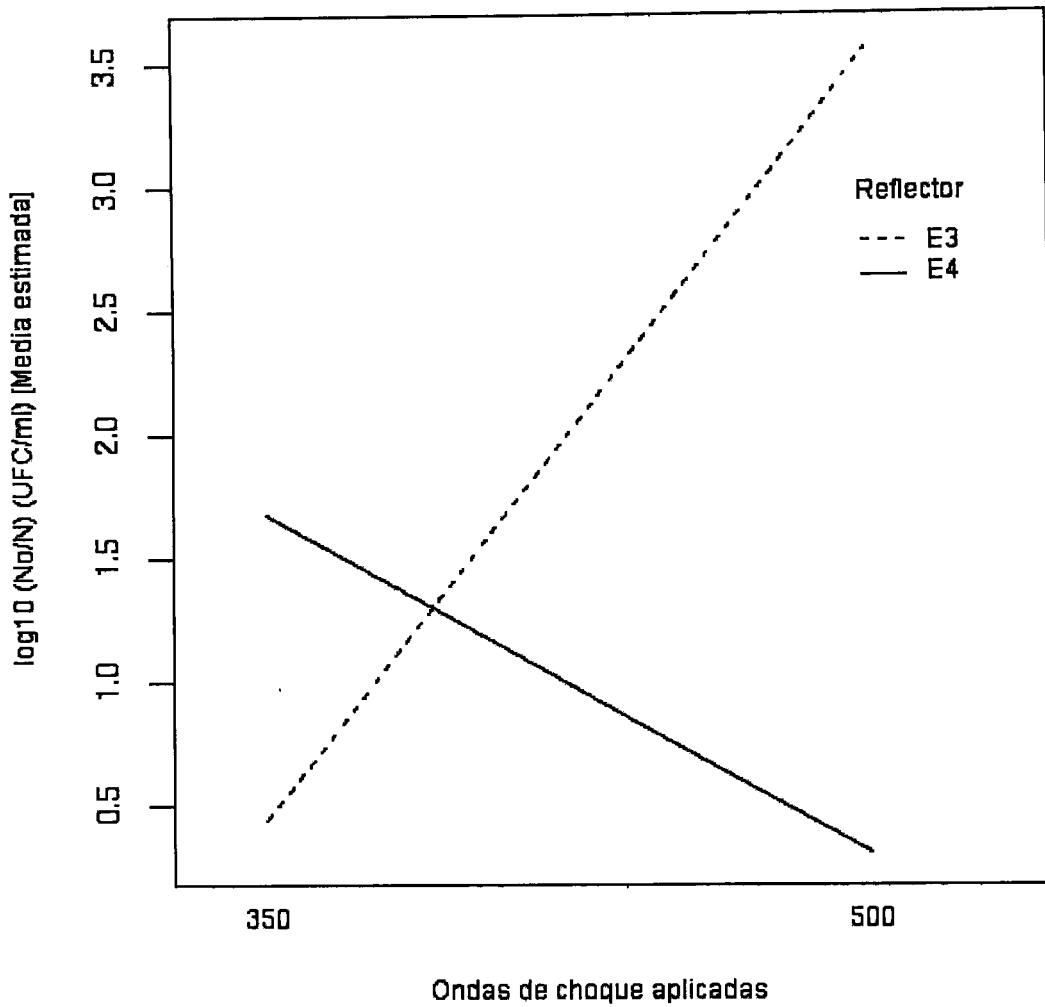
Códigos de significancia: 0 \*\*\* 0.001 \*\* 0.01 \* 0.05 . 0.1 ' 1



**Figura 11.** Inactivación logarítmica estimada debida a la interacción entre el reflector utilizado (E3 o E4) y la luz generada por la descarga eléctrica.



**Figura 12.** Inactivación logarítmica estimada debida a la interacción entre el reflector utilizado (E3 o E4) y el nivel de cavitación en los viales.



**Figura 13.** Inactivación logarítmica estimada debida a la interacción entre el reflector utilizado (E3 o E4) y el número de ondas de choque aplicadas.

