



**Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla**

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

“COMPORTAMIENTO DE *Escherichia coli* y
Salmonella spp. EN DULCES ELABORADOS CON
FRUTOS SECOS”

TESIS PROFESIONAL

Tesis presentada para obtener el título de :

Licenciatura en Ingeniero en Alimentos

Presenta:

MAYELY BORTOLOTTI LÓPEZ

Director de Tesis:

DRA. MARÍA LORENA LUNA GUEVARA

H. Puebla de Z. a Septiembre de 2016

Agradecimientos

A todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a la Dra. Lorena Luna Guevara, directora de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de la misma.

A mi familia que estuvo conmigo apoyándome al principio y al final de éste, principalmente a mi madre por haberme enseñado que con esfuerzo, trabajo y constancia todo se consigue.

Al INECOL unidad de microscopía óptica avanzada-BIOMimic, en especial a la Dra. Greta Rosas Saito por el apoyo brindado.

Al profesos Juan L. Silva por su ayuda y aportación del kit para esta investigación.



Índice general

<i>Introducción</i>	10
<i>Objetivos</i>	11
<i>Hipótesis</i>	11
<i>Capítulo I. Antecedentes</i>	12
1.1 Factores que afectan al crecimiento de los microorganismos.	12
1.1.1 Factores intrínsecos	12
1.1.2 Factores extrínsecos	16
1.2. Enfermedades Transmitidas por Alimentos ETA	18
1.2.1 Algunas bacterias patogénicas causantes de ETA	20
PhysOrg 2012	25
1.2.2 Condiciones de crecimiento	25
1.3 Frutos Secos.....	29
1.3.1 Características composicionales de algunos frutos secos	30
1.3.2 Productos elaborados a base de frutos secos	32
1.3.4 Microflora presente en frutos secos.....	34
1.3.5 Incidencia y brotes de microorganismos por consumo de frutos secos	36
<i>Capítulo II. Metodología.</i>	38
2.1 Obtención de dulces típicos	39
2.2 Selección de productos	39
2.3 Crecimiento y conservación de los microorganismos en estudio	40
2.4 Preparación del inóculo.....	41
2.5 Inoculación y almacenamiento de muestras	41
2.6 Propiedades fisicoquímicas en muestra inoculada	42
2.7 Análisis microbiológicos de dulces inoculados.....	43
2.8 Microscopía de barrido.....	46
2.9 Análisis estadístico.....	47

<i>Capítulo III. Resultados y discusión</i>	47
3.1 Selección de productos	47
3.2 Desarrollo de E.coli en los productos seleccionados	49
3.3 Desarrollo de Salmonella en los productos seleccionados	51
3.4 Supervivencia del inóculo en ambos tipos de dulces	55
3.5 Microscopías de barrido	58
<i>Conclusiones</i>	61
<i>Sugerencias</i>	62
<i>Anexos</i>	63
<i>Bibliografía</i>	65

Índice de tablas

Tabla 1 Valores de a_w aproximados para el crecimiento de microorganismos.....	14
Tabla 2 Principales intoxicaciones alimentarias y productos implicados.....	20
Tabla 3 Principales intoxicaciones alimentarias y sus síntomas.....	21
Tabla 4 Clasificación de los microorganismos en base a su temperatura de crecimiento.....	26
Tabla 5 Clasificación de los microorganismos en base a su pH de crecimiento ...	26
Tabla 6 Relaciones microbianas con el oxígeno.....	27
Tabla 7 Condiciones de crecimiento de <i>E.coli</i>	28
Tabla 8 Condiciones de crecimiento de <i>Salmonella</i>	29
Tabla 9 Composición proximal de cacahuete.....	31
Tabla 10 Composición proximal de pepita de calabaza.....	32
Tabla 11 Resumen nutricional de palanqueta de 20g.....	33
Tabla 12 Resumen Nutricional en jamoncillo de 30g.....	34
Tabla 13 Brotes alimentarios y frutos secos implicados.....	37
Tabla 14 Valores de a_w entre los dulces típicos de mayor consumo en el Estado de Puebla.....	48
Tabla 15 Contenido de humedad, a_w y recuentos en palanqueta inoculado con <i>E.coli</i>	50
Tabla 16 Contenido de humedad y a_w y recuentos en jamoncillo inoculado con <i>E.coli</i>	51
Tabla 17 Contenido de humedad y a_w y recuentos en palanqueta inoculado con <i>Salmonella spp.</i>	53

Tabla 18 Contenido de humedad y aw y recuentos en jamoncillo inoculado con Salmonella spp..... 54

Índice de figuras

<i>Figura 1 Salmonella, micrografía electrónica de barrido de color (SEM)</i>	23
<i>Figura 2 . Micrografía electrónica de barrido (SEM) de Escherichia coli</i>	25
<i>Figura 3 Palanqueta de cacahuete</i>	33
<i>Figura 4 Jamoncillo de pepita de calabaza</i>	34
<i>Figura 5 Diagrama de bloques de la metodología en esta investigación</i>	38
<i>Figura 6 Planta procesadora de dulces típicos de Puebla</i>	39
<i>Figura 7 Selección de dulces típicos</i>	40
<i>Figura 8 Resistencia del inóculo</i>	40
<i>Figura 9 Medición de absorbancia</i>	41
<i>Figura 10 Inoculación y almacenamiento de dulces típicos</i>	42
<i>Figura 11 Determinación de contenido de humedad</i>	42
<i>Figura 12 . Determinación de actividad de agua</i>	43
<i>Figura 13 Homogeneizado de la muestra</i>	44
<i>Figura 14 Siembra por extensión en superficie</i>	44
<i>Figura 15 Confirmación de E.coli</i>	45
<i>Figura 16 Confirmación de Salmonella mediante kit de detección rápida</i>	45
<i>Figura 17 Recubrimiento de dulces inoculados con oro</i>	46
<i>Figura 18 Microscopio electrónico de barrido</i>	46
<i>Figura 19 Supervivencia de E.coli inoculada en ambos dulces</i>	49

<i>Figura 20</i>	<i>Sobrevivencia de Salmonella inoculada en ambos dulces.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura. 21</i>	<i>Dulces inoculados con presencia de hongos</i>	<i>55</i>
<i>Figura 22 (A)</i>	<i>Crecimiento de Salmonella y E.coli en palanqueta (B) crecimiento de Salmonella y E.coli en jamoncillo</i>	<i>58</i>
<i>Figura 23</i>	<i>Microscopía de barrido (SEM) en Jamoncillo a) E.coli b) Salmonella ..</i>	<i>59</i>
<i>Figura 24</i>	<i>Microscopía de barrido (SEM) en Palanqueta a) E.coli b) Salmonella</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>

Resumen

La industria dulcera, es una de las más sobresalientes de la gastronomía mexicana y fuente de la creatividad artesanal, formando parte de las cocinas típicas de los Estados de Puebla, Querétaro, Michoacán y la Ciudad de México.

En este estudio se evaluó el comportamiento de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en dulces típicos elaborados a base de frutos secos, seleccionados por su bajo contenido de humedad y actividad de agua (a_w), para ello fueron evaluados 8 distintos dulces para seleccionar los productos a inocular, la palanqueta (0.5) y el jamoncillo (0.68) fueron los dulces que presentaron menor a_w , Ambos dulces fueron inoculados con una población inicial de $7 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$, y almacenados a temperatura ambiente ($23\text{-}25^\circ\text{C}$) por 28 días, en los tiempos 1,7,14,21,28 se evaluó el contenido de humedad, la a_w , y el crecimiento microbiano.

Durante el almacenamiento la actividad de agua (0.8) y el contenido de humedad (6%) fueron constantes en palanqueta y jamoncillo inoculados con *Salmonella*. En los productos inoculados con *E.coli* la humedad y a_w fue muy diferente entre ellos (7% y 0.6) en palanqueta y (3.7% y 0.8) en jamoncillo. En los recuentos microbianos hubo un descenso rápido en la palanqueta inoculada con *E.coli* ($0.56 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$) a los 7 días de almacenamiento, en el caso del jamoncillo los recuentos estuvieron presentes hasta el día 28 ($2.3 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$). *Salmonella* presentó una mayor sobrevivencia en ambos productos ($2.1 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$) en palanqueta y ($2.7 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$) en jamoncillo al termino de los 28 días. Estos resultados indican la viabilidad a largo plazo de *Salmonella* y *E. coli* en estos productos, así como la sobrevivencia de éstos microorganismos a pesar de la baja a_w presente en ambos dulces.

Introducción

La industria dulcera, es una de las más sobresalientes de la gastronomía mexicana y fuente de la creatividad artesanal, formando parte de las cocinas típicas de los Estados de Puebla, Querétaro, Michoacán y la Ciudad de México (Lavín & Benítez. 2000).

Los dulces típicos se siguen elaborando en pequeña escala por numerosas familias poblanas. Algunos productos como: camotes de Santa Clara, jamoncillos de pepita de calabaza, muéganos envinados, tortita del cielo, turrone de cacahuete, merengues, cajetas, palanquetas y alegrías han resultado demandados tanto por turistas locales, nacionales y extranjeros (Cordero, 1983); todos ellos elaborados a partir de frutos secos; como cacahuete, pepita, nuez, o almendras. Estos frutos los caracteriza la presencia de semilla única, que son secos y de cáscara dura.

Este tipo de productos puede agruparse como alimentos de bajo contenido de humedad; por lo general, se ha considerado que representan un riesgo bajo de transmisión de enfermedades. Sin embargo recientemente investigaciones han reportado la presencia de *Salmonella* y *E. coli* enterohemorrágica en una diversa gama de productos secos, como mantequilla de cacahuete, coco rallado, nueces, chocolate entre otros, generando cierta preocupación sobre la microbiología en alimentos de baja humedad (Kopper & Calderón 2009).

De acuerdo con los antecedentes mencionados son varios los reportes de padecimientos asociados con la sobrevivencia de enterobacterias en frutos secos, sin embargo no se han realizado investigaciones relacionadas con el comportamiento de bacterias patógenas en productos nacionales elaborados con frutos secos, como son los dulces típicos de Puebla. Es por ello que la presente investigación analizará la sobrevivencia de patógenos como *Escherichia coli* y *Salmonella* en dulces elaborados a partir de frutos secos cuyo contenido de humedad y actividad de agua son bajos. Estos productos inoculados permanecieron almacenados durante 28 días a temperatura ambiente, de acuerdo con las condiciones utilizadas comúnmente durante su expendio.

Objetivos

General

- Evaluar el comportamiento de *E.coli* y *Salmonella* en dulces típicos elaborados a base de frutos secos, seleccionados por su bajo contenido de humedad y nivel de actividad de agua (a_w)

Específicos

- Evaluar la a_w y contenido de humedad en dulces típicos de Puebla, con la finalidad de seleccionar los productos inoculados.
- Estudiar el crecimiento y sobrevivencia de *E.coli* y *Salmonella* en dulces típicos a base de frutos secos, conservados a temperatura ambiente y a diferentes tiempos de almacenamiento (0,1,7,14,21,28) días
- Analizar el efecto de los parámetros de a_w y humedad sobre la sobrevivencia de *E.coli* y *Salmonella* en los dulces inoculados

Hipótesis.

Los factores como humedad y actividad de agua afectarán el crecimiento y sobrevivencia de los microorganismos en estudio dependiendo del producto inoculado.

Capítulo I. Antecedentes

1.1 Factores que afectan al crecimiento de los microorganismos.

Todos los microorganismos, igual que todos los seres vivos, necesitan un conjunto de factores que les permita crecer/vivir en un determinado medio ambiente, estos factores son, obviamente, diferentes para cada microorganismo.

Si se conocen los parámetros de crecimiento y multiplicación de los microorganismos se puede conocer también como controlarlos o prevenir su proliferación. Aquellos parámetros que son inherentes a los microorganismos, es decir que son parte de sus tejidos, se conocen como parámetros intrínsecos: pH, contenido de humedad, contenido de nutrientes, estructuras biológicas (Jay, 2000).

Por otro lado, los parámetros extrínsecos son aquellas características del ambiente de almacenamiento de los alimentos que van a afectar tanto al producto como a los microorganismos presentes. Los de mayor importancia en términos en relación con el desarrollo microbiano son: Temperatura, humedad relativa, presencia y concentración de gases, presencia y actividad de otros microorganismos (Jay, 2000).

1.1.1 Factores intrínsecos

Los tipos de nutrientes, pH, disponibilidad de agua y oxígeno, son los factores intrínsecos que generalmente, influyen más en el crecimiento de los microorganismos en los alimentos.

1.1.1.2 pH

La mayoría de los microorganismos crecen mejor a valores de pH en torno a 7,0 (6,6-7,5) mientras que son pocos los que crecen por debajo de 4,0. Se ha demostrado que los pH mínimos de determinados lacto bacilos dependen del ácido usado, siendo los ácidos cítricos, clorhídrico, fosfórico, y tartárico los que permiten el crecimiento en un valor más bajo que los ácidos acético o láctico.

En lo que respecta a las bacterias, en la mayor parte de ellas, el pH óptimo de crecimiento se encuentra entre 6.5 y 7.5, aunque algunas bacterias pueden desarrollarse a valores de pH extremos.

El pH de un alimento es uno de los principales factores que determinan la sobrevivencia y el crecimiento de los microorganismos durante el procesado, el almacenaje y la distribución. A partir de una flora mixta, la acidez puede actuar como agente selectivo de la población inicial, de la que es particularmente tolerante. Las levaduras y los lactobacilos resultan a menudo seleccionados por su tolerancia a los pH bajos (Andino & Castillo 2010).

1.1.1.3 Contenido de humedad

Los microorganismos requieren de agua para llevar a cabo sus funciones metabólicas. La actividad del agua (a_w) es una medición del agua libre, es decir del agua que está disponible para ser utilizada por los microorganismos (Jay, 2000).

La a_w de un alimento puede reducirse aumentando la concentración de solutos en la fase acuosa de los alimentos, favoreciendo la extracción del agua.

La mayoría de los microorganismos, incluyendo las bacterias patógenas, crecen más rápidamente a niveles de a_w de 0,995 - 0,980 (la a_w de la mayoría de los medios de cultivo utilizados en el laboratorio es de 0.990 – 0.999). Con valores de a_w inferiores, la velocidad de crecimiento final disminuye y la fase de latencia aumenta. A una a_w suficientemente baja, la cual es difícil de definir con precisión, la fase de latencia se hace infinita, es decir, el crecimiento cesa (Andino. & Castillo. 2010).

Cada microorganismo puede responder de manera diferente frente a los niveles de a_w en función de una serie de factores. El crecimiento microbiano, y en algunos casos la producción de metabolitos microbianos, pueden ser particularmente sensibles a las alteraciones en a_w . Los microorganismos tienen generalmente niveles óptimos y mínimos de a_w para el crecimiento. Un indicador de la respuesta microbiana es su clasificación taxonómica. Por ejemplo, las bacterias Gram (-) son generalmente más sensibles a la baja a_w que las bacterias Gram (+). La Tabla 1 se menciona los valores de a_w mínimas aproximadas para el crecimiento de algunos microorganismos (Mossel *et al.* 1995).

Tabla 1 Valores de a_w aproximados para el crecimiento de microorganismos

Organismo	Mínimo	Optimo	Máximo
<i>Campylobacter spp.</i>	0.98	0.99	
<i>Clostridium botulinum</i> type E*	0.97		
<i>Shigella spp.</i>	0.97		
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0.97		
<i>Vibrio vulnificus</i>	0.96	0.98	0.99
<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica	0.95	0.99	
<i>Salmonella spp.</i>	0.94	0.99	>0.99
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.94	0.98	0.99
<i>Bacillus cereus</i>	0.93		
<i>Clostridium botulinum</i> tipos A & B**	0.93		
<i>Clostridium perfringens</i>	0.943	0.95-0.96	0.97
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.92		
<i>Staphylococcus aureus</i> crecimiento	0.83	0.98	0.99
<i>Staphylococcus aureus</i> toxina	0.88	0.98	0.99

Fuente: ICMSF 1996.

* **proteolítico; * no-proteolítico

1.1.1.4 Nutrientes

Los microorganismos requieren ciertos nutrientes básicos para el crecimiento y mantenimiento de las funciones metabólicas. La cantidad y tipo de nutrientes requeridos varían mucho dependiendo del microorganismo. Estos nutrientes

incluyen agua, una fuente de energía, nitrógeno, vitaminas, y minerales (Mossel *et al.* 1995).

Los microorganismos transmitidos por alimentos pueden obtener energía a partir de hidratos de carbono, alcoholes y aminoácidos. La mayoría de los microorganismos metabolizan azúcares simples como la glucosa. Otros pueden metabolizar los hidratos de carbono más complejos, tales como almidón o celulosa que se encuentra en alimentos vegetales, o glucógeno que se encuentra en alimentos de origen animal. Algunos microorganismos pueden utilizar grasas como fuente de energía.

En general, las bacterias Gram (+) son más exigentes en sus requerimientos nutricionales y por lo tanto no son capaces de sintetizar ciertos nutrientes necesarios para el crecimiento. Las bacterias Gram (-) son generalmente capaces de derivar sus necesidades nutricionales básicas de los hidratos de carbono, proteínas, lípidos, minerales y vitaminas que se encuentran en una amplia gama de alimentos (Jay 2000).

La complejidad de los alimentos en general es tal que varios microorganismos pueden estar creciendo en un alimento a la vez. La tasa de crecimiento está limitado por la disponibilidad de nutrientes esenciales. La abundancia de nutrientes en la mayoría de los alimentos es suficiente para apoyar el crecimiento de una amplia gama de patógenos transmitidos por los alimentos (FDA 2015).

1.1.1.5 Estructuras biológicas

Los vegetales y los alimentos derivados de animales, especialmente en el estado crudo, tienen estructuras biológicas que pueden impedir la entrada y el crecimiento de microorganismos patógenos. Ejemplos de tales barreras físicas incluyen la testa de las semillas, la piel de las frutas y verduras, cáscara de frutos secos, piel de animal, la cutícula del huevo, la cáscara y las membranas. Éstas proporcionan una excelente protección contra la entrada y subsiguiente internalización de los microorganismos productores de alteraciones (Andino & Castillo 2010).

Durante la preparación de alimentos, procesos tales como cortar, picar, moler, y el pelado destruyen las barreras físicas. Por lo tanto, el interior del alimento puede contaminarse y el crecimiento puede ocurrir dependiendo de las propiedades intrínsecas. Por ejemplo, *Salmonella* spp. se ha demostrado que crecen en el interior de las porciones de melón cortado, sandía y otros vegetales. De acuerdo con las condiciones de temperatura y tiempo de inoculación (Golden *et al.* 1993).

El calentamiento de los alimentos, así como otros tipos de procesamiento descomponen las estructuras biológicas de protección y alteran factores tales como el pH y aw. Estos cambios podrían potencialmente permitir el crecimiento de patógenos microbianos (FDA, 2015).

1.1.2 Factores extrínsecos

Tienen una gran importancia en la conservación de los alimentos y los más utilizados corresponden al control de temperatura, humedad y oxígeno.

1.1.2.1 Temperatura

Todos los microorganismos tienen un intervalo de temperatura definido en el que crecen, con un valor mínimo, máximo y óptimo. El estudio de la interacción entre el tiempo, la temperatura y otros factores intrínsecos y extrínsecos es crucial para la selección de las condiciones de almacenamiento adecuadas para un producto alimenticio. La temperatura tiene gran impacto tanto en el tiempo de generación de un organismo así como en su fase Lag o de adaptación (Mossel *et al.* 1995).

A bajas temperaturas, dos factores regulan el crecimiento: 1) la velocidad de reacción para las enzimas microbianas se vuelven mucho más lenta, y 2) se reducen la fluidez de la membrana citoplasmática, lo que interfiere con los mecanismos de transporte. Con altas temperaturas, los componentes celulares estructurales se desnaturalizan y la inactivación de las enzimas termolábiles. Mientras que la tasa de crecimiento puede incrementarse al aumentar la temperatura, posteriormente la

tasa tiende a disminuir rápidamente a partir de entonces, hasta que se alcanza la temperatura máxima (Mossel *et al.* 1995). Una temperatura elevada produce mal plegamiento o agregación de las proteínas de E.coli, y se ven afectados procesos celulares como la proteólisis, la síntesis de la pared celular, el crecimiento y la replicación del ADN plásmido (Yura *et al.*, 1993).

1.1.2.2 Humedad

El efecto de la humedad relativa del ambiente de almacenamiento sobre la inocuidad de los alimentos es más complejo debido a que puede o no alterar la a_w del producto, lo anterior puede atribuirse a que requiere considerar la posibilidad de evaporación de agua de la superficie o la condensación de humedad sobre el producto, tales cambios dependen del tipo de alimento.

En general, los alimentos que dependen de un cierto valor de a_w por razones de inocuidad o de vida útil deberán ser almacenados de tal manera que el medio ambiente no cambie notablemente esta característica. Con el tiempo los alimentos entraran en equilibrio con su entorno, por lo tanto, los procesadores y distribuidores tienen que prever las condiciones de almacenamiento apropiadas para dar cuenta de este hecho (FDA 2015).

El embalaje es importante en la vulnerabilidad de la comida y la influencia de la humedad relativa, pero incluso dentro de un recipiente sellado, la migración de humedad y el fenómeno de fluctuación de la temperatura del medio ambiente pueden jugar un papel importante. Se ha observado que ciertos alimentos con bajo a_w pueden estar sujetos a condensación de humedad en la superficie debido a los cambios de temperatura ambiental. Esta agua de la superficie se traducirá en microambientes favorables al crecimiento de deterioro, y posiblemente, patógenos, microorganismos (FDA 2015).

1.2.2.3 Oxígeno disponible

La concentración de oxígeno es un factor decisivo en todos los ambientes, incluidos los alimentos, que influye en los tipos de microorganismos presentes y en su metabolismo. De acuerdo con la presencia de oxígeno, el desarrollo de los microorganismos se presenta de la siguiente manera:

- Aerobios: aquellos que requieren la presencia de oxígeno para crecer
- Anaerobios: aquellos que no crecen en presencia de oxígeno
- Facultativos: los que pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (Ariña. & Prado, 2004)

Algunas bacterias tienen la facultad de crecer en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Casi todos los mohos y levaduras encontrados en el interior o en la superficie de los alimentos son aeróbicos, aunque unos pocos tienden a ser anaerobios facultativos. El CO₂, se usa para controlar los microorganismos en los alimentos, de allí que muchas industrias lo utilicen en la etapa de envasado (Andino & Castillo, 2010).

Una variedad de tecnologías comunes se utilizan para inhibir el crecimiento de microorganismos, y la mayoría de estos métodos se basan en la temperatura para aumentar los efectos inhibidores. Las tecnologías incluyen el embalaje en atmósfera modificada (MAP) , envasado en atmósfera controlada (CAP) , el almacenamiento en atmósfera controlada (CAS) y la adición directa de dióxido de carbono (DAC) (Loss & Hotchkiss 2002).

1.2. Enfermedades Transmitidas por Alimentos ETA

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) se producen por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminados con microorganismos patógenos que afectan la salud del consumidor en forma individual o colectiva cuyos síntomas más

comunes son diarreas y vómitos (González & Rojas, 2005). Estas enfermedades se dividen en Infecciones e Intoxicaciones alimentarias. Las Infecciones son las ETA producidas por la ingestión de alimentos y/o agua contaminados con agentes infecciosos específicos tales como bacterias, virus, hongos, parásitos, que en la luz intestinal pueden multiplicarse o lisarse y producir toxinas o invadir la pared intestinal y desde allí alcanzar otros aparatos o sistemas. Las Intoxicaciones son las ETA producidas por la ingesta de toxinas formadas en tejidos de plantas o animales, o de productos metabólicos de microorganismos en los alimentos, o por sustancias químicas que se incorporan a ellos de modo accidental, incidental o intencional en cualquier momento desde su producción hasta su consumo (González *et al* 2012).

Se considera a las enfermedades transmitidas por alimentos, como una importante causa de padecimientos a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que en países menos desarrollados, las ETA son las principales razones de enfermedad y muerte, asociadas a una carga socio-económica significativa. Asimismo estas enfermedades son responsables de altos niveles de pérdida de productividad, costos asociados al uso de los servicios de salud y a la implementación y monitoreo de políticas de inocuidad de los alimentos. Aproximadamente 70% de las diarreas se originan por la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos o toxinas (Andrea *et al.* 2012).

Un alto porcentaje de los casos de ETAS no pueden asociarse con algún alimento en particular o no es factible identificar al patógeno responsable, debido, fundamentalmente, a que los resultados de los análisis bacteriológicos demoran; o bien, el vehículo alimentario implicado ya no se encuentra disponible para su análisis, lo que sugiere la necesidad de establecer métodos rápidos y eficientes de detección del agente causal (González & Rojas 2005).

A continuación en la Tabla 2 se presentan los principales alimentos relacionados con ETAS.

Tabla 2 Principales intoxicaciones alimentarias y productos implicados

Organismo	Productos implicados
<i>Salmonella spp</i>	Carnes, leche, nata y huevo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Carne, postres
<i>Clostridium perfringens</i>	Productos cárnicos cocinados y recalentados
<i>Vidrio parahaemolyticus</i>	Pescados y mariscos
<i>Bacillus cereus</i>	Arroz
<i>Clostridium: botulinum</i>	Vegetales enlatados, pescado ahumado
<i>Campylobacter jejuni</i>	Leche
<i>Escherichia coli O157:H7</i>	Carne

Fuente: Cliver (1993)

1.2.1 Algunas bacterias patogénicas causantes de ETA

En años recientes, la etiología de las ETAS ha cambiado, a la vez han surgido patógenos nuevos o cepas más agresivas y resistentes a los antibióticos. Entre las enfermedades que son catalogadas como emergentes se incluyen las ocasionadas por *Escherichia coli* enterohemorrágica (particularmente el serovar O157:H7), *Campylobacter jejuni* y *Salmonella typhimurium*. Las bacterias más frecuentemente asociadas a casos de infecciones por consumo de alimentos contaminados aparecen enlistadas en la Tabla 3. La participación de *E. coli* en las enfermedades humanas ha sido reconocida prácticamente desde su descubrimiento. En años recientes la industria de alimentos ha reenfocado su atención sobre este microorganismo como una causa de morbilidad y mortalidad significativa y reconoce su valor como un indicador del estado higiénico de muchos tipos de alimentos (Blackburn. 2002).

Dentro de las principales causas que producen las ETA, se encuentran (Brown 1995):

- Enfriamiento inadecuado
- Preparación con demasiada anticipación al consumo
- Almacenamiento inadecuado
- Conservación a temperatura ambiente
- Tratamiento térmico insuficiente
- Higiene personal insuficiente
- Contaminación cruzada

Tabla 3 Principales intoxicaciones alimentarias y sus síntomas

Período Incubación	Síntomas	Microorganismo
1-6hrs	Náuseas y vomito	<i>S. aureus</i> ; <i>Bacillus cereus</i>
8-16hrs	Cólico y diarrea	<i>C. perfringens</i> ; <i>B.cereus</i>
16-48hrs	Fiebre, cólicos y diarrea, puede ser con sangre	<i>Salmonella</i> ; <i>Shigella</i> <i>E. coli</i> enteroinvasor; <i>Campilobacter yeyuni</i> <i>Vibrio parahemolítico.</i> <i>Yersinia enterocolítica</i>
16-72hrs	C. botulinum	<i>E. coli enterotoxigénico</i> ; <i>V. Chólera</i>
72-129hrs	Diarrea con sangre sin fiebre	<i>E.coli enterohemorrágico</i> ;
18-36hrs	Nauseas, vómitos, diarrea y parálisis	<i>C. botulinum</i>

Fuente:(M.S.P.:1er. Taller Nacional del Sistema VETA. Ed. OPS, 1999).

1.2.1.1 *Salmonella* spp.

Salmonella pertenece a la familia Enterobacteriaceae, el género posee dos especies: *Salmonella entérica* -con seis subespecies-, y *Salmonella bongori*, es un bacilo no formador de esporas, Gram-negativo, móvil, con dos excepciones no móviles: *S. gallinarum* y *S. pullorum*.

El principal reservorio de *Salmonella* no tifoideas son los animales infectados, que constituyen el principal reservorio de enfermedad humana y frecuentemente se encuentran asintomáticos. Se han aislados en aves de corral (pollos, pavos y patos), ovejas, vacas, cerdos, perros, gatos, pájaros, tortugas e iguanas. La ingestión de alimentos contaminados insuficientemente cocidos es la forma más frecuente de infectarse. El alimento puede estar contaminado porque el animal del cual derivó estaba enfermo, porque el mismo fue transportado o faenado en una planta conjuntamente con otros animales infectados, o porque los alimentos se contaminaron durante su preparación. Con escasa frecuencia esto último ocurre a partir de portadores humanos, que manipulan alimentos (Bazet et al; 2000).

La dosis infectante de *Salmonella* mínima se encuentra entre 15-20 células, pero depende de la edad y estado de salud del huésped y de las diferentes especies. Los síntomas de la enfermedad pueden ser agudos, incluyendo náuseas, vómitos, cólicos abdominales, diarrea, fiebre y dolor de cabeza y pueden durar de uno a dos días o prolongarse, donde las consecuencias crónicas son síntomas de artritis, que pueden aparecer de tres a cuatro semanas después de la aparición de los síntomas agudos. El hombre es el único reservorio natural de este tipo de *S. Typhi*. Las otras formas de salmonelosis producen generalmente síntomas más leves.