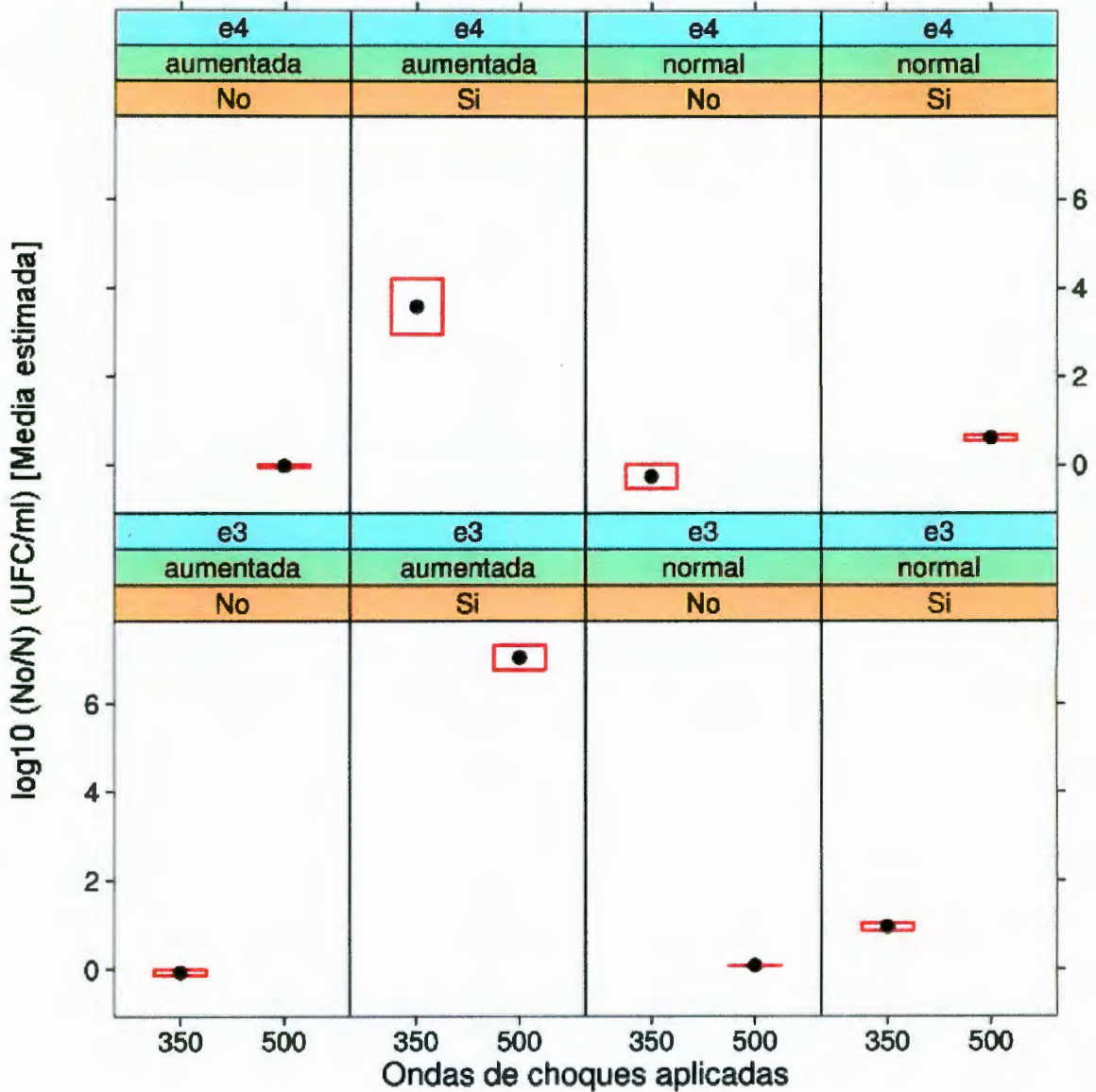


**Cuadro 16.** Disminución logarítmica de *L. monocytogenes* después de la aplicación de los tratamientos correspondientes al objetivo 2.

OBJETIVO 2							
Tratamiento	Reflector	Luz	Nivel de cavitación	No. de ondas de choque	$\log_{10} (N_0/N)^a$ (UFC/ml) <sup>b</sup>		
					1ª réplica	2ª réplica	3ª réplica
1	E4	Si	100 %	500	0.68	0.56	0.29
2	E4	Si	75 %	350	4.22	2.97	2.52
3	E4	No	100 %	350	0.02	-0.53	0.57
4	E4	No	75 %	500	-0.05	0.01	-0.18
5	E3	No	75 %	350	-0.14	-0.01	-0.05
6	E3	No	100 %	500	0.08	0.08	-0.09
7	E3	Si	100 %	350	1.04	0.87	1.42

<sup>a</sup>  $N_0$  representa la cuenta viable en los viales control;  $N$  representa la cuenta viable en los viales tratados.

<sup>b</sup> Inóculo inicial: 8-9  $\log_{10}$  UFC/ml.



**Figura 14.** Medias de la inactivación logarítmica de *L. monocytogenes* después de la aplicación de los tratamientos en el objetivo 2, en función del número de ondas de choques aplicadas y el tipo de reflector, el nivel de cavitación y el paso de la luz generada por la descarga eléctrica. El punto negro representa la media de las réplicas independientes, las cajas los cuantiles a 25 y 75%.

### 6.3 OBJETIVO ESPECÍFICO 3

#### 6.3.1 ESTUDIO DEL EFECTO DEL NÚMERO DE CHOQUES APLICADOS, LA CAVITACIÓN, LA LUZ PRODUCIDA POR LA DESCARGA ELÉCTRICA Y EL NIVEL DE INÓCULO SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS EN FASE ESTACIONARIA DE UNA CEPA ÁCIDO RESISTENTE Y RESISTENTE A RIFAMPICINA DE *Listeria monocytogenes*, SUSPENDIDA EN JUGO DE NARANJA

La inactivación de *L. monocytogenes* suspendida en jugo de naranja fue nula. Ningún factor fue estadísticamente significativo. No hubo diferencia entre los viales donde se permitió el paso de la luz y en donde se bloqueó la misma, aún con el nivel de cavitación aumentada. El número de choques aplicados no influyó en la inactivación. *Listeria* no fue susceptible a las ondas de choque estando suspendida en jugo de naranja. El Cuadro 17 es el diseño experimental e inactivación logarítmica lograda en este objetivo. El Cuadro 18 es el ANDEVA de la inactivación de *Listeria* en este objetivo. El Cuadro 19 muestra la disminución logarítmica después de la aplicación de los tratamientos correspondientes para las dos réplicas hechas. En la Figura 15 se observan las medias de la inactivación logarítmica después de la aplicación de los tratamientos en el objetivo 3. El Cuadro 20 presenta los resultados del análisis microbiológico del jugo de naranja fresco.

**Cuadro17.** Diseño experimental e inactivación logarítmica  
lograda en el objetivo 3.

Tratamiento	Nivel de inóculo	Luz	No. de ondas de choque	Reducción de viabilidad $\log_{10} (N_0/N)^a$ (UFC/ml) <sup>b</sup>
1	alto	No	350	$0.02 \pm 0.11$
2	alto	Si	350	$-0.09 \pm 0.08$
3	alto	No	500	$-0.05 \pm 0.22$
4	alto	Si	500	$-0.09 \pm 0.04$
5	bajo	Si	500	$0.00 \pm 0.01$
6	bajo	No	350	$-0.02 \pm 0.08$
7	bajo	Si	350	$-0.06 \pm 0.20$
8	bajo	No	500	$-0.10 \pm 0.01$

<sup>a</sup> Media de tres réplicas independientes  $\pm$  una desviación estándar.  $N_0$  representa la cuenta viable en los viales control;  $N$  representa la cuenta viable en los viales tratados.