Los alimentos relacionados con la prevalencia de *Salmonella* son: carne cruda, pollo, huevos, leche y lácteos, moluscos bivalvos, camarones, pescados, patas de rana, levaduras, coco, salsas y aderezos para ensaladas, postres rellenos con crema y cobertura, manteca de cacahuate, cacao y chocolate (Almeida. 2006).

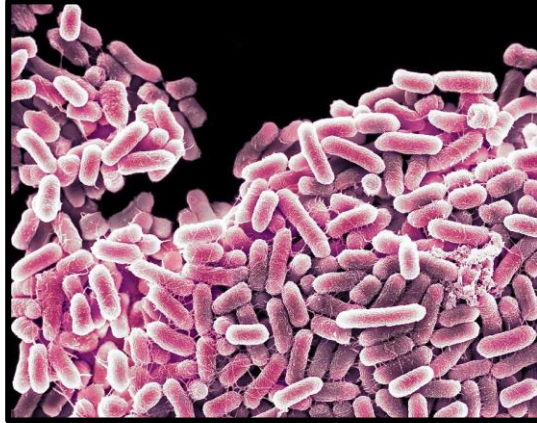


Figura 1 *Salmonella*, micrografía electrónica de barrido de color (SEM)

Science Photo Library 2013

1.2.1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli o *E. coli*, es una bacteria procariota de la familia *Enterobacteriaceae*, reacciona negativamente a la tinción de Gram, es anaerobio facultativo, móvil por flagelos, no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa y se encuentra comúnmente en el sistema digestivo de los seres humanos y animales de sangre caliente.

En la actualidad, se distinguen seis serotipos de *E. coli* que pueden producir gastroenteritis: *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), también conocida como verotoxigénica (ECVT), *E. coli* enteroagregativa (ECEA) y *E. coli* de adherencia difusa (ECAD). Los padecimientos se caracterizan por cólicos intensos (dolor abdominal) y diarrea, que inicialmente es acuosa y puede volverse sanguinolenta, también puede presentarse vómito y fiebre leve, generalmente la

enfermedad es auto limitante, con un promedio de duración de ocho días y en algunos individuos sólo puede presentarse diarrea acuosa (Almeida, 2006).

Una amplia gama de alimentos pueden servir como vehículo para la *E. coli* patógena en conjunto con sus respectivas ecologías. Los alimentos pueden contaminarse de manera directa o por contaminación cruzada durante el crecimiento y cultivo (hortalizas), recolección (leche) o faenado (carne). Se puede producir una contaminación adicional durante la manipulación poscosecha, transporte, elaboración y manipulación no higiénica de alimentos durante su preparación. Los factores que contribuyen a la persistencia de la *E. coli* en los sistemas alimentarios incluyen el control inadecuado de los parámetros de procesamiento como la temperatura de cocción, valor del pH, actividad del agua y almacenamiento con determinadas temperaturas. Entre los ejemplos de alimentos contaminados se encuentran: carne cruda/mal elaborada (carne fermentada, carne molida mal cocida, etc.), productos lácteos no pasteurizados (queso, leche, etc.), jugos de frutas no pasteurizados y hortalizas crudas (semillas germinadas, lechuga, espinaca, melones, hongos, etc.).

Los alimentos procesados pueden contaminarse a través de las materias primas, un tratamiento y manipulación inadecuados del agua, así como también a través de la contaminación cruzada. Las bacterias pueden continuar creciendo en los alimentos, a menos que se controlen los parámetros de los procesos pertinentes, como valor del pH, actividad del agua, temperatura y tiempo. Dependiendo del microorganismo unas pocas células bacterianas que sobrevivan en los alimentos pueden ser suficientes para provocar enfermedades (FAO 2012).

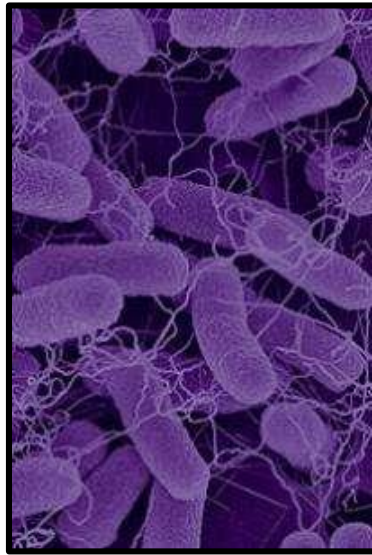


Figura 2 . Micrografía electrónica de barrido (SEM) de *Escherichia coli*

PhysOrg 2012

1.2.2 Condiciones de crecimiento

El crecimiento microbiano puede estar influido por una variedad de factores, tanto físicos como nutricionales. Entre los factores físicos se encuentran: la concentración de iones hidrógeno (pH), la temperatura, la concentración de oxígeno, la humedad, la presión hidrostática, la presión osmótica y la radiación. Los factores nutricionales comprenden la disponibilidad de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y otros minerales, y en algunos casos vitaminas (Olivas. & Alarcón. 2004).

El conocimiento de los factores ambientales nos permite explicar la distribución de los microorganismos en la naturaleza y hace posible diseñar métodos que controlen o potencien las actividades microbianas.

La temperatura es uno de los factores más importantes que afectan el crecimiento de los microorganismos y cada microorganismo tiene una temperatura de crecimiento adecuada. Se pueden distinguir cuatro grupos de microorganismos en relación con la temperatura óptima de crecimiento (Tabla 4).

Tabla 4 Clasificación de los microorganismos en base a su temperatura de crecimiento

Tipo de microorganismo	Temperatura mínima	Temperatura óptima	Temperatura máxima
Psicrófilo	-5 +5	12 - 15	15 - 20
Psicrótrofo	-5 +5	25 - 30	30 - 35
Mesófilo	5 - 15	30 - 45	35 - 47
Termófilo	40 - 45	55 - 75	60 - 90

Fuente: (Pisabarro, A. 2009).

Cada microorganismo tiene un rango de pH en cual puede crecer y un pH óptimo bien definido. Según en el pH que se obtenga mayor rendimiento (Tabla 5).

Tabla 5 Clasificación de los microorganismos en base a su pH de crecimiento

Clasificación	pH
Acidófilas	0 y 5.5.
Neutrófilas	5.5 y 8.0
Alcalófilas	8.5 y 11.5
Alcalófilas	<10.0

Fuente: (Varela, 2002).

Todos los microorganismos necesitan agua, y la disponibilidad de agua es un factor importante que en la naturaleza que determina el crecimiento de los microorganismos.

La gran mayoría de los microorganismos requiere valores de actividad de agua muy altos para poder crecer. De hecho, los valores mínimos de actividad para diferentes tipos de microorganismos son, los siguientes: bacterias $a_w > 0.90$, levaduras $a_w > 0.85$, hongos filamentosos $a_w > 0.80$.

En función de su tolerancia en ambientes con baja a_w , los microorganismos que pueden crecer en estas condiciones se clasifican en halotolerantes, halófilos y halófilos extremos, según toleren o requieran condiciones salinas o hipersalinas, respectivamente.

Los microorganismos son muy variados en cuanto a la necesidad o tolerancia del oxígeno, y se pueden dividir en varios grupos dependiendo del efecto del oxígeno (Tabla 6) (Pisabarro, 2009).

Tabla 6 Relaciones microbianas con el oxígeno

Grupo	Relación con el O₂	Tipo de metabolismo
<i>Aerobios</i>		
Estrictos	Necesario	Respiración aerobia
Facultativos	No necesario, pero crecen mejor con O ₂	Respiración aerobia, anaerobia, fermentación
Microaerófilos	Necesario pero a bajas tensiones	Respiración aerobia
<i>Anaerobios</i>		
Aerotolerantes	No necesario, ni crecen mejor con O ₂	Fermentación
Estrictos	Dañino o letal	Fermentación o respiración anaerobia

Fuente: (Microbiología agrícola 2010)

1.2.2.1 Condiciones de crecimiento de *Escherichia coli*

Esta bacteria se multiplica a temperaturas entre 6 y 50° C, con una temperatura óptima alrededor de 37° C. También, pueden crecer en presencia de un 6% de NaCl, ya que son más resistentes a estos compuestos que otras bacterias, como *Salmonella*, no toleran las temperaturas de congelación y son termorresistentes, aunque existen reportes que se pueden eliminar con tratamientos térmicos a 65° C (Elika; 2013).

En la Tabla 7 se resumen las condiciones de crecimiento de *E.coli* con sus valores mínimo, óptimo y máximo.

Tabla 7 Condiciones de crecimiento de *E.coli*

	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura	7-8	35-40	46
pH	4.4	6-7	10
Actividad de agua	0.95	0.995

Fuente: (Elika. 2013)

1.2.2.2. Condiciones de crecimiento de *Salmonella*

Salmonella puede ser transmitida a partir de animales hospedadores hacia alimentos derivados (carne, huevos, leche) y es capaz de multiplicarse a una velocidad muy elevada, duplicando su número cada 15 ó 20 minutos si la temperatura es superior a 20° C, y más significativamente, si la temperatura ambiente supera los 30°C, ya que su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. (Tabla 8). De acuerdo con lo reportado por Lake et al; (2002) el crecimiento de *Salmonella* disminuye en forma proporcional con la actividad de agua (a_w) de los alimentos.

Esta bacteria puede multiplicarse en valores de a_w que van desde 0.94 hasta 0.995, sin embargo en alimentos puede persistir con valores inferiores a 0.94, es decir al parecer se presenta un efecto protector sobre *Salmonella*, ejemplo de su sobrevivencia se ha reportado en productos como como chocolate, nueces y mantequilla de cacahuete (Lake et al, 2002), particularmente en pollo el crecimiento se inhibió en valores de actividad de agua de 0.98.

Tabla 8 Condiciones de crecimiento de *Salmonella*

	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura	5-2	35-43	46.2
pH	3.8	7-7.5	9.5
Actividad de agua	0.93	0.99	>0.99

Fuente (Elika. 2013)

1.3 Frutos Secos

Los frutos secos han formado parte de la alimentación desde hace miles de años, siendo muy apreciados en una importante cantidad de platillos, preferentemente en dulces y postres.

Tradicionalmente los frutos secos han sido considerados como alimentos de gran valor nutricional por su capacidad de aportar una extensa variedad de propiedades. Sin embargo, al ser muy energéticos (5,6 y 6,4 Kcal por gramo) y ricos en grasas, los frutos secos no se consumieron de forma regular durante años ante la creencia de que su consumo implicaba el aumento del peso corporal (McManus, *et, al.* 2001).

Todos los frutos secos tienen una composición similar en proteínas (13-26%), en azúcares (15-25%) y en lípidos (48-63%). A pesar del elevado contenido de estos últimos, los frutos secos poseen una composición muy adecuada desde el punto de vista nutricional, con un predominio en el aporte en ácidos grasos insaturados, donde los ácidos oleicos y linoleicos contribuyen en más del 75% del aporte graso, aunque cada variedad tiene sus propias características (USDA 1998).

Debido a las condiciones orográficas del país, en México la producción de frutos secos se ha localizado en las regiones centro y norte del país la producción de nuez, cacahuate, piñón y pistaches representaron un valor económico de producción por

\$3, 541, 200,800, pesos lo que se traduce en una importante derrama económica para el país (SIAP, 2009).

1.3.1 Características composicionales de algunos frutos secos

Dentro de los principales frutos secos se encuentran: las almendras, avellanas, cacahuates, pistachos, nueces y piñones. (Luna. & Guerrero. 2010). Estos productos poseen una composición similar en proteínas (entre 13 y 27%), sin embargo a continuación se describe con mayor detalle la composición de los frutos secos abordados en esta investigación

1.3.1.1 Cacahuete (*Arachis hypogaea*)

El cacahuete también es conocido como, maní, panchito, o cacahuey pertenece a la misma familia de los guisantes y las judías y en algunos reportes se le asocia con los frutos secos, o en forma de vaina con semillas.

En México, el área que se cultiva con cacahuete ha fluctuado de 55,000 a 75,000 hectáreas anuales, correspondiendo la mayor superficie sembrada a condiciones de temporal. La producción nacional actual es de 56,000 toneladas cuyo rendimiento medio es de 1,300 kg/ha Los principales estados productores mexicanos son: Jalisco, Chihuahua, Puebla, Veracruz, Sinaloa, Guanajuato, Morelos, Nayarit y Oaxaca (SAGARPA, 2002).

Como todos los frutos secos, los cacahuates son ricos en grasas, proteínas y vitaminas, entre los minerales resalta el zinc que ayuda al equilibrio hormonal, por su alto contenido en resveratrol, están considerados como protectores celulares y es considerado de los frutos más nutritivos si su consumo se realiza en forma cruda.

En la Tabla 9 se presenta la composición proximal del cacahuete en 100g de fruto.

Tabla 9 Composición proximal de cacahuete

Información nutrimental	
<i>Energía</i>	632kcal
<i>Grasa</i>	49,7g
<i>Carbohidratos</i>	22,4g
<i>Proteínas</i>	23,7g

Fuente: (FAO, 2004)

1.3.1.2 Pepita (*Cucurbita máxima*)

Las semillas de calabaza, también conocidas como pepitas, son semillas verde-oscuras, achatadas. Algunas están envueltas en una cáscara amarilla blanquecina, a pesar de que algunas variedades de calabaza producen semillas sin cáscara. Las semillas de calabaza tienen una textura maleable y masticable y un sabor discretamente suave, semejante al de la nuez.

Las principales entidades en México que producen semilla para el consumo son: Campeche, Guerrero, Michoacán y Tamaulipas, en las cuales se cultiva en la época de lluvias; sólo en Tamaulipas se produce en el ciclo Otoño–Invierno (SAGARPA, 1997).

De la calabaza se consumen los frutos maduros e inmaduros, las flores masculinas, las semillas secas y los meristemos tiernos de los tallos o guías (Lira, 1995); también se aprovecha la pulpa cocida o en conserva, pero las semillas representan el producto alimenticio y comercial más importante, por sus altos contenidos de aceite, proteína y fósforo. Las semillas tostadas y saladas se consumen en forma directa, y son el condimento principal para la elaboración de los moles conocidos como “pipianes” en diversas localidades de Guerrero, Oaxaca, Hidalgo, San Luis Potosí, Morelos y Veracruz; además, de las semilla se extrae aceite para preparar jabones finos (Ayvar, S. *et al.* 2004).

En la Tabla 10 se presenta la composición proximal de pepita de calabaza en 100g de fruto.

Tabla 10 Composición proximal de pepita de calabaza

Información nutrimental	
<i>Energía</i>	605kcal
<i>Grasa</i>	49,0g
<i>Carbohidratos</i>	18,5
<i>Proteínas</i>	22,5g

Fuente: (FAO, 2004)

1.3.2 Productos elaborados a base de frutos secos

En la actualidad existe gran variedad de frutos secos y formas de consumirlos, ya sea como parte de una dieta diaria o como principal ingrediente de algún tipo de postre, como , las pepitorias, elaboradas con obleas de harina de trigo, pepitas y miel, las Glorias preparadas con leche de cabra y nuez, los polvorones sevillanos, dulces de piñón, los dulces de leche, los jamoncillos de pepita de calabaza, y las famosas palanquetas preparada principalmente con azúcar y cacahuate; pero esta no es su única forma de consumo.

Determinados productos de repostería y panadería como los bizcochos, panes con semillas, galletas, bollos, cereales de desayuno, barritas de cereales, etc. también son elaborados a base de frutos secos. Los frutos secos se añaden a una variedad cada vez mayor de alimentos tales como las salsas de barbacoa y helados, además, también existe el aceite de frutos secos, como el aceite de girasol, de avellanas, etc. que provienen básicamente de ellos (Kinderlerer, 2005).

Dentro de la industria de las golosinas y botanas el cacahuate es muy apreciado, ya que se puede consumir de distintas maneras, ya sea pelado, tostado o enchilado, así también se puede elaborar, mantequilla de cacahuate o palanquetas (Fig. 3)

En la tabla 11 se resume particularmente la composición proximal de la palanqueta



Figura 3 Palanqueta de cacahuete

Fuente: Flickr

Tabla 11 Resumen nutricional de palanqueta de 20g

Información nutrimental	
<i>Calorías</i>	140kcal
<i>Grasa</i>	7.3g
<i>Carbohidratos</i>	8.25g
<i>Proteínas</i>	2.78g

Fuente: (Productos Promanuez)

Desglose de Calorías: 60% grasa, 30% carbohidratos, 10% proteína.

Las pepitas o semillas de calabaza son consumidas en diversos platillos de la gastronomía nacional incluyendo el mole verde, pipián, jamoncillo (Fig.4), dulce con oblea o simplemente salada o frita. En la Tabla 12. se presenta la composición proximal del jamoncillo



Figura 4 Jamoncillo de pepita de calabaza

Fuente: Flickr

Tabla 12 Resumen Nutricional en jamoncillo de 30g

Información nutrimental	
<i>Calorías</i>	340kcal
<i>Grasa</i>	4.18g
<i>Carbohidratos</i>	74.22g
<i>Proteínas</i>	3.8g

Fuente: (Dulces típicos La Zagala)

Desglose de Calorías: 11% grasa, 85% carbohidratos, 4% proteína

1.3.4 Microflora presente en frutos secos

La recolección es la clave del éxito en la posterior conservación del fruto seco, ya que es el primer eslabón de la cadena que termina en el envasado tras haberse sometido a conservación y procesado. Si el fruto seco lleva cáscara, ésta debe estar entera, seca y limpia, con su color característico y sin ennegrecimiento. En los frutos en grano, sin cáscara, los granos deben estar sanos, limpios sin presencia de infestación por insectos, sin olores ni sabores extraños.

Los frutos secos son un buen sustrato para el desarrollo de mohos, algunos de los cuales son productores de micotoxinas. Las más importantes son las aflatoxinas que causa diarrea o vómito si se consume en grandes cantidades. Sin embargo, otras resultan tóxicas y pueden provocar cáncer o problemas hepáticos.

La mayoría de los mohos que atacan los frutos secos son capaces de crecer e infectar fácilmente la superficie de las vainas por contacto en el campo antes de su recolección.

Los frutos se caracterizan por tener un valor de actividad de agua bajo y pH bajos, estos dos factores, junto con el tipo de contaminación, parecen ser los determinantes de que los mohos sean capaces de desplazar a las bacterias y levaduras en la carrera por colonizar los alimentos. (Salas, Ros, & Sabaté, 2005).

La semilla de calabaza, al ser extraída, es inocua; pero tradicionalmente es secada al sol, etapa donde el *Aspergillus flavus* se desarrolla y comienza a producir metabolitos que, a su vez, generan aflatoxinas. (Trejo .2006).

Sin embargo no es el único microorganismo presente en este tipo de productos. Recientes investigaciones ha mostrado que *Salmonella* Enteritidis ha persistido en un solo almendral por un periodo de 5 años y que el mismo organismo puede crecer y persistir en el suelo por extensos periodos de tiempo, es capaz de crecer rápidamente a niveles altos en la cáscara de la almendra húmeda y en las lechadas de cáscara y puede sobrevivir al secado de las cáscaras, lo cual se puede convertir en una fuente de recontaminación durante el procesamiento de la almendra si no se controla adecuadamente (Uesugi, 2006).

Se ha descubierto que las almendras, al igual que la mayoría de los productos agrícolas como granos, especias, cacao crudo, albergan *Salmonella* y otros patógenos. *Salmonella spp.* ha sido aislada de ellos y ha demostrado que sobrevive en pecanas, cacahuates, pistachos, semillas secas comestibles (ajonjolí, alfalfa, de melón, girasol, lino), nueces de Brasil, avellanas, nueces de macadamia, nueces y almendras (Kirk, et al; 2004).

Los frutos secos se estabilizan microbiológicamente mediante el secado que logra niveles de actividad de agua inferiores a 0,7. En estos niveles bajos de agua, la mayoría de los microorganismos no se multiplican, y la duración del fruto seco está normalmente limitada por la oxidación de los lípidos (rancidez). El proceso de secado suele disminuir las poblaciones microbianas eliminando gran parte de las

células. Esta reducción depende de una amplia variedad de factores que comprenden la cepa y las condiciones de cultivo, así como de las condiciones de humedad y de la temperatura durante el secado. Sin embargo, una vez seco, las poblaciones restantes de *Salmonella* y *E. coli* enterohemorrágica sobreviven muy bien en los frutos secos. Cuando se almacenan los frutos a bajas temperaturas en condiciones de refrigeración o congelación superado el año de almacenamiento. A temperatura ambiente, se presenta una reducción en el crecimiento y la sobrevivencia se mantiene durante varios meses (Harris 2012).

1.3.5 Incidencia y brotes de microorganismos por consumo de frutos secos

La seguridad alimentaria es una preocupación mundial y aproximadamente 1 de cada 6 personas en América del Norte sufren de enfermedades transmitidas por los alimentos que equivale a aproximadamente 48 millones de casos cada año y cuesta miles de millones de dólares a la industria de procesamiento de alimentos (CDC 2011). Recientemente las enfermedades transmitidas por los alimentos asociados con alimentos bajos en a_w (con actividad de agua, $a_w < 0,6$), tales como frutos secos, de mantequilla de cacahuete, especias, alimentos para mascotas y han elaborado una gran atención por parte del público, la industria y las comunidades de investigación (Cavallaro et, al. 2011). (Tabla 13).

La mayoría de estos brotes relacionados con alimentos de baja humedad han sido causadas por especies de *Salmonella*, sólo se requiere un número muy pequeño de células de *Salmonella* para causar la enfermedad (Beuchat et, al. 2011). Los serotipos de *Salmonella* comúnmente asociados con estos brotes son Enteritidis y Typhimurium (Beuchat, 2011).

Tabla 13 Brotes alimentarios y frutos secos implicados

Producto	Fuente	Microorganismo	Año	Número de casos	Lugar
Almendras	Enteras crudas	<i>Salmonella</i> <i>Enteriditis</i>	2000- 2001	168	Canadá
		<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	2012	27	Australia
		<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	2010	19	Australia
Nueces de la india	Mezcla de nueces	<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	2010	19	Australia
Avellana	Con cáscara	<i>E.coli</i> O157:H7	2010- 2011	2 8	Canadá USA
			2013	8	USA
Pistaches	Tostados	<i>Salmonella</i> <i>sentenberg</i>	2013	8	USA
	Tostados con cascara	<i>Salmonella</i> <i>montevideo</i>	2015- 2016	11	USA
Nuez	Con cascara, mitades, migas de nuez	<i>E.coli</i> O157:H7	2011	14	Canadá
Cacahuete	Mantequilla de cacahuete	<i>Salmonella</i> <i>Tennessee</i>	2007	628	USA
	Cacahuates secos	<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	2010	19	Australia

Fuente (UF Food Safety 2016)

Capítulo II. Metodología.

A continuación se muestra el diagrama general de trabajo que se utilizó para este estudio con ambos microorganismos y los dos tipos de dulces.

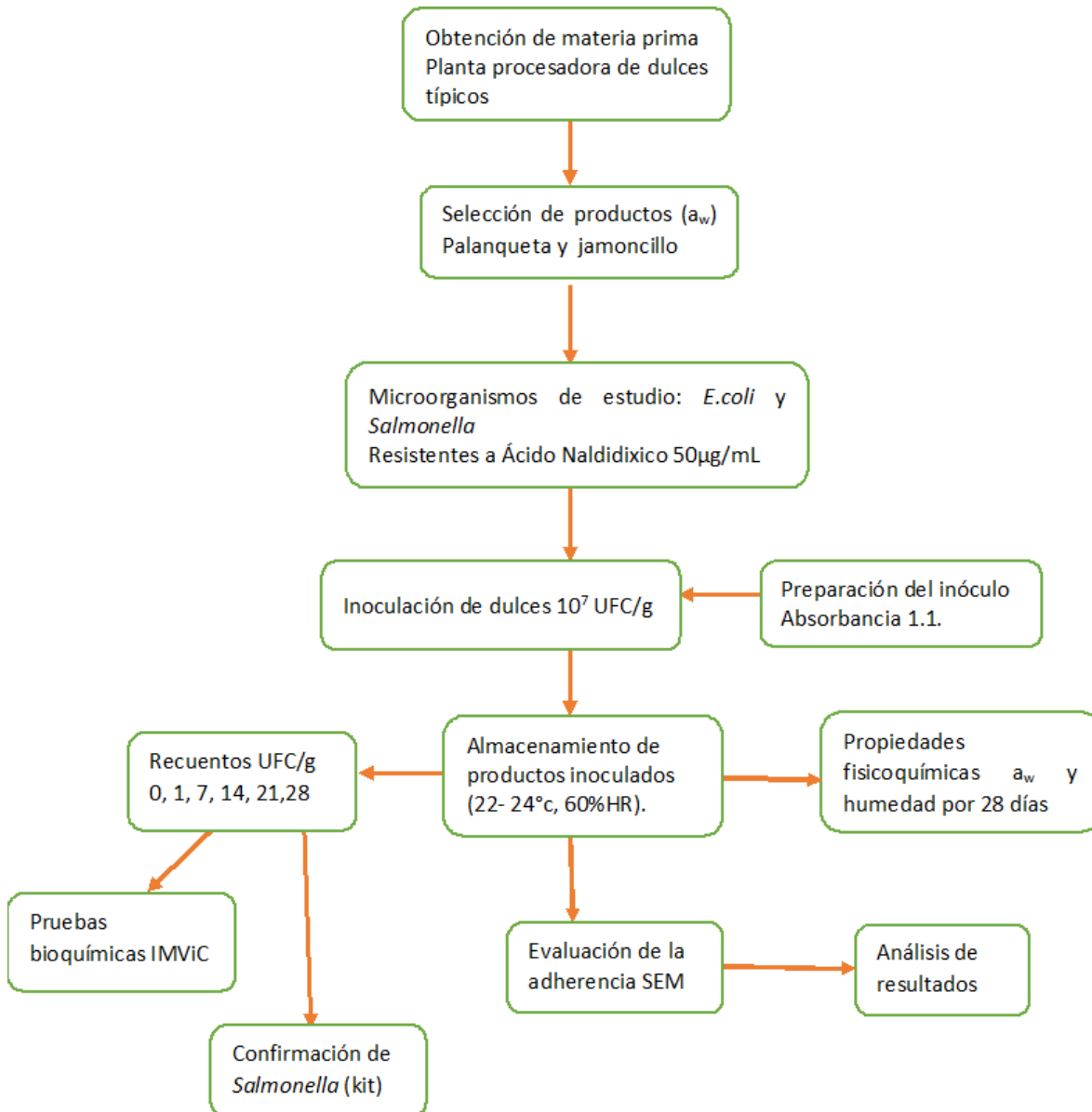


Figura 5 Diagrama de bloques de la metodología en esta investigación

2.1 Obtención de dulces típicos

Los dulces típicos fueron obtenidos de una planta procesadora de dulces típicos ubicada en la zona sur del Estado de Puebla (Fig. 6).

Se seleccionaron distintos productos en base a su composición y demanda y se almacenaron a temperatura ambiente para su posterior análisis.



Figura 6 Planta procesadora de dulces típicos de Puebla

2.2 Selección de productos

Para la selección de los dulces típicos de este estudio se analizaron 8 muestras, todos provenientes de la misma planta procesadora. Se analizaron de acuerdo con el parámetro actividad de agua utilizando un higrómetro de punto de rocío Decagon Aqualab y las mediciones se realizaron por cuatuplicado. Se seleccionaron dos dulces típicos la palanqueta y el jamoncillo (Fig.7) de frecuente consumo, elaborados a partir de frutos secos y con valores de agua menores a 0.7.



Figura 7 Selección de dulces típicos

2.3 Crecimiento y conservación de los microorganismos en estudio

Se utilizaron dos cepas, *E.coli* patogrupa enterotoxigénica (ETEC) y *Salmonella spp* ambas fueron aisladas previamente de alimentos y sembradas en Caldo Soya Tripticaseína (TSB, 7.3, BD Bioxon,) e incubadas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 ± 3 h. Se transfirió 1 mL del cultivo bacteriano a tubos con 9 mL de caldo TSB con una concentración final de ácido Nalidixico ($50 \mu\text{L}/\text{mL}$.) y se conservaron a -80°C y glicerol al 20% para su posterior uso.



Figura 8 Resistencia del inóculo

2.4 Preparación del inóculo

Se transfirió un stock de cada uno de los microorganismos en 100mL de caldo TSB incubados por 24h con agitación constante. El ajuste del caldo se realizó mediante espectrofotometría, garantizando una absorbancia de 1.1 que es equivalente a 10^7 UFC'/mL con una longitud de onda de 590nm (Guo *et al.*, 2001). (Fig.9).