<sup>b</sup> Inóculo alto inicial:  $8 \log_{10}$  UFC/ml; Inóculo bajo inicial:  $4 \log_{10}$  UFC/ml.

**Cuadro 18.** ANDEVA de la inactivación logarítmica de *L. monocytogenes* en el objetivo 3.

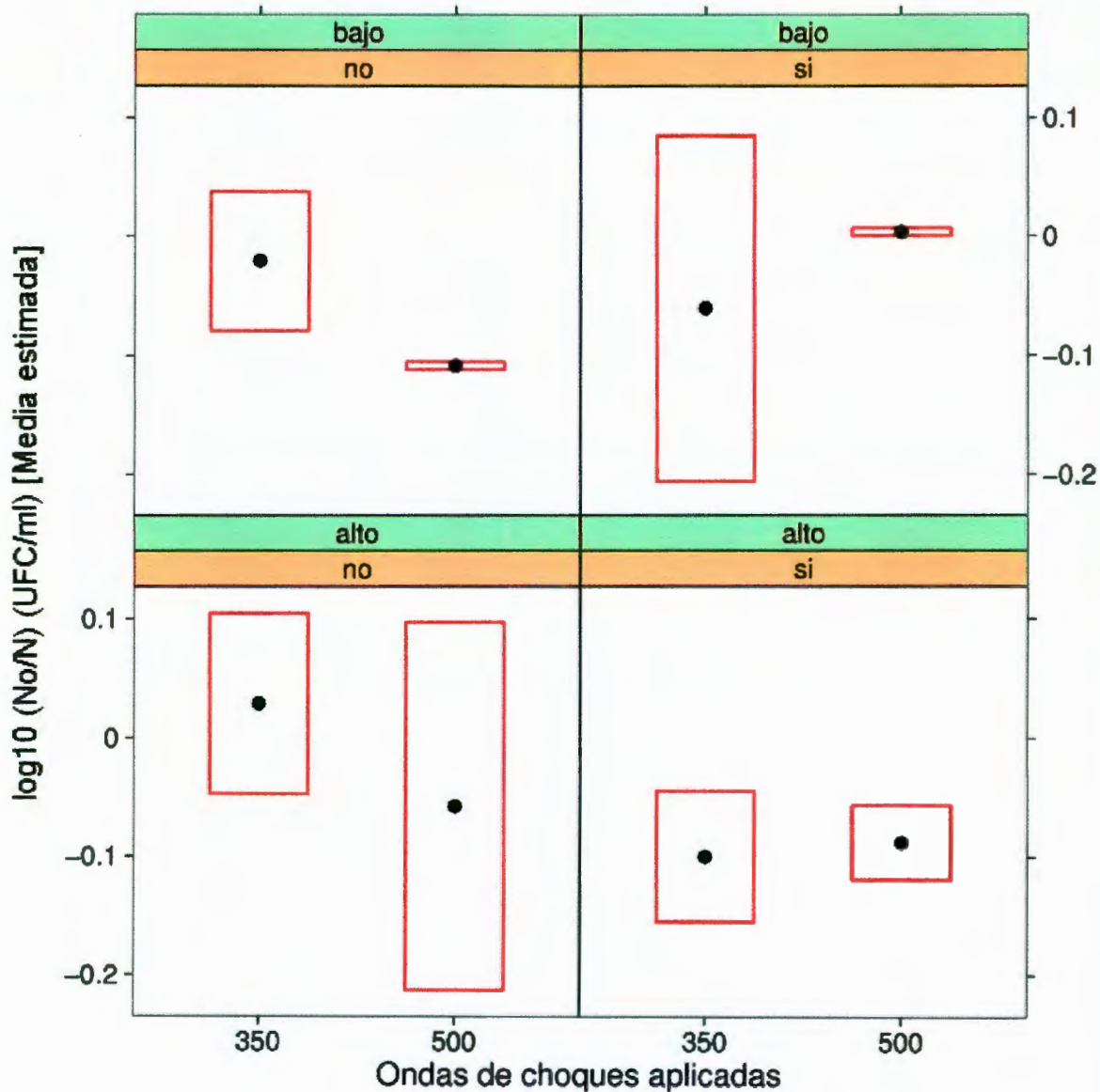
<b>Fuente</b>	<b>Grados libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrados medios</b>	<b>Valor F</b>	<b>P (&gt;F)</b>
Luz	1	0.001873	0.001873	0.1359	0.7233
Choques	1	0.002436	0.002436	0.1767	0.6868
Luz:choques	1	0.015606	0.015606	1.1318	0.3227
Luz:inóculo	1	0.013304	0.013304	0.9648	0.3587
Choques:inóculo	1	0.000640	0.000640	0.0464	0.8356
Residuales	7	0.096522	0.013789		

**Cuadro 19.** Disminución logarítmica de *L. monocytogenes* después de la aplicación de los tratamientos correspondientes al objetivo 3.

OBJETIVO 3					
Tratamiento	Nivel de Inóculo	Luz	Ondas de choque	log <sub>10</sub> (No/N) <sup>a</sup> (UFC/ml) <sup>b</sup>	
				1 <sup>a</sup> réplica	2 <sup>a</sup> réplica
1	Alto	No	350	-0.05	0.10
2	Alto	Si	350	-0.15	-0.04
3	Alto	No	500	0.10	-0.21
4	Alto	Si	500	-0.12	-0.06
5	Bajo	Si	500	0.01	0
6	Bajo	No	350	-0.08	2.85E+03
7	Bajo	Si	350	-0.21	0.08
8	Bajo	No	500	-0.05	-0.10

<sup>a</sup>  $N_0$  representa la cuenta viable en los viales control;  $N$  representa la cuenta viable en los viales tratados.

<sup>b</sup> Inóculo alto inicial: 8 log<sub>10</sub> UFC/ml; Inóculo bajo inicial: 4 log<sub>10</sub> UFC/ml.