Figura 9 Medición de absorbancia

2.5 Inoculación y almacenamiento de muestras

Se inocularon los dulces seleccionados mediante un enjuague en caldo TSB inoculados con ambos microorganismos con una población 10^7 UFC/mL y se prosiguió con el procedimiento reportado por Uesugi *et al* 2006 con algunas modificaciones, mismas que se mencionan a continuación. Los productos se pesaron en bolsas estériles 200g en 33mL de caldo TSB posteriormente se inocularon con un enjuague durante 2min. Los productos inoculados se colocaron sobre papel filtro en cajas petri, y se almacenaron en un recipiente hermético de plástico con tapa y se almacenaron a temperatura ambiente y humedad relativa, (23- 25°C, 60%HR). (Fig. 10).



Figura 10 Inoculación y almacenamiento de dulces típicos

2.6 Propiedades fisicoquímicas en muestra inoculada

2.6.1 Contenido de humedad

Se determinó el contenido de humedad como lo indica la AOAC (1990) empleando la técnica 964, cuyo procedimiento fue el siguiente: se colocaron charolas de aluminio perfectamente limpias con arena y una varilla de vidrio en una estufa marca RIOSSA modelo E51 hasta peso constante, se pesaron entre 2 y 2.5 g de muestra provenientes de los dulces inoculados, en una balanza Adventurer OHAUS; Se mezcló la muestra con arena para disgregar completamente la muestra. Se introdujeron las charolas en la estufa a 103 ± 2 °C. (Fig. 11).



Figura 11 Determinación de contenido de humedad

2.6.2 Actividad de agua

Para la determinación de actividad de agua se utilizó un higrómetro de punto de rocío Decagon Aqualab serie 3 (Fig.12).

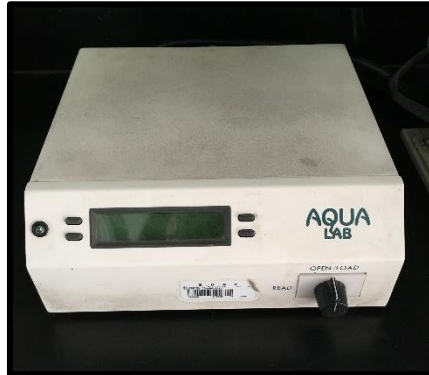


Figura 12 . Determinación de actividad de agua

2.7 Análisis microbiológicos de dulces inoculados

2.7.1 Recuento y enumeración

Para evaluar la sobrevivencia de *E. coli* y *Salmonella* en los productos inoculados se realizaron recuentos microbianos en los tiempos 0, 1, 7, 14, 21,28 días y se consideró como testigo dulces sin inocular (Beuchat 2011).

Para los recuentos se pesaron 10 gr de cada muestra, y se colocaron en bolsas estériles a las cuales se les adicionaron 90ml de agua peptonada y posteriormente las muestras fueron homogeneizadas en un homogeneizador de paletas modelo BagMixer 400 por 2 minutos a baja velocidad (Fig.13).



Figura 13 Homogeneizado de la muestra

A partir de dichos homogeneizados se realizaron 3 diluciones seriadas y se sembraron en placas de agar EMB (Eosina Azul de Metileno) y VB (Verde Brillante) adicionadas con ácido Nalidixico, para los recuentos de *Escherichia coli* y *Salmonella* respectivamente. La siembra de las diluciones se realizó mediante la técnica de extensión en superficie. (Fig. 14) Las placas se incubaron a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 ± 3 h; Lo recuentos de ambos microorganismos fueron realizados por triplicado.



Figura 14 Siembra por extensión en superficie

2.7.2 Confirmación de *Salmonella* y *Escherichia coli*

Se seleccionaron colonias de los medios selectivos y se realizaron pruebas bioquímicas básicas IMViC, (Indol, Rojo de metilo, Voges-Proskauer y Citrato) (Fig.15) para la confirmación de los microorganismos en estudio en los productos inoculados y almacenados a diferentes tiempos.

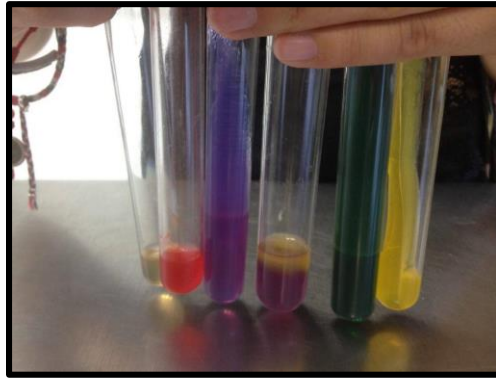


Figura 15 Confirmación de E.coli

Específicamente para *Salmonella* se realizó una confirmación adicional mediante el uso del kit de detección rápida (*Salmonella* detection kit), el cual fue proporcionado por Mississippi State University (Kim & Silva, 2015). El modo de preparación y uso se encuentran en el Anexo 1 y 2.

El kit fue utilizado en cada uno de los tiempos de esta investigación (0,1, 7, 21,28)

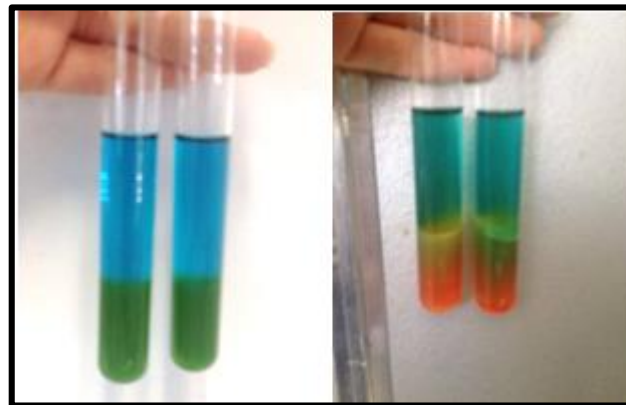


Figura 16 Confirmación de *Salmonella* mediante kit de detección rápida

2.8 Microscopía de barrido

Para la confirmación de la adherencia de *Escherichia coli* y *Salmonella spp* sobre las muestras analizadas se realizaron microscopías de barrido.

Los dulces se colocaron sobre un porta muestras usando una cinta doble adhesivo de carbón. Se recubrieron con oro durante cuatro minutos en una ionizadora de metal.

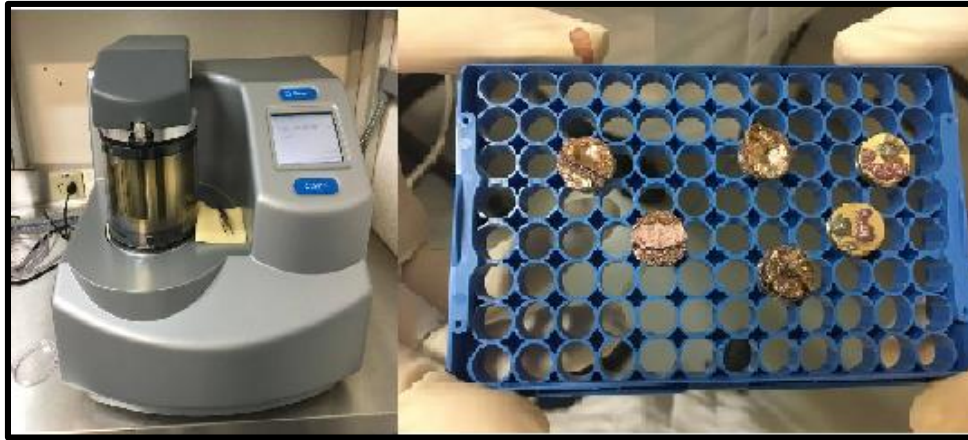


Figura 17 Recubrimiento de dulces inoculados con oro

Las muestras resultantes se observaron en un microscopio electrónico de barrido con condiciones de operación de 10 a 15 Kv.



Figura 18 Microscopio electrónico de barrido

2.9 Análisis estadístico

Los resultados de los recuentos microbianos se analizaron por medio de análisis tipo ANOVA ($P < 0.05$) y asimismo se realizaron Pruebas de comparación de medias Tukey para encontrar la diferencia significativa entre los valores.

Capítulo III. Resultados y discusión

3.1 Selección de productos

Dentro de los dulces típicos más consumidos en Estado de Puebla se encuentran: los camotes, las palanquetas, las tortitas de Santa Clara, los borrachitos, los jamoncillos y las alegrías. El mercado nacional es el principal consumidor de estos productos y los clientes internacionales constituyen una minoría probablemente porque estos desconocen el producto en cuanto a sus características principales de sabor, composición, forma y nombre (Domínguez, 2005).

Varios de los productos típicos son elaborados con frutos secos como cacahuete, nuez, pepita de calabaza, almendras, mismos que han sido asociados en varios reportes con la contaminación por microorganismos como *Salmonella Enteriditis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhimurium*, *E.coli* O157:H7 entre otros (UF Food Safety 2016).

En este estudio se seleccionaron diferentes dulces en base a su composición, demanda, y valor de a_w , mismos que se muestran en la Tabla 14. El valor de actividad de agua está relacionado con el contenido de agua de los alimentos es uno de los factores individuales que más influye en su alterabilidad, sin embargo ciertos alimentos con el mismo contenido de agua pueden sufrir un proceso de

alteración diferente y tener distintas vidas de anaquel, ya que su estabilidad está en función de la actividad de agua (Badui, 2006).

Tabla 14 Valores de a_w entre los dulces típicos de mayor consumo en el Estado de Puebla

Dulce	Actividad de agua
Camote de fresa	0.68±0.14 ^a
Dulce de leche	0.65±0.00 ^a
Jamoncillo	0.68±0.00 ^a
Palanqueta de cacahuete	0.50±0.01 ^b
Tortita de Santa Clara	0.53±0.56 ^b
Palanqueta de pepita	0.41±0.01 ^c
Dulce de piñón con leche	0.66±0.05 ^a
Dulce de nuez con leche	0.70±0.01 ^a

*Valores promedio de n=5 ± desviación estándar.

Los dulces típicos presentaron diferencias significativas en su actividad de agua, los que presentaron valores menores fueron la palanqueta (0.5) y el jamoncillo (0.68), esto los clasifica como productos de humedad intermedia (0.65-0.85) (Alarcón 2005). Ambos productos fueron seleccionados para evaluar la sobrevivencia de *E.coli* y *Salmonella*. De acuerdo con (Beuchat, 1987) las diferencias en la a_w en los frutos secos pueden estar asociadas con el contenido de lípidos, proteínas y carbohidratos presentes en los productos.

Los productos seleccionados están elaborados a partir de frutos secos, de cacahuete y pepita de calabaza para la palanqueta y el jamoncillo respectivamente.

3.2 Desarrollo de *E.coli* en los productos seleccionados

E.coli fue inoculada en ambos dulces con una población inicial de 7 Log₁₀ UFC/g, durante el almacenamiento se observó una reducción en el crecimiento microbiano en ambos productos, en la Figura 19 se puede apreciar como el crecimiento en palanqueta se detiene a los 14 días, sin embargo esta bacteria en jamoncillo mantuvo una población de 2.3 Log UFC/g al término del almacenamiento 28 días. Kimber *et, al* 2010 reporta valores de *E.coli* O157:H7 de 2.5 Log₁₀ UFC/g después de 3 días de inoculación en almendras y de 1.2 Log₁₀ UFC/g en pistaches, partiendo con una población inicial de 6 Log₁₀ UFC/g

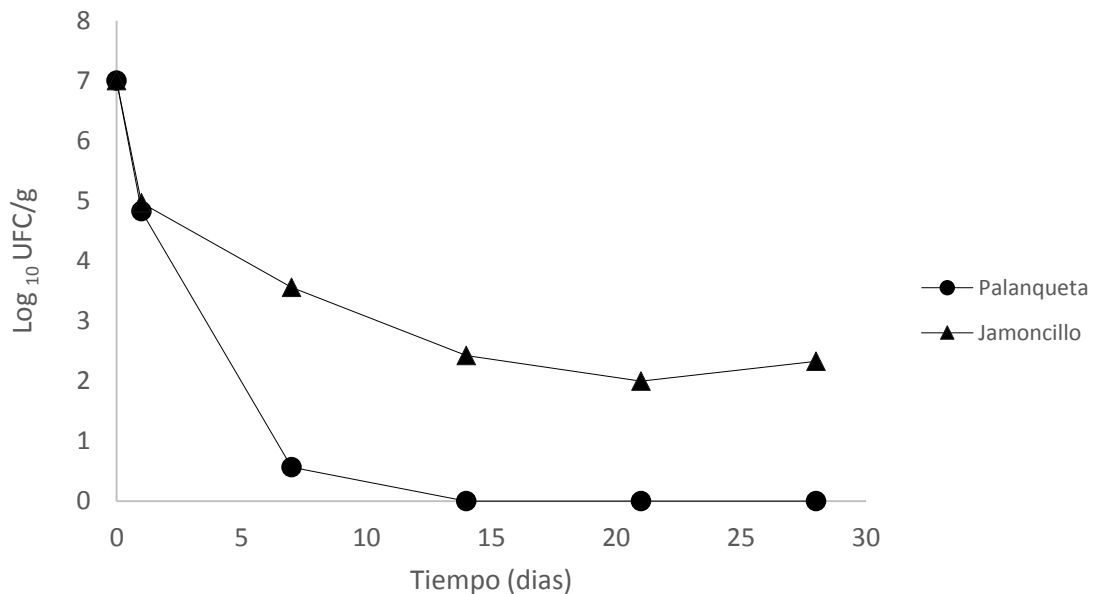


Figura 19 Sobrevivencia de *E.coli* inoculada en ambos dulces

3.2.1 Efecto de la a_w y humedad sobre el desarrollo de *E.coli* en productos seleccionados

Las muestras inoculadas permanecieron en sistemas herméticos con un contenido de humedad relativa del 7 % y una temperatura aproximada entre 22-24°C. Los valores de a_w y humedad en palanqueta se incrementaron a partir del tiempo 1 en comparación con el tiempo 0, como se puede apreciar en la Tabla 15. Los valores para palanqueta en ambos parámetros fueron del 7% y 0.68 para humedad y a_w respectivamente al finalizar los 28 días de almacenamiento (Tabla 15).