**Figura 15.** Medias de la inactivación logarítmica de *L. monocytogenes*, después de la aplicación de los tratamientos en el objetivo 3, en función del número de ondas de choques aplicadas y el nivel de inóculo y el paso de la luz generada por la descarga eléctrica. El punto negro representa la media de las réplicas independientes, las cajas los cuantiles a 25 y 75%.

**Cuadro 20.** Análisis microbiológico del jugo de naranja fresco.

	<b>Log<sub>10</sub> N (UFC/ml)</b>	
	<b>1ª réplica</b>	<b>2ª réplica</b>
<b>Organismos coliformes</b>	7.24	3.46
<b>Bacterias mesófilas aerobias</b>	3.94	3.92
<b>Hongos y levaduras</b>	3.70	4.15



## **7. DISCUSIÓN**

### **7.1 OBJETIVO ESPECÍFICO 1**

#### **7.1.1 ESTUDIO DEL EFECTO DEL NÚMERO DE CHOQUES APLICADOS, LA CAVITACIÓN, LA LUZ PRODUCIDA POR LA DESCARGA ELÉCTRICA Y LA FASE DE CRECIMIENTO SOBRE LA VIABILIDAD DE UNA CEPA DE *Listeria monocytogenes*, SUSPENDIDA EN SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA**

De acuerdo con los resultados obtenidos en el objetivo 1, *Listeria monocytogenes* es un microorganismo susceptible a la aplicación de ondas de choque. Cabello (2003) y Herrera (2003) evaluaron la aplicación de ondas de choque en *Salmonella* Typhimurium y *Escherichia coli* 0157:H7, respectivamente, con la misma metodología utilizada en este trabajo. Comparada con *S. Typhimurium* y *E. coli* 0157:H7, *L. monocytogenes* fue el microorganismo más susceptible a las ondas de choque. En tratamientos no térmicos para la conservación de alimentos con campos eléctricos pulsados y radiación ionizante, se ha observado que los microorganismos Gram positivos son más resistentes que los microorganismos Gram negativos (Mayer, 1993; Calderón y col., 1999; Barbosa y col., 2000; Fernández, 2000). Con ondas de choque se observó lo contrario, *L. monocytogenes* el microorganismo Gram positivo, fue mucho más susceptible que *S. Typhimurium* y *E. coli* 0157:H7, los microorganismos Gram negativos.

Los tres microorganismos mostraron comportamientos diferentes en la aplicación de las ondas de choque: las células de *L. monocytogenes* fueron igualmente susceptibles a las ondas de choque, tanto en fase exponencial, como en fase estacionaria. En cambio, *E. coli* 0157:H7 y *S. Typhimurium* mostraron mayor susceptibilidad en la fase exponencial. Para *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*, la interacción más importante en la inactivación fue la que se dio entre la luz generada por la descarga eléctrica y la cavitación; sin embargo, la inactivación de *L. monocytogenes* fue independiente del número de choques

aplicados (dentro del rango estudiado). Para *S. Typhimurium* si resultó importante el número de choques aplicados. Finalmente, la disminución logarítmica de *E. coli* 0157:H7 fue independiente del nivel de cavitación y del número de choques aplicados (Cabello, 2003; Herrera, 2003). Los resultados son tan diferentes para los tres microorganismos que no se puede mencionar una tendencia para las bacterias Gram positivas y los Gram negativas.

Se desconocen los mecanismos de inactivación bacteriana por ondas de choque; sin embargo, es de suponerse que los mecanismos más importantes sean la luz UV que se produce al generarse las ondas y la cavitación generada por la onda de choque. Al producirse la onda de choque, se emite luz en el intervalo espectral de 340 a 690 nm (Loske, 1990), longitud que abarca parte de la región UV. Se sabe que el efecto germicida de la radiación UV puede ocasionar cambios en la bicapa lipídica, haciéndola más permeable (Miller y *col.*, 2000). También inhibe algunas enzimas que realizan la duplicación del ADN, ocasionando mutaciones (Madigan y *col.*, 1999; Lage y *col.*, 2000; Sastry y *col.*, 2000; Durbeej y Eriksson, 2002).

El efecto bactericida de la cavitación en líquidos se debe a los daños ocasionados a nivel celular y subcelular. La expansión y el consecuente colapso de pequeñas burbujas de aire originan altas presiones y calor en el entorno inmediato a las burbujas. Además, frecuentemente se emiten microchorros de líquido a estas velocidades (300 – 400 m/s), produciendo fluidez y hoyos temporales en la membrana y hasta la lisis celular, dependiendo qué tan expuestas están las células a la cavitación. Dichos “microjets” se producen debido al colapso violento de las microburbujas contenidas en el fluido (Lauer y *col.*, 1997; Morgan y *col.*, 1988; Hoover, 2000; Russell, 2002).

### 7.1.2 RESISTENCIA TÉRMICA

Los valores  $D$  se determinaron para hacer una comparación entre la resistencia térmica, la resistencia a las ondas de choque y a la luz UV. Los valores  $D$  se determinaron en solución salina isotónica. *L. monocytogenes* tuvo valores  $D$  similares entre la fase estacionaria y exponencial a 55 y 60° C. Para *S. Typhimurium* y *E. coli* 0157:H7 los valores  $D$  en la fase estacionaria fueron mayores que los de la fase exponencial a 55° y 60° C.

*L. monocytogenes* es un microorganismo susceptible al calor, su temperatura mínima de desarrollo es de -1.5° C y la máxima es de 45° C, a temperaturas mayores de 50° C se inactiva (Te Giffel y Zwietering, 1999; Swaminathan, 2001). Algunos ejemplos de valor  $D$  para *L. monocytogenes* son: en leche cruda, a 52° C, entre 26.9 – 29.2 min y 29.7 segundos a 60.3° C. En crema cruda a 52.2° C, 29.68 minutos y 30.65 segundos a 63.3° C. En carne molida de res a 57.2° C, 3.41±1.4 min y 1.62±1.1 min a 60° C (Fernández, 2000). De acuerdo a los resultados obtenidos, temperaturas mayores a 55° C pueden ser muy agresivas, disminuyendo notablemente el tiempo de inactivación. *L. monocytogenes* es sensible tanto al calor como a las ondas de choque, *E. coli* 0157:H7, fue el microorganismo más resistente al calor y a las ondas de choque, esto indica, que puede existir una relación entre la resistencia térmica y la resistencia a las ondas de choque y probablemente a otros factores estresantes.