Tabla 15 Contenido de humedad, a_w y recuentos en palanqueta inoculado con *E.coli*

Tiempo (días)	Contenido de humedad (%)	Actividad de agua	Recuentos Log UFC/g
0	2.06±0.14 ^c	0.50±0.01 ^c	7.00±0.00
1	7.75±0.00 ^a	0.72±0.02 ^a	4.83±0.16
7	6.53±0.52 ^b	0.74±0.05 ^a	0.56±0.98
14	6.29±0.24 ^b	0.60±0.00 ^b	s/c
21	7.86±0.45 ^a	0.74±0.00 ^a	s/c
28	7.05±0.05 ^{ab}	0.68±0.02 ^a	s/c

*Valores medios de %H, a_w y recuentos microbianos con la misma letra son estadísticamente iguales dentro de una misma columna según la prueba de Tukey (5%). s/c (sin crecimiento)

En relación con el jamoncillo se logra apreciar una disminución paulatina en el contenido de humedad alcanzando un valor de 3.7%. Mientras que la a_w incrementó su valor en el tiempo 1 a 0.82 el cual se mantuvo hasta los 28 días de almacenamiento. Este valor de a_w tuvo un efecto significativo sobre el desarrollo de *E.coli*, sin embargo la bacteria se mantuvo viable con un crecimiento mayor a 2 Log₁₀ UFC/g hasta los 28 días. Este comportamiento de *E.coli* no coincide con lo reportado por Fernández, 1981 quien considera que esta enterobacteria es capaz de sobrevivir con valores mínimos de a_w 0.95 (Tabla 16).

Tabla 16 Contenido de humedad y a_w y recuentos en jamoncillo inoculado con *E.coli*

Tiempo (días)	Contenido de humedad (%)	Actividad de agua	Recuentos Log UFC/g
0	8.61±0.06 ^a	0.68±0.00 ^c	7.00±0.00 ^a
1	7.73±2.83 ^{ab}	0.82±0.00 ^a	4.96±0.22 ^b
7	4.92±0.48 ^{bc}	0.82±0.00 ^a	3.56±0.13 ^c
14	4.92±1.23 ^{bc}	0.81±0.00 ^{ab}	2.42±0.15 ^d
21	3.93±0.05 ^c	0.80±0.00 ^b	1.99±0.09 ^d
28	3.74±0.11 ^c	0.80±0.01 ^b	2.32±0.32 ^d

* Valores medios de %H, a_w y recuentos microbianos con la misma letra son estadísticamente iguales dentro de una misma columna según la prueba de Tukey (5%).

3.3 Desarrollo de *Salmonella* en los productos seleccionados

La palanqueta y el jamoncillo fueron inoculados con *Salmonella* spp. con una población inicial de 7 Log₁₀ UFC/g, en la Figura 20 se observa como el crecimiento microbiano es muy similar en ambos productos, así como la sobrevivencia hasta el día 28, con una población de 2.16 Log₁₀ UFC/g para palanqueta y 2.73 Log₁₀ UFC/g para jamoncillo; en el estudio de Kimber *et. al.* 2010 inició con una población de 6

Log₁₀ UFC/g y reporta valores de crecimiento de *Salmonella* de 1.6 Log₁₀ UFC/g en almendras y de 1.1 Log₁₀ UFC/g en pistaches después de 3 días de almacenamiento.

Por otro lado Wei, (2015) reporta una disminución gradual de 5 cepas distintas de *Salmonella* después de 14 días inoculadas en azúcar granulada, presentando una reducción de 2.29 - 3.36 Log₁₀ UFC/g, partiendo de una población inicial de 7.5 Log₁₀ UFC/g

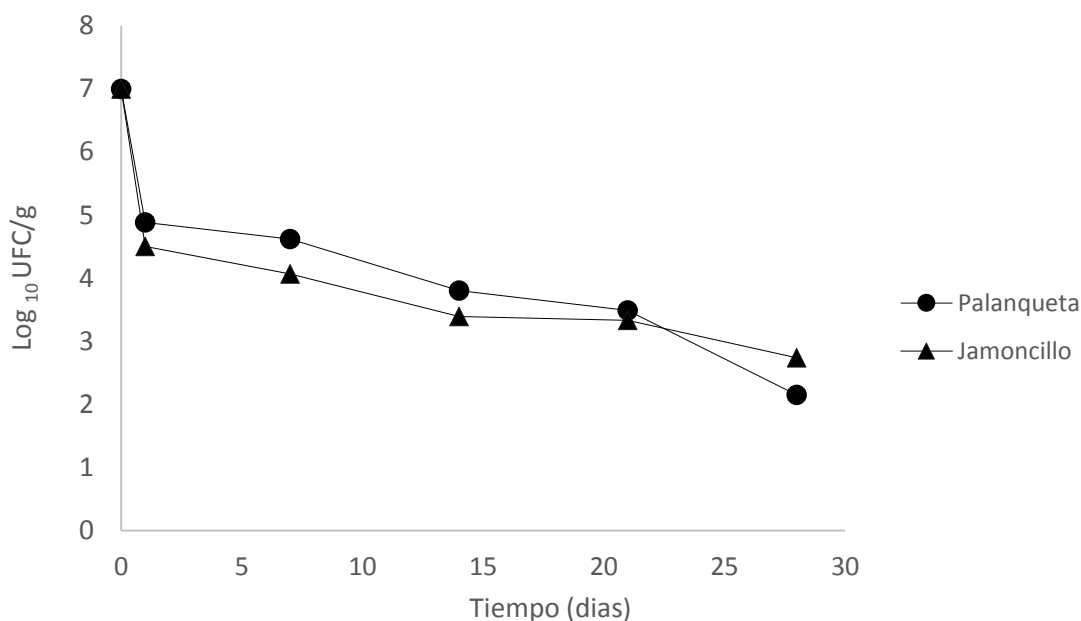


Figura 20 Supervivencia de *Salmonella* inoculada en ambos dulces

3.3.1 Efecto de la a_w y humedad sobre el desarrollo de *Salmonella* spp. en productos seleccionados

La humedad y a_w fueron monitoreadas durante todo el tratamiento (Tabla 17), en el día 28, la palanqueta presento una humedad de 5.9% muy por debajo del valor, presentado en el día 1, (8.2%). Mientras que la a_w no presentó diferencia significativa entre el día 1 (0.80) y el 28 (0.82), ésta a_w fue capaz de sustentar el

crecimiento microbiano de *Salmonella* hasta 2 Log₁₀ UFC/g, en ambos productos aunque sus valores mínimos de desarrollo son de 0.93 (Elika, 2013).

Tabla 17 Contenido de humedad y a_w y recuentos en palanqueta inoculado con *Salmonella* spp.

Tiempo (días)	Contenido de humedad (%)	Actividad de agua	Recuentos Log UFC/g
0	2.06±0.14 ^d	0.50±0.01 ^e	7.00±0.00 ^a
1	8.28±1.76 ^{ab}	0.80±0.00 ^{ab}	4.88±0.14 ^b
7	7.21±0.39 ^{abc}	0.77±0.01 ^b	4.62±0.51 ^b
14	9.28±0.52 ^a	0.67±0.02 ^c	3.08±0.19 ^c
21	6.81±0.00 ^{bc}	0.57±0.00 ^d	3.48±0.53 ^c
28	5.98±0.35 ^c	0.82±0.00 ^a	2.15±0.15 ^d

* Valores medios de %H, a_w y recuentos microbianos con la misma letra son estadísticamente iguales dentro de una misma columna según la prueba de Tukey (5%).

El comportamiento de *Salmonella* en jamoncillo fue muy similar al de la palanqueta, con respecto a la a_w ya que esta se mantuvo con un valor de 0.8 en casi todos los tiempos (Tabla 18). De la misma manera este parámetro fue suficiente para garantizar la sobrevivencia del microorganismo en 2.7 Log₁₀ UFC/g hasta el día 28 de almacenamiento. El aumento del contenido de humedad del tiempo 0 (8.6 %) con respecto al 1 (9.4 %) es mínima, no obstante el porcentaje de humedad disminuyó hasta 6.5% en el día 28 (Tabla 18).

Tabla 18 Contenido de humedad y aw y recuentos en jamoncillo inoculado con *Salmonella* spp.

Tiempo (días)	Contenido de humedad (%)	Actividad de agua	Recuentos Log UFC/g
0	8.61±0.06 ^{ab}	0.68±0.00 ^d	7.00±0.00 ^a
1	9.47±0.08 ^a	0.82±0.01 ^{ab}	4.50±0.38 ^b
7	6.35±0.45 ^{ab}	0.84±0.00 ^a	4.06±0.04 ^{bc}
14	6.02.62±0.51 ^b	0.83±0.00 ^a	3.39±0.08 ^{cd}
21	9.21±2.29 ^a	0.77±0.00 ^c	3.33±0.15 ^{cd}
28	6.56±1.53 ^{ab}	0.80±0.01 ^{bc}	2.73±0.73 ^d

*Valores medios de %H, aw y recuentos microbianos con la misma letra son estadísticamente iguales dentro de una misma columna según la prueba de Tukey (5%).

Cabe mencionar que en el jamoncillo hubo presencia de hongos a partir del día 14, para el día 28 ambos dulces presentaron una gran cantidad de hongos (Fig.21). A pesar de esta contaminación los recuentos de *Salmonella* permanecieron hasta el día 28.

Hay reportes de que algunos hongos como *Penicillium* y *Rhizopus* pueden inducir cambios en textura y pH en los alimentos, los cuales favorecen la sobrevivencia y proliferación de otros microorganismos (Riordan *et al.*, 2000) Específicamente, se ha reportado que en presencia de *Rhizopus* el nivel de población de *S. typhimurium* se puede incrementar de 10 a 100% (Wells & Butterfield, 1999).



Figura. 21 Dulces inoculados con presencia de hongos

3.4 Sobrevivencia del inoculo en ambos tipos de dulces

En ambos productos la sobrevivencia de *Salmonella* fue mayor en comparación con *E.coli* (Fig.22 A-B); Beuchat 2011 reporta un estudio similar, mostrando una disminución significativamente mayor en *E.coli* O157:H7 con nueces (4.4. Log₁₀ UFC/g) en comparación con *Salmonella* Enteritidis PT 30 (3.1 Log₁₀ UFC/g).

En la Figura 22 A se observa que *Salmonella* presento mayor sobrevivencia que *E.coli* en palanqueta, este producto presenta una gran cantidad de grasa 0.37g por cada gramo de producto (Productos Promanuez). Demostrando con ello que cuanto mayor sea el contenido de grasa, habrá un incremento en la supervivencia de *Salmonella*, probablemente debido al efecto protector de los sólidos (Miller et al., 1972). La combinación de baja a_w y el alto contenido en grasa podría tener un efecto sinérgico en la sobrevivencia de *Salmonella* (Hiratmasu et, al. 2005). Asimismo Podolak, et, al. (2010) sugiere que *Salmonella* puede sobrevivir en periodos prolongados de tiempo en alimentos con baja actividad de agua, especialmente en aquellos que poseen un alto contenido en grasa. Este mismo estudio considera que

aparte de la a_w la inhibición de *Salmonella* se presenta por otros factores en el ambiente como la atmosfera y la humedad relativa.

Es bien reconocido que *Salmonella* representa un verdadero peligro para una amplia gama de alimentos de baja humedad. A pesar de que el organismo no crece, puede sobrevivir durante periodos prolongados de tiempo y causa la enfermedad. A diferencia de otras bacterias Gram negativas (*E.cloacae*, *E.coli*) *Salmonella* parece tener un mecanismo o estructura de protección que permite que este organismo para sobrevivir mejor en condiciones de baja humedad (Janning 1994).

Uno de los mecanismos de sobrevivencia de *Salmonella*, se da debido a que este microorganismo puede entrar en un estado viable no cultivable (VBNC), el cual representa un estado “latente” de las células vegetativas y una estrategia de supervivencia para muchas especies no esporulados (Lesne *et, al.* 2000). Al entrar en un estado VBNC permite la viabilidad del organismo en condiciones hostiles y volver al estado en condiciones favorables. Sin embargo no es claro si *Salmonella* en éste estado mantiene su capacidad patogenia por lo tanto es una preocupación para la inocuidad de los alimentos (Winfield, & Groisman 2003).

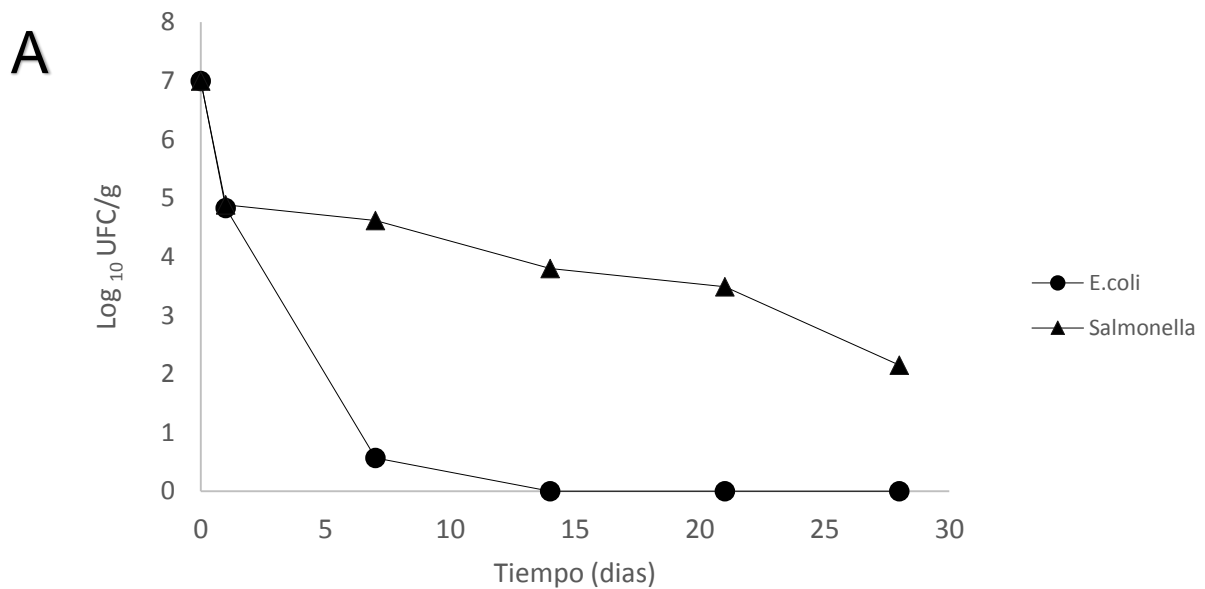
La formación de biopelículas es otra manera por la cual *Salmonella* sobrevive a las condiciones hostiles del medio ambiente (Solano, 2002). Sin embargo, en base a la literatura disponible, no está claro si *Salmonella* puede formar biopelículas en condiciones de baja humedad.

De acuerdo con Blessington *et, al.* (2010) consideran que *E.coli* se ha asociado a recientes brotes presentados por el consumo de alimentos de baja humedad, particularmente se ha aislado en la superficie de nueces, por lo anterior sugieren que este organismo debe ser considerado una amenaza para la producción y procesamiento de nueces y otros frutos secos.

Csonka (1989) sugiere que en condiciones de baja humedad, las células bacterianas tratan de mantener su presión de turgencia por el aumento en la concentración intracelular de solutos compatibles. La respuesta de las bacterias

implica equilibrar rápidamente la presión osmótica con el fin de evitar la pérdida de agua.

La sobrevivencia de ambos microorganismos (*E.coli* y *Salmonella*) en jamoncillo (Fig. 22 B) se encuentra relacionado con su alto contenido de azúcar 74.22 g en 30g de producto (Dulces típicos La Zagala); Hiratmasu et, al. 2005 menciona que *Salmonella* es capaz de sobrevivir en presencia de azúcar y grasa durante meses, en alimentos como mantequilla de cacahuete y papas fritas. Por su parte Sabri et al. (2010) y Leslie et, al (1995) reportan que se favorece el crecimiento de *E.coli* en ambientes que presentan altas concentraciones de azúcares como glucosa y sacarosa.



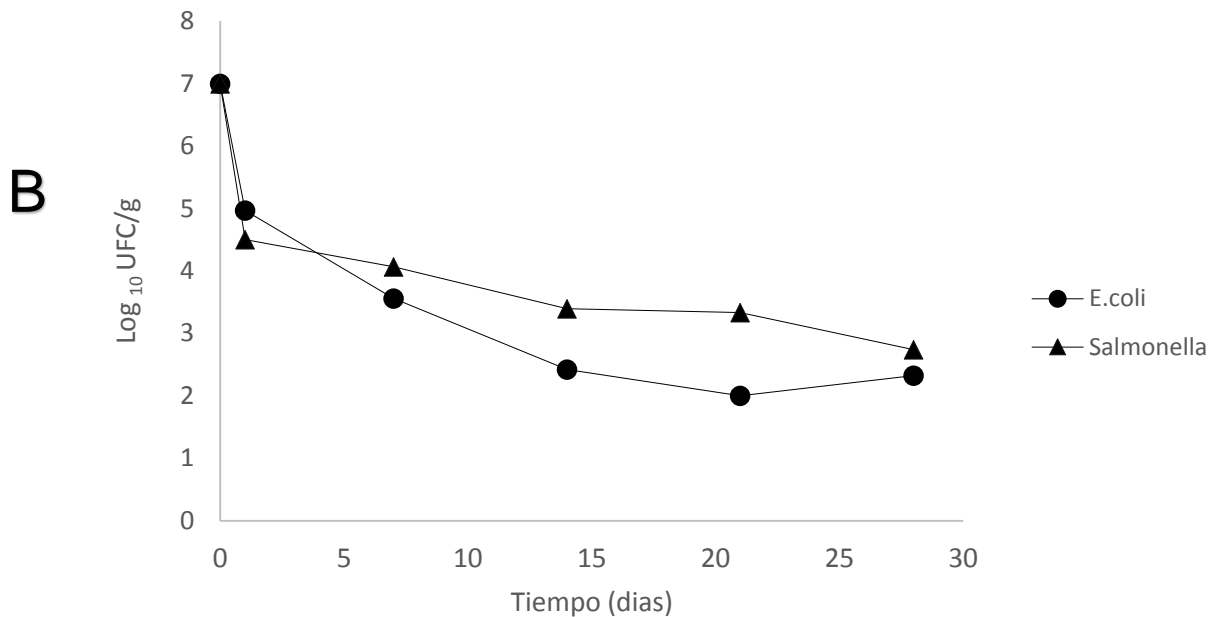


Figura 22 (A) Crecimiento de *Salmonella* y *E.coli* en palanqueta (B) crecimiento de *Salmonella* y *E.coli* en jamoncillo

3.5 Microscopias de barrido

Los resultados obtenidos en los recuentos de cada uno de los productos fueron contrastados con las microscopias de barrido (SEM). Las microscopias fueron tomadas 2 días después de la inoculación del jamoncillo (Fig.23) y la palanqueta (Fig.24) con una población de 4 Log₁₀ UFC/g. Sin embargo en ellas no se pudieron observar los distintos patógenos (*E.coli* y *Salmonella*) adheridas a las muestras. Lo anterior puede explicarse a que las muestras a pesar de haber sido recubiertas con oro, contaban con mucha humedad. Por otra parte las altas cantidades de azúcar presentes en ambos dulces impidieron observar con claridad a las bacterias mismas que se presupone se encontraban embebidas en el azúcar. Se cree que el azúcar al estar en contacto con el inóculo se disuelve y envuelve las bacterias observándose únicamente algunos cristales.

Cabe resaltar que a pesar de que no se pudo observar la presencia de *E.coli* y *Salmonella*, los recuentos en placa nos confirman la existencia o sobrevivencia de ambos patógenos en los productos inoculados.

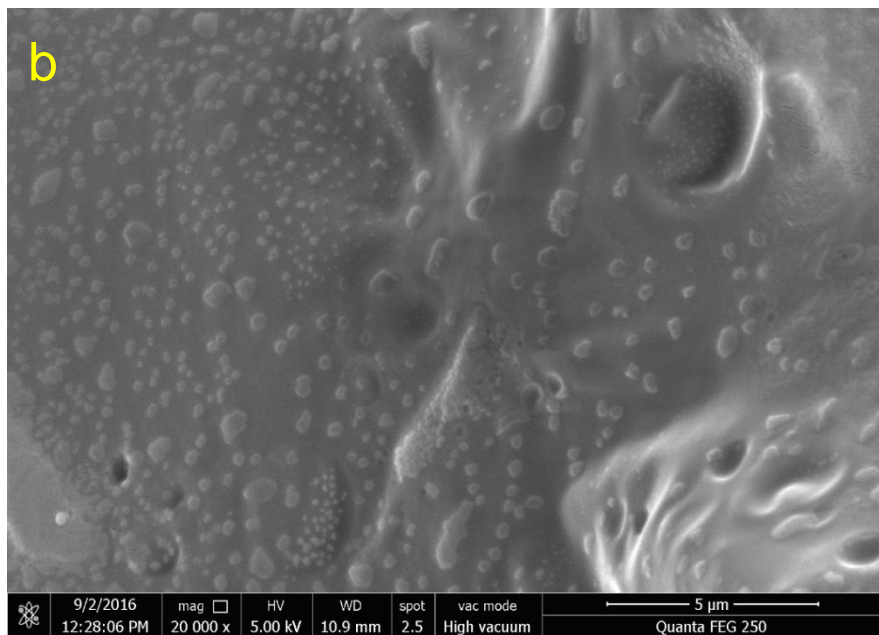
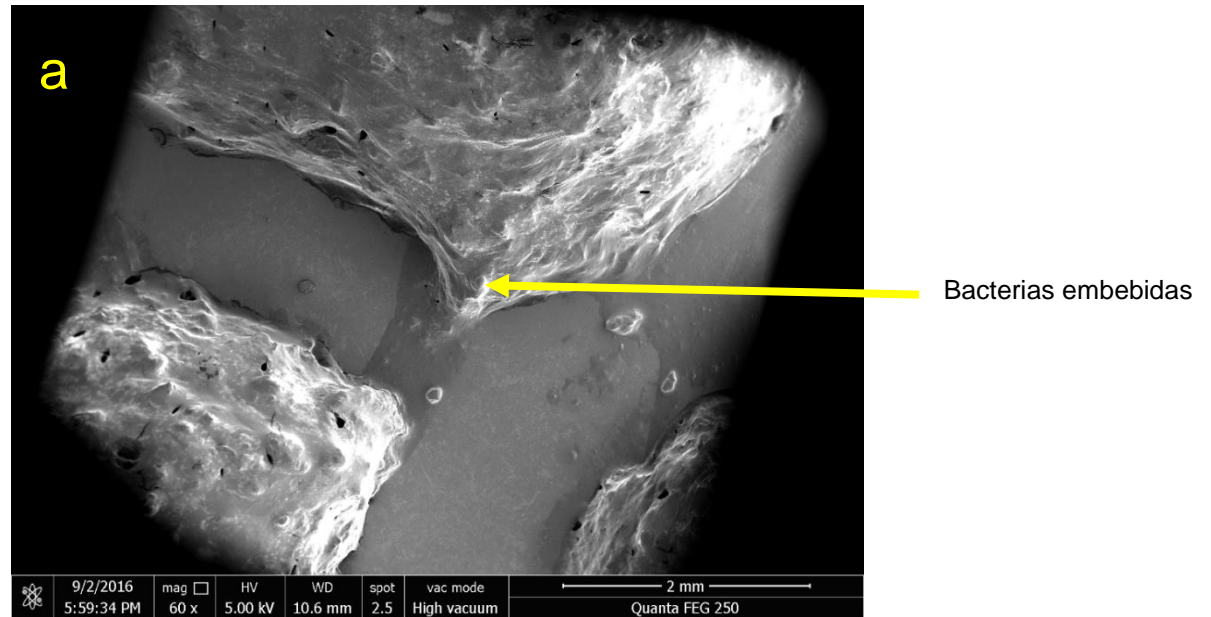
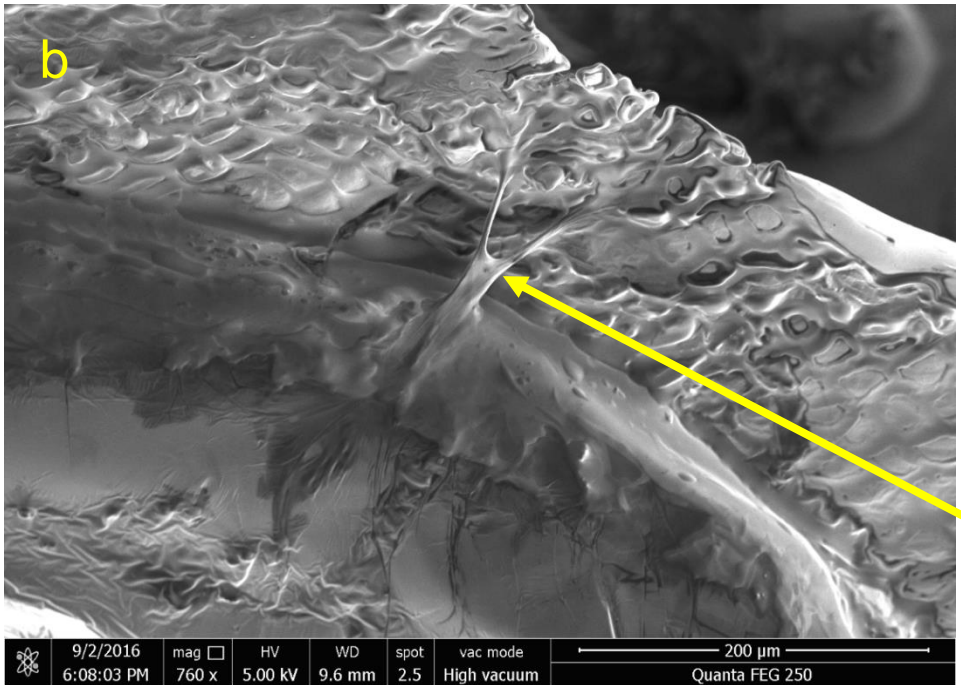
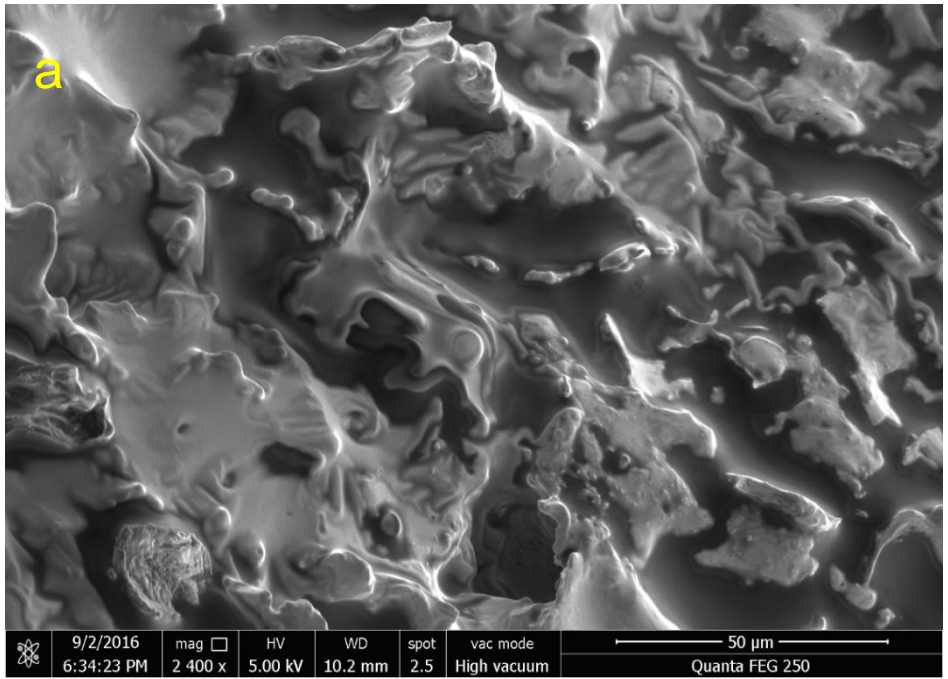


Figura 23 Microscopía de barrido (SEM) en Jamoncillo a) *E.coli* b) *Salmonella*



Recubrimiento de azúcar

Conclusiones

- Se seleccionaron la palanqueta y el jamoncillo debido a la baja a_w que presentaron 0.5 y 0.68 respectivamente, así también por su alto consumo en el estado de Puebla
- *E.coli* fue capaz de sobrevivir en jamoncillo por 28 días con una a_w final de 0.8 y en palanqueta por 7 días con una a_w de 0.68
- *Salmonella* resistió durante 28 días en jamoncillo y palanqueta con una a_w de 0.80 y 0.82 respectivamente al término del almacenamiento.
- El jamoncillo fue el producto donde ambos microorganismos presentaron mayor resistencia con una población de 2.3 Log₁₀ UFC/g para *E.coli* y de 2.7 Log₁₀ UFC/g para *Salmonella* al término de los 28 días.
- En la palanqueta la sobrevivencia de *Salmonella* fue mucho mayor con una población de 2.1 Log₁₀ UFC/g al final de los 28 días, en contraste a *E.coli* quien únicamente presentó recuentos hasta el día 7 con una población de 0.5 Log₁₀ UFC/g
- La alta cantidad de azúcar y grasa presente en ambos productos sirve como mecanismo de sobrevivencia para estos microorganismos
- Los frutos secos como el cacahuate y la pepita de calabaza pese a su baja a_w si son capaces de permitir el crecimiento microbiano de *E.coli* y *Salmonella*

Sugerencias

- Estos productos no solo están expuestos a estos dos microorganismos, por lo que se podría investigar acerca de la sobrevivencia de otro tipo de Enterobacterias.
- Ya que la presencia de estos patógenos estuvo hasta por 28 días en este tipo de productos es recomendable seguir con su estudio, prolongando el tiempo de almacenamiento y valorando la sobrevivencia.
- Puebla cuenta con una gran variedad de dulces típicos, por lo que se recomienda investigar sobre la sobrevivencia de *E.coli* y *Salmonella*, en otros productos que cuenten con una a_w similar a la palanqueta y el jamoncillo.
- Las altas cantidades de azúcar y grasa que fueron factores importantes para la sobrevivencia de estos microorganismos, sin embargo no son los únicos parámetros a valorar, se sugiere monitorear la sobrevivencia de estos microorganismos considerando factores como pH, la temperatura y la humedad relativa.
- Debido a que las altas concentraciones de azúcar presentes en los dulces impidieron observar con claridad los microorganismos presentes, se recomendaría utilizar un microscopio de inmunofluorescencia ya que con los distintos cortes que se realizan, se podrían observar los microorganismos.
- Para evitar la contaminación de este tipo de productos, los establecimientos deberán contar con medidas de control para mitigar los riesgos asociados a la manipulación, como el almacenamiento adecuado, el equilibrio del flujo de aire, diseño sanitario de las instalaciones y equipo de procesamiento, sanitización de los utensilios de trabajo y evitar introducción de humedad en ambientes secos.