## **7.2 OBJETIVO ESPECÍFICO 2**

### **7.2.1 INDUCCIÓN DE LA ÁCIDO RESISTENCIA**

*Listeria* es un microorganismo neutrófilo, valores muy bajos de pH, como el del jugo de naranja (pH 3.6), pueden inactivarlo o dañar su capacidad de multiplicarse (Rowan, 1999; Fernández, 2000). Para poder diferenciar la inactivación debida a las ondas de choque y la inactivación ocasionada por la acidez del jugo, se indujo la ácido resistencia a células de *Listeria* en fase estacionaria, suspendidas en CSTEL acidificado con ácido cítrico. Durante esta fase se induce la síntesis de proteínas protectoras que dan resistencia a los factores estresantes (McMeekin y col., 1997; Rowan, 1999), *Listeria* es capaz de desarrollar ácido resistencia, si antes se adapta a un ambiente ácido con valores no letales por unas horas. Phan-Thanh y col., 2000 indujeron ácido resistencia a *L. monocytogenes* L028 a pH 5.5 y *L. monocytogenes* EGD a pH 4.8 suspendidas de 2 a 3 horas en un medio acidificado con HCl.

### **7.2.2 ESTUDIO DEL EFECTO DEL NÚMERO DE CHOQUES APLICADOS, LA CAVITACIÓN, LA LUZ PRODUCIDA POR LA DESCARGA ELÉCTRICA Y EL TIPO DE REFLECTOR SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS EN FASE ESTACIONARIA DE UNA CEPA ÁCIDO RESISTENTE Y RESISTENTE A RIFAMPICINA DE *Listeria monocytogenes*, SUSPENDIDA EN SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA**

Al igual que en el objetivo 1, *Listeria* fue más susceptible a las ondas de choque que *S. Typhimurium* y *E. coli* 0157:H7. Los tres microorganismos coincidieron en que las interacciones dobles del reflector con los otros factores fueron las responsables de la inactivación logarítmica. *L. monocytogenes*, alcanzó una mejor inactivación utilizando el reflector E3, mientras que *S. Typhimurium* y *E. coli* 0157:H7 obtuvieron una mayor inactivación con el reflector E4. Se observó que para *L. monocytogenes* la interacción entre el reflector y el número de ondas de

choque aplicadas contribuyeron a la inactivación alcanzada. Probablemente, el reflector E3 que concentra más la energía en el punto focal, intensifica el efecto bactericida de las ondas de choque.

### **7.3 OBJETIVO ESPECÍFICO 3**

#### **7.3.1 ESTUDIO DEL EFECTO DEL NÚMERO DE CHOQUES APLICADOS, LA CAVITACIÓN, LA LUZ PRODUCIDA POR LA DESCARGA ELÉCTRICA Y EL NIVEL DE INÓCULO SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS EN FASE ESTACIONARIA DE UNA CEPA ÁCIDO RESISTENTE Y RESISTENTE A RIFAMPICINA DE *Listeria monocytogenes*, SUSPENDIDA EN JUGO DE NARANJA**

La inactivación de *L. monocytogenes* en jugo de naranja fue nula, al igual que para *S. Typhimurium* y *E. coli* 0157:H7. Probablemente los pigmentos del jugo de naranja, los flavonoides, absorbieron la luz generada por la descarga eléctrica, disminuyendo notablemente el efecto bactericida de la luz UV sobre el microorganismo (Mora, 2003). Además, los componentes del jugo de naranja (Cuadro 3), como los azúcares, vitaminas y minerales, entre otros, posiblemente protegieron a *L. monocytogenes* del efecto de las ondas de choque.

Muchas condiciones de estrés logran incrementar la resistencia a otros factores estresantes, que comúnmente inactivan al microorganismo (Rowan, 1999). Esta sería otra probabilidad para explicar la nula inactivación, ya que para este objetivo se utilizaron células de *L. monocytogenes* que ya habían desarrollado resistencia a la acidez y a la rifampicina. Posiblemente esta condición hizo resistentes a las células ante el efecto de las ondas de choque.

## 8. CONCLUSIONES

- La luz ultra violeta que se produce para generar las ondas de choque y la cavitación acústica que se origina al paso de estas ondas por la suspensión tienen un efecto bactericida sobre células de *Listeria monocytogenes* en solución salina isotónica.
- La inactivación logarítmica en solución salina isotónica se incrementó utilizando el reflector E3.
- Las interacciones dobles entre los factores estudiados son las principales causas de la inactivación de *Listeria monocytogenes*.
- La inactivación de *Listeria monocytogenes* suspendida en jugo de naranja fue nula.

## 9. PROPUESTAS

Se recomiendan más evaluaciones sobre la integridad celular de *Listeria monocytogenes* con microscopía electrónica de transmisión; hacer estudios con tratamientos más agresivos, por ejemplo, incrementando el número de ondas de choque aplicadas, utilizando diferentes tipos de bujías y reflectores que concentren más la energía de la onda de choque en la región focal de tratamiento. Además de hacer diluciones en la concentración del jugo de naranja para determinar si los pigmentos o cualquier otro componente del jugo de naranja protegen a *Listeria monocytogenes* del efecto de las ondas de choque.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

**Abee, T., Wouters, J.A., 1999.** Microbial stress response in minimal processing. *Int. J. Food Microbiol.*: 50: 65 – 91.