Anexos

1. Procedimiento para la preparación del kit de detección de Salmonella

A. Preparación de la fase MB1 (Verde)

1. Adicionar 100ml de agua destilada en 4.6g de la mezcla de la formulación de Salmonella
2. Mezclar y calentar hasta ebullición por 1-2 min
3. Retirar del calor y adicionar HCl (20 μ L. El pH final debe ser 5.5 ± 0.2)
4. Atemperar el medio hasta 50°C aproximadamente. No permitir que el medio solidifique
5. Colocar 7ml del medio en tubos estériles y refrigerar hasta que solidifique

B. Preparación de la fase MB2 (azul)

1. Adicionar 1.9 g del medio MB2 en 100ml de agua estéril en un frasco de vidrio con tapa
2. Mezclar perfectamente
3. Esterilizar en autoclave 121°C por 15min
4. Colocar 10ml del medio encima del medio MB1 previamente sólido, y tapar

La fase MB2 debe ser colocada en los tubos 24hr antes de su uso

2. Modo de uso del kit de detección de *Salmonella*

Para muestras de alimentos intactas (48h)

1. Poner 10g de la muestra en 90ml de peptona y colocarla en el Stomacher
2. Incubar en un frasco a 41.5°C por 24 ± 2 h
3. Transferir 0.1ml en el kit, con la fase MB2 previamente colocada
4. Incubar a 41.5°C por 24 ± 2 h
5. Si en el fondo del kit se observa un color naranja / amarillo *Salmonella* es positivo, si se observa color verde *Salmonella* es negativa

Negativo / Positivo



Bibliografía

Alarcón, R. (2005). Elaboración de un Alimento de Humedad Intermedia. Agosto 23, 2016, de VII CONGRESO NACIONAL DE LOS ALIMENTOS Sitio web: www.respyn.uanl.mx/especiales/2005/ee-13-2005/documentos/CNA48.pdf.

Almeida & Bejarano (2006). El sistema HCCP. Octubre 28,2015 de Organización Panamericana de la Salud sitio web:

http://publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/publicaciones%20virtuales/haccp_cd/haccp/haccp7.html.

Andino. & Castillo. (2010). Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria. Marzo 21, 2016, de Universidad Nacional de Ingeniería Sitio web: <https://avdiaz.files.wordpress.com/2010/02/documento-microbiologia.pdf>.

Andrea O, Janepsy D, Rodrigo F, Alejandra V, Maritza G. 2012 Vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Chile. Rev Chilena Infectol.

Ariña. & Prado. (2004). ALTERACIÓN DE LOS ALIMENTOS. Abril 18, 2016, de elika Sitio web:

http://www.elika.eus/datos/formacion_documentos/Archivo10/7.Alteración%20de%20los%20alimentos.pdf.

Ayvar, S., Mena, A., Cortés, D., Luna, G.(2004). Rendimiento de la calabaza pipiana en respuesta a la poda y la densidad de población. Fitotec. Mex., 27, 4.

Bazet; Burger; Camou ; (2000). "Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)". Marzo 29,2016, de Facultad de Medicina Uruguay Sitio web: <http://www.bvsops.org.uy/pdf/etas.pdf>

Beuchat, L 2011. Survival of Salmonella enterica, Escherichia coli O157:H7, and Listeria monocytogenes on Inoculated Walnut Kernels during Storage Journal of Food Protection, Vol. 75, No. 2, 2012, Pages 245–254.

Blackburn C, McClure P. Introduction. En: Blackburn, C y McClure, P. (2002) Foodborne pathogens. Hazards, risk analysis and control. Boca Raton.

Brown JE. 1995 Nutrition now. In The Multiple dimensions of food safety. Edit. West Publishing Company

Cavallaro E, Date K, Medus C, Meyer S, Miller B, Kim C, Nowicki S, Cosgrove S, Sweat D, Phan Q, Flint J, Daly ER, Adams J, Hyytia-Trees E, Gerner-Smidt P, Hoekstra RM, Schwensohn C, Langer A, Sodha SV, Rogers MC, Angulo FJ, Tauxe RV, Williams IT, Behravesh CB. 2011. Salmonella typhimurium infections associated with peanut products. N Engl J Med 365(7):601–10.

CDC (Centro de control de enfermedades). 2011. Investigation with in-shell hazelnuts. Available at: <http://www.cdc.gov/ecoli/2011/hazelnuts0157/index.html>. update: multistate outbreak of E. coli O157:H7 infections associated

Cordero, E. (1983). Historia comprendida del Estado de Puebla. (Tomo II). Ciudad de México: Grupo Literario “Bohemia Poblana”

Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. Microbiol. Rev. 53, 121–147

Domínguez, A. (2005). Análisis de la industria de los dulces típicos de la ciudad de Puebla. Agosto 23, 2016, de UDLAP Sitio web:

http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lhr/dominguez_p_al/capitulo4.pdf

Elika. (2013). ESCHERICHIA COLI. Enero 13, 2016, de Fundación Vasca para la seguridad agroalimentaria Sitio web:

http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento84/3.Ecoli.pdf

FAO. (2012). Prevención de la E.coli en los alimentos. Diciembre 14, 2016, de FAO Sitio web:

http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf

FDA. (2015). Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods - Chapter 3. Factors that Influence Microbial Growth. Junio 22, 2016, de FDA Sitio web: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm094145.htm>

Fernández E. 1981 Microbiología Sanitaria Agua Agua y Alimentos Vol.1 Editado por la universidad de Guadalajara .México. p. 649-805.

Golden DA, Rhodehamel EJ, Kautter DA. 1993. Growth of *Salmonella* spp. in cantaloupe, watermelon, and honeydew melons. J Food Prot 56:194-6.

González. & Rojas. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. Marzo 10, 2016, de Salud Pública Sitio web: <http://bvs.insp.mx/rsp/articulos/articulo.php?id=000535>

González, S., Jataí, P., Castellanos, P., & Perdomo, M. (2012). Guía para el establecimiento de sistemas de vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por alimentos (veta) y la investigación de brotes de toxi-infecciones alimentarias. Julio 13, 2016, de organización panamericana de la salud Sitio web: <https://www.assal.gov.ar/assa/userfiles/file/guia%20veta.pdf>

Guo, Xuan, CHEN, Jinrum BRACKETT, Robert E., BEUCHAT, Larry R., (2001) Survival of Salmonellae on and in Tomato Plants from the Time of Inoculation at Flowering and Early Stages of Fruits Development through Fruit Ripening, Georgia, Applied and Environmental Microbiology. 67(10):4760

Harris. (Junio 2012). Prevención y control de la Salmonella y la E.coli enterohemorrágica en los frutos secos. EMPRES inocuidad de los Alimentos, 2, 4.

Hiramatsu, R., M. Matsumoto, K. Sakae, and Y. Miyazaki. 2005. Ability of Shiga toxin-producing Escherichia coli and Salmonella spp. to survive in a desiccation model system and in dry foods. Appl. Environ. Microbiol. 71:6657–6663

Janning, B; Notermans S, and J. Kramer. 1994. Resistance of bacterial strains to dry conditions: use of anhydrous silica gel in a desiccation model system. J. Appl. Bacteriol

Jay. 2000. Modern Food Microbiology. 6th edn., AVI Book-New York.

Kim, Tae Jo, and Juan L. Silva. 2015. "Salmonella and Listeria Assay Methods and Kits." U.S. Patent Application No. 14/871,836.

Kimber, M; Kaur, H; Wang, L; Danyluk, M & Harris, L. (2010 Marzo). Survival of Salmonella, Escherichia coli O157:H7, and Listeria monocytogenes on Inoculated Almonds and Pistachios Stored at 219, 4, and 24uC. Journal of Food Protection, 75, 1394-1403. 2016, Abril 15, De Sciencedirect Base de datos.

Kinderlerer, J. and C. Rodger. 2005. Microbiological quality of the dried coconut. *Journal of Food Protection*. 68:191-198.

Kirk, MD, CL Little, M Lem, M Fyfe, D Genobile, A Tan, J Threfall, A Paccagnella, D Lightfoot, H Lyi, L McIntyre, L Ward, DJ Brown, S Surnam and IST Fisher. 2004. An outbreak due to peanuts in their shell caused by *Salmonella enterica* serotypes Stanley and Newport – sharing molecular information to solve international outbreaks. *Epidemiol Infect* 132: 571 – 577.

Kopper, & Calderón (2009). Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Marzo 18, 2016, de FAO Sitio web: <http://www.fao.org/3/a-i0480s.pdf>

Lake R, Hudson A, Cressey P. Risk profile: *Salmonella* (non typhoid) in poultry (Whole and Pieces). ERS 2002.pp 63.

Lavín, M. & Benítez, A. (Marzo 2000). Dulces hábitos, golosinas del convento, cocina virreinal novohispana (Tomo I). Ciudad de México: Clío

Leslie, S; Israeli, E; Lighthart, B & Crow, L.. (1995 Octubre). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying.. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3592-3597. 2016, Agosto 26, De American Society for microbiology Base de datos.

Lesne, J., S. Berthet, S. Binard, A. Rouxel, and F. Humbert. 2000. Changes in culturability and virulence of *Salmonella typhimurium* during long-term starvation under desiccating conditions. *Int. J. Food Microbiol.*60:195–203

Loss CR, Hotchkiss JH. 2002. Inhibition of microbial growth by low-pressure and ambient pressure gasses. In: Juneja VK, Sofos JN, editors. *Control of foodborne microorganisms*. New York: Marcel Dekker. p 245-79. Forthcoming.

Luna, J. & Guerrero, J. (2010). Algunas características de compuestos presentes en los frutos secos y su relación con la salud. Diciembre 14, 2016, de Temas selectos de ingeniería en alimentos Sitio web: [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-1/TSIA-4\(1\)-Luna-Guevara-et-al-2010.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-1/TSIA-4(1)-Luna-Guevara-et-al-2010.pdf)

- McManus, K. Antinoro, L. Sacks, F. (2001) [Int J Obes Relat Metab Disord.](#)
- Miller, D., Goepfert, J., and Amundson, C. (1972). Survival of salmonellae and *Escherichia coli* during the spray drying of various food products. *J. Food Sci.* 37, 828–831.
- Mossel DAA, Corry JEL, Struijk CB, Baird RM. 1995. *Essentials of the microbiology of foods: a textbook for advanced studies*. Chichester (England): John Wiley and Sons. 699 p.
- Olivas. & Alarcón. (2004). *Manual de prácticas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos*. Ciudad Juarez Chihuahua: UACJ.
- Pisabarro, A. (2009). MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. Julio 24, 2016, de Universidad Pública de Navarra Departamento de Producción Agraria Sitio web: <http://www.unavarra.es/genmic/microclinica/tema02.pdf>
- Podolak, R; Enache, & Elliott, P.. (2010, Octubre). Sources and Risk Factors for Contamination, Survival, Persistence, and Heat Resistance of Salmonella in Low-Moisture Foods. *Journal of food protection*, 73, 1919-1936. 2016, Julio 22, De Researchgate.
- Riordan D C R, G M Sapers, B A Annous (2000) The survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the presence of *Penicillium expansum* and *Glomerella cingulata* in wounds on apples surfaces. *J. Food Protect.* 63:1637-1642.
- Sabri, S; Nielsen, L & Vickers, C.. (2010, Enero). Molecular Control of Sucrose Utilization in *Escherichia coli* W, an Efficient Sucrose-Utilizing Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 478-487. 2016, Agosto 26, De American Society for microbiology
- SAGARPA (2002) *Producción del cultivo de cacahuete en el estado de Morelos*
- SAGARPA (1997) *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos*. Centro de Estadística Agropecuaria de la Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural. Tomo I.

Salas, Ros, & Sabaté. (2005). Frutos secos, salud y cultura mediterráneas. Barcelona: Glosa.

S.I.A.P. Sistema de información agroalimentaria y pesquera. www.siap.gob.mx.

Solano, C., B. Garcí`a, J. Valle, C. Berasain, J.-M. Ghigo, C. Gamazo, and I. Lasa. 2002. Genetic analysis of Salmonella Enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol. Microbiol.*43:793–80

Trejo A. (2006). Los productos derivados de la pepita de calabaza, contaminados. Diciembre 27, 2015, de UNAM Sitio web: http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2009_106.html

Uesugi, AR, MD Danyluk, RE Mandrell, and LJ Harris. 2007. Isolation of Salmonella Enteritidis phage type 30 from a single almond orchard over a 5 – year period. *J Food Protect* 70: 1784 – 1789

UF Food Safety 2016 Outbreaks from Tree Nuts, Peanuts, and Sesame Seeds <http://ucfoodsafety.ucdavis.edu/files/169530.pdf>

USDA (1998) U.S Department of Agriculture Research Service Nutrient Database for Standard Reference.

Varela. (2002). Fisiología y metabolismo bacteriano. Abril 18, 2016, de Facultad de Medicina Uruguay Sitio web:

<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/FisiologiayMetabolismoBacteriano.pdf>

Wei, C. (2015). Salmonella in Low Water Activity Foods: Physiological, genetic modification and control methods. Septiembre 04, 2016, de University of Tennessee Sitio web:

http://trace.tennessee.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=4885&context=utk_graddiss

Wells J M, J E Butterfield (1999) Incidence of Salmonella on fresh fruits and vegetables affected by fungal rots of physical injury. *Plant Dis.* 83:722-726.

Winfield, M. D., and E. A. Groisman. 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of Salmonella and Escherichia coli. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3687–3694

Yura; Nagai; & Mori. 1993. Regulation of heat shock response in bacteria. Annual Review of microbiology. 47:3221-50