**Alpas, H., Bozoglu, F. 2003.** Efficiency of high pressure treatment for destruction of *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*: 35: 269 – 273.

**Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Ray, B. 2000.** Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.*: 60: 33 – 42.

**Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Sises, A., Dunne, P., Ray, B. 1999.** Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.*: 65: 4248 – 4251.

**Altekruse, S.F., Cohen, M.L., Swerdlow, D.L. 1997.** Emerging foodborne diseases. *Emerg. Infect. Dis.*: 3: 285 – 293.

**Arena, E., Fallico, B., Maccarone, E. 2001.** Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chem.*: 74: 423 – 427.

**Barbosa, G.V., Pierson, M.D., Zhang, Q.H., Shaffner, D.W. 2000.** Pulsed Electric Field. *J. Food Sci.: Special Suppl.*: 65 -79.

**Bearson, S., Bearson, B., Foster, J.W. 1997.** Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*: 147: 173 – 180.



**Box, G.E.P., Hunter, W.G., Hunter, J.J. 1978.** Statistics for experiments. Ed. John Wiley & Sons. New York: 672.

**Bradshaw, J.G., Peeler, J.T., Corwin, J.J., Bennett, J.E., twedt, R.M. 1987.** Thermal resistance of disease - asociated *Salmonella typhimurium* in milk. *J. Food. Prot.:* 50: 95 – 96.

**Brooks, G.F., Butel, J.S., Ornston, L.N. 1996.** Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Ávila, J.J. Ed. El Manual Moderno. México, D.F.: 163 – 222.

**Buchanan, R., Lindqvist, R. 2000.** Hazard identification and hazard characterization of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat-foods. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods. Rome, Italy. 17 – 21, Julio: 1 - 72.

**Buchanan, R.L., Smith, J.L., Long, W. 2000.** Microbial risk assessment: dose-response relations and risk characterization. *Int. J. Food Microbiol.:* 58: 159 - 172.

**Burnett, S.L., Beuchat, L.R. 2001.** Food-borne pathogens: Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *J. Indust. Microbiol. Biotech.:* 27: 104 – 110.

**Butz, P., Edenharder, R., Fernández, A., Fister, H., Merkel, C., Tauscher, B. 2002.** Changes in functional properties of vegetables induced by high pressure treatment. *Food Res. Int.:* 32: 295 – 300.

**Cabello, M.E., 2003.** Efecto de la aplicación de ondas de choque sobre la viabilidad de una cepa ácido resistente de *Salmonella Typhimurium* suspendida en solución salina isotónica y en jugo de naranja. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis que para obtener el grado de licenciatura: 110.

**Calderón, M.L., Barbosa, V., Swanson, B. 1999.** Transmission electron microscopy of *Listeria innocua* treated by pulsed electric fields and nisin in skimmed milk. *Int. J. Food Microbiol.*: 51: 31 - 38.

**Casado, H. 1998.** La farmacia del Al-Ándalus: El naranjo (1ª parte). *Verde Islam*: 8: 93 – 95.

**Cleveland, R.O., McAteer, J.A., Andreoli, S.P., Crum, L.A. 1997.** The effect of polypropylene vials on lithotripter shock waves. *Ultrasound Med. Biol.*: 23: 939 – 952.

**Cuyás, X.F., Trujillo, A.J., Sendra, E., Guamis, B. 1994.** Utilización de los tratamientos por alta presión para la conservación de alimentos. *Alimentaria*: 35 - 39.

**Delius, M. 1994.** Medical applications and bioeffects of extracorporeal shock waves. *Shock Waves*: 4: 55 – 72.

**Desrosier, N.W. 1997.** Conservación de alimentos con radiaciones ionizantes. En: Conservación de alimentos. Ed. Compañía Editorial Continental. México: 373 – 432.

**Durbeej, B., Eriksson, L.A. 2002.** Reaction mechanism of thymine dimmer formation in DNA induced by UV light. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*: 152: 95 – 101.

**Dykes, G.A., Moorhead, S.M. 2000.** Survival of osmotic and acid stress by *Listeria monocytogenes* strains of clinical or meat origin. *Int. J. Food Microbiol.*: 56: 161 – 166.

**Farkas, J. 1998.** Irradiation as a method for decontaminating food. *Int. J. Food Microbiol.*: 44: 189 – 204.

**Farkas, D.F., Hoover, D.G., 2000.** High pressure processing. *J. Food Sci.: Special Suppl.*: 47 – 64.

**Fernández, E. 2000.** Microbiología e inocuidad de los alimentos. Ed. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Qro.: 5 – 755.

**Fleet, G.H., Heiskanen, P., Reid, I., Buckle, K.A. 2000.** Foodborne viral illness – status in Australia. *Int. J. Food Microbiol.*: 59: 127 – 126.

**Furukawa, S., Noma, S., Yoshikawa, S., Furuya, H., Shimoda, M., Hayakawa, I. 2001.** Effect of filtration of bacterial suspensions on the inactivation ratio in hydrostatic pressure treatment. *J. Food Eng.*: 50: 59 – 61.

**Gahan, C.G.M., Hill, C. 1999.** The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*: 50: 93 – 100.

**Galdiero, E., D'Isanto, M., Aliberti, F. 1997.** Effect of saline concentration, pH and growth temperature on the invasive capacity of *Listeria monocytogenes*. *Res. Microbiol.* : 148: 305 – 313.

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

**González, M.E., García, Y., Marrero, M., Acosta, V. 2000.** Aplicaciones de la tecnología de altas presiones hidrostáticas en alimentos. *Alimentaria*: 29 – 33.

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

**Hernández, L.F. 1999.** Problemas relativos a la calidad e inocuidad de los alimentos y su repercusión en el comercio. *Alimentación, Nutrición Y Agricultura*. 25: 34 – 41.

**Herrera, C.T., 2004.** Efecto de la aplicación de ondas de choque sobre la viabilidad de una cepa ácido resistente de *Escherichia coli* 0157:H7 suspendida en solución salina isotónica y en jugo de naranja. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis que para obtener el grado de licenciatura: 115.

**Hill, C., Cotter, P.D., Sleator, R.D., Gahan, C.G.M. 2002.** Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. *Int. Dairy J.*: 12: 273 – 283.

**Hoover, D.G. 2000.** Ultrasound. *J. Food Sci.*: Special Suppl.: 93 – 95.

**Huss, H.H., Jorgensen, L.V., Vogel, B.F. 2000.** Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods. *Int. J. Food Microbiol.*: 62: 267 -274.

**Ihaka, R., Gentleman, R. 1996.** R: a language for data analysis and graphics. *J. Computational Graph. Stats.*: 5: 299 – 314.

**Jia, M., Zhang, H., Min, D.B. 1999.** Pulsed electric field processing effects on flavor compounds and microorganisms of orange juice. *Food Chem.*: 65: 445 – 451.

**Kalchayanand, N., Sikes, A., Dunrte, C.P., Ray, B. 1998.** Factors influencing death and injury of foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization. *Food Microbiol.*: 15: 207 – 214.

**Kerfoot, W.W., Beshai, A.Z., Carson, C.C. 1992.** The effect of isolated high-energy shock wave treatments on subsequent bacterial growth. *Urol. Res.*: 20: 183 – 186.

**Lage, C., Teixeira, P.C.N., Leitão, A.C. 2000.** Non-coherent visible and infrared radiation increase survival to UV (254 nm) in *Escherichia coli* K12. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*: 54: 155 – 161.

**Lammerding, A.M., Fazil, A. 2000.** Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.*: 58: 147 – 157.

**Lauer, U., Bürgelt, E., Squire, Z., Messmer, K., Hofschneider, P.H., Gregor, M., Delius, M. 1997.** Shock wave permeabilization as a new gene transfer method. *Gene Ther.*: 4: 710 -715.

**Lee, H.S., Coates, G.A. 1999.** Vitamin C in frozen, fresh squeezed, unpasteurized, polyethylene-bottled orange juice: a storage study. *Food Chem.*: 65: 165 -168.

**Lindsay, J.A. 1997.** Chronic sequelae of foodborne disease. *Emerg. Infect. Dis.*: 3: 443 – 452.

**Loaharanu, P. 2001.** Rising calls for food safety. Radiation technology becomes a Timely Answer. *IAEA Bulletin*: 43:37 - 42.

**Loske, A.M. 1990.** Generación de ondas de choque en agua por rompimiento eléctrico. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis que para obtener el grado de maestría: 273.

**Loske, A.M. 1994.** Interacción de ondas de choque débiles en agua con al materia: diseño de electrodos y reflectores novedosos para litotriptores electrohidráulicos. Ensenada, Baja California. Tesis que para obtener el grado de doctorado: 168.

**Loske, A.M., Hernández, c., Armenta, E., Prieto, F.E. 2000.** Shock wave potential as a food preservation method. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*: 3: 23 – 30.

**Loske, A.M., Mora, U., Cabello, M., Herrera, C., Barajas, A. 2002.** Bactericidal effect of underwater shock waves. Forum Acusticum Sevilla. Sevilla, España. 16, Septiembre.

**Loske, A.M., Prieto, F.E. 1991.** Generador de ondas de choque en agua Mexilit I. Ciencia y Desarrollo: 17: 82 - 89.

**Loske, A.M., Prieto, F.E. 1999.** Fundamentos técnicos de litotripcia extracorporal. ED. JGH. México, D.F.: 168.

**Loske, A.M., Prieto, F.E., Méndez, A. 1998.** Generador de ondas de choque experimental. Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica. Mazatlán, México. Noviembre: 54 – 57.

**Loske, A.M., Prieto, F.E., Zavala, M.L., Santana, A.D., Armenta, E. 1999.** Repeated application of shock waves as a possible method for food preservation. *Shock Wave*: 9: 49 – 55.

**Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 1999.** Brock: Biología de los microorganismos. Capella, I., Álvarez, D., Aguado, P. Ed. Prentice may. España: 1 – 532.

**Mayer, E. 1993.** Food irradiation – A means of controlling pathogenic microorganisms in food. *Lebens.-Wiss. u.-Technol.*: 26: 493 – 497.

**McMeekin, T.A., Brown, J., Krist, K., Miles, D., Neumeyer, K., Nichols, D.S., Olley, J., Presser, K., Ratkowsky, D.A., Ross, T., Salter, M., y Soontranon, S. 1997.** Quantitative Microbiology: A Basis For Food Safety. *Emerg. Infect. Dis.*: 3: 541 – 549.

**Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V. 1999.** Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*: 5: 607 – 625.

**Miller, C.R., Clapp, P.J., O'Brien, F. 2000.** Visible light-induced destabilization of endocytosed liposomes. *FEBS Lett.*: 467: 52 – 56.

**Mora, U. 2003.** Efecto de la aplicación repetida de ondas de choque sobre la viabilidad de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes* suspendidos en solución salina isotónica y jugo de naranja. Reporte interno del Laboratorio de Ondas de Choque, CFATA, UNAM.

**Morgan, T.R., Laudone, V.P., Heston W.D., Zeitz, L., Fair, W.R. 1988.** Free radical production by high shock waves – comparison with ionizing radiation. *J.Urol.*: 139: 186 – 189.

**Muñoz, M., Roldan, J.A., Ledesma, J.A., Mendoza, E., Chávez, A., Pérez, F., Hernández, S.L., Chaparro, A. 1997.** Tablas de valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en Mexico: Ed. Internacional. México, D.F.: 330.

**Ohshima, T., Tanaka, S., Teshima, K. 1991.** Effects of shock wave on microorganisms: An evaluation method of the effects. *Shock Waves.*: 1215 – 1219.

**Park, S.J., Lee, J.I., Park, J. 2002.** Effects of a combined process of high-pressure carbon dioxide and high hydrostatic pressure on the quality of carrot juice. *J. Food Sci.*: 67: 1827 – 1834.

**Pérez, M.R. 1998.** Contaminación y dinámica de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp en brócoli. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis que par obtener el grado de maestría: 125.

- Phan-Thanh, L., Mahouin, F., Aligé, S. 2000.** Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*: 55: 121 – 126.
- Preminger, G.M. 1991.** Shock wave physics. *Am. J. Kidney Dis.*: 17: 431 – 435.
- Prieto, F.E., Loske, A.M., Yarger, F.L. 1991.** An underwater shock wave device. *Res. Sci. Instr.*: 62: 1849 – 1854.
- Pupin, A.M., Dennis, M.J., Toledo, M.C.F. 1998.** Flavanone glycosides in Brazilian orange juice. *Food Chem.*: 61: 275 – 280.
- Pupin, A.M., Dennis, M.J., Toledo, M.C.F. 1999.** HPLC analysis of carotenoids in orange juice. *Food Chem.*: 64: 269 – 275.
- Qin, B.I., Pothakamury, U.R., Vega, H., Martín, O., Barbosa, G.V., Swanson, B.G. 1995.** Food pasteurization using high-intensity pulsed electric fields. *Food Technol.*: 49: 55 – 60.
- Roering, A.M., Luchansky, J.B., Ihnot, A.M., Ansay, S.E., Kaspar, C.W., Ingham, S.C. 1999.** Comparative survival of *Salmonella typhimurium* DT 104, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* 0157:H7 in preservative-free apple cider and simulated gastric fluid. *Int. J. Food Microbiol.*: 46: 263 – 269.
- Rowan, N.J. 1999.** Evidence that inimical food-preservation barriers alter microbial resistance, cell morphology and virulence. *Trends Food Sci. Technol.*: 10: 261 – 270.
- Rowbury, R.J., Goodson, M. 1999.** An extracellular acid stress-sensing protein needed for acid tolerance induction in *Escherichia coli*. *Microbiol. Lett.*: 174: 49 – 55.



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

**Russell, N.J., Colley, M., Simpson, R.K., Trivett, A.J., Evans, R.I. 2000.** Mechanism of action of pulsed high electric field (PHEF) on the membranes of food-poisoning bacteria is an 'all-or-nothing' effect. *Int. J. Food Microbiol.*: 55: 133 – 136.

**Saklani-Jusforgues, H., Fontan, E., Goossens P.L. 2000.** Effect of acid-adaptation on *Listeria monocytogenes* survival and translocation in a murine intragastric infection model. *FEMS Microbiol. Lett.*: 193: 155 – 159.

**Sastry, S.K., Datta, A.K., Worobo, R.W. 2000.** Ultraviolet light. *J. Food Sci.*: Special Suppl.: 90 – 99.

**Segebarth, N., Eulaerts, O., Reisse, J., Crum, L.A., Matula, T.H. 2002.** Correlation between acoustic cavitation noise, bubble population, and sonochemistry. *J. Phys. Chem.*: 106: 181 – 190.

**Sharma, M., Beuchat, L.R., Doyle, M.P., Chen, J. 2001.** Survival of salmonellae in pasteurized, refrigerated calcium-fortified orange juice. *J. Food. Prot.*: 64: 1299-1304.

**Sharma, M., Beuchat, L.R., Doyle, M.P., Chen, J. 2001.** Fate of salmonellae in calcium-supplemented orange juice at refrigeration temperature. *J. Food. Prot.*: 64: 2053- 2057.

**Sheridan, J.J., McDowell, D.A. 1998.** Factors affecting the emergence of pathogens on foods. *Meat Sci.*: 49: S151 – S167.

**Swaminathan, B. 2001.** *Listeria monocytogenes*. En: Food Microbiology: Fundamentals and frontiers. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. Ed. Amer Society for Microbiology Press. Washington, D.C.: 383 – 410.

**Te Giffel, M.C., Zwietering, M.H. 1999.** Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*: 46: 135 – 149.

**Ter Steeg, P.F., Hellemons, J.C., Kok, A.E. 1999.** Synergistic actions of nisin, sublethal ultrahigh pressure, and reduced temperature on bacteria and yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*: 65: 4148 - 4154.

**Thakur, B.R., Singh, R.K. 1995.** Combination process in food irradiation. *Trends Food Sci. Technol.*: 6: 7 – 11.

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

**Von Eiff, C., Overbeck, J., Hauptş, G., Herrmann, M., Winckler, S., Richter, K.D. 2000.** Bactericidal effect of extracorporeal shock waves on *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbio.l*: 49: 709 – 712.

[www.fsis.usda.gov/OA/pubs/lmtips.htm](http://www.fsis.usda.gov/OA/pubs/lmtips.htm). **Anónimo<sup>1</sup>. 1999.** *Food Safety and Inspection Service: United States Department of Agriculture Washington.*

[www.siea.sagarpa.gob.mx/InfOMer/analisis/jugonar.html](http://www.siea.sagarpa.gob.mx/InfOMer/analisis/jugonar.html). **Anónimo<sup>2</sup>. 2002.** *Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera.*

[www.aquafineuv.com/UVBASICS/UVBasics.htm](http://www.aquafineuv.com/UVBASICS/UVBasics.htm). **Anónimo<sup>3</sup>. 2001.** *Aquafine Corporation.*

[www.iuva.org/PublicArea/index.htm](http://www.iuva.org/PublicArea/index.htm). **Anónimo<sup>4</sup>**. **2001**. *International Ultraviolet Association*.

[www.ultraviolet.com/whatis.htm](http://www.ultraviolet.com/whatis.htm). **Anónimo<sup>5</sup>**. **2003**. *Atlantic Ultraviolet Corporation*.

[www.americanultraviolet.com/uvc/techsheets/index.htm#](http://www.americanultraviolet.com/uvc/techsheets/index.htm#). **Anónimo<sup>6</sup>**. **2003**.  
American Ultraviolet Company.