



**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Departamento de Bioquímica-Alimentos**

**Licenciatura en Químico Farmacobiólogo**

Tesis:

**“APLICACIÓN DE MÉTODOS COMBINADOS PARA LA  
INACTIVACIÓN DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM EN AGUA  
DE COCO (*COCOS NUCIFERA* L.)”**

**Tesis Presentada Para Obtener el Título de:**

**Licenciatura en Químico Farmacobiólogo**

**Presenta:**

pQ.F.B. Alicia Martínez Niño

**Director de Tesis:**

D.C. Carlos Enrique Ochoa Velasco

**Co-Director de Tesis:**

D.C. Silvia Del Carmen Beristain Bauza

**Junio 2018**

# ÍNDICE

## RESUMEN

1	INTRODUCCIÓN .....	9
2	JUSTIFICACIÓN .....	10
3	OBJETIVOS .....	11
3.1	Objetivo general.....	11
3.2	Objetivos específicos. ....	11
4	MARCO TEÓRICO .....	12
4.1	Coco (Cocos nucifera L.).....	12
4.1.1	Generalidades.....	12
4.1.2	Origen y dispersión. ....	12
4.1.3	Ecología.....	13
4.1.4	Características botánicas. ....	13
4.1.5	Comercialización.....	14
4.1.6	Agua de coco y propiedades funcionales. ....	15
4.2	Salmonella.....	16
4.2.1	Generalidades.....	16
4.3	Métodos de conservación.....	18
4.3.1	Métodos convencionales de conservación de alimentos. ....	19
4.3.1.1	Conservación de alimentos por tratamiento térmico.....	19
4.3.1.2	Preservación por baja actividad de agua ( $a_w$ ). ....	19
4.3.1.3	Preservación por pH bajo. ....	20
4.3.1.4	Preservación por atmósferas modificadas y controladas.....	20
4.3.1.5	Preservación por bajas temperaturas. ....	21
4.3.2	Métodos combinados para la conservación de alimentos. ....	23
4.4	Generalidades de los aceites esenciales .....	25
4.4.1	Cinamaldehído. ....	25
4.4.2	Toxicidad y consumo. ....	27
4.5	Luz ultravioleta de onda corta (UV-C). ....	27

4.5.1	Generalidades.....	27
4.5.2	Mecanismo de desinfección de la luz UV-C.....	29
4.5.3	Ventajas y desventajas de la luz UV-C. ....	30
5	DIAGRAMA DE TRABAJO.....	32
6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
6.1	Material.....	33
6.2	Material biológico.....	33
6.3	Agua de coco.....	33
6.4	Metodología: .....	34
6.4.1	Preparación de cinamaldehído. ....	34
6.4.2	Evaluación sensorial.....	34
6.4.3	Inoculación microbiana.....	34
6.4.3.1	Obtención de Salmonella Typhimurium. ....	34
6.4.3.2	Inoculación de Salmonella Typhimurium en agua de coco. ....	35
6.4.3.3	Realización de sistemas con agua de coco inoculada con Salmonella Typhimurium adicionada con antimicrobiano almacenadas a diferentes temperaturas (22°C y 5°C).....	35
6.4.3.4	Realización de sistemas con agua de coco procesada con luz UV-C adicionada con antimicrobiano y almacenada a diferentes temperaturas (22°C y 5°C). 36	
6.5	Análisis Estadístico.....	37
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	38
7.1	Evaluación sensorial. ....	38
7.2	Efecto de cinamaldehído a diferentes concentraciones sobre Salmonella Typhimurium.....	39
7.3	Efecto de diferentes tiempos de exposición a la luz UV-C sobre Salmonella Typhimurium.....	40
7.4	Efecto de cinamaldehído y temperatura sobre Salmonella Typhimurium. ....	41
7.5	Efecto de métodos combinados [luz UVC (3.5 minutos), cinamaldehído y temperatura] sobre Salmonella Typhimurium durante el almacenamiento.....	42

7.6 Efecto de métodos combinados [luz UVC (7 minutos), cinamaldehído y temperatura] sobre Salmonella Typhimurium durante el almacenamiento.....	43
8 CONCLUSIONES.....	45
9 SUGERENCIAS.....	46
10 BIBLIOGRAFÍA .....	47
11 ANEXOS .....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del coco. Adaptada de Granados, D y López, G., (2002). .....	14
Figura 2. Estructura química del cinamaldehído. Adaptada de Carrizosa, C., (2014). .....	26
Figura 3. Equipo de luz UV-C. Adaptada de Ochoa-Velasco, C.E y Guerrero-Beltrán, J.Á., (2013).....	37
Figura 4. Evaluación sensorial de agua de coco fresca adicionada con cinamaldehído a diferentes concentraciones (0, 25, 50 y 100 ppm).....	38
Figura 5. Efecto de diferentes concentraciones de cinamaldehído (25, 50 y 100 ppm) sobre <i>Salmonella</i> Typhimurium inoculada en agua de coco.....	40
Figura 6. Efecto de luz ultravioleta de onda corta (UV-C) sobre la inactivación de <i>Salmonella</i> Typhimurium inoculada en agua de coco.....	41
Figura 7. Efecto de métodos combinados (temperatura y cinamaldehído) sobre <i>Salmonella</i> Typhimurium inoculada en agua de coco.....	42
Figura 8. Efecto de métodos combinados [luz UV-C (3.5 minutos) temperatura y cinamaldehído] sobre <i>Salmonella</i> Typhimurium inoculada en agua de coco. ....	43
Figura 9. Efecto de métodos combinados [luz UV-C (7 minutos) temperatura y cinamaldehído] sobre <i>Salmonella</i> Typhimurium inoculada en agua de coco. ....	44

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valor de la producción por entidad federativa (millones de pesos). Adaptada de CONACOCO, (2012). .....	15
Tabla 2. Equipos que se utilizaron en la investigación.....	33
Tabla 3. Métodos utilizados.....	34
Tabla 4. Diseño experimental que se siguió. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

## AGRADECIMIENTOS

Mamá: gracias por apoyarme día a día, por tus consejos, por estar a mi lado en los momentos que creía que no podía más. Durante todo este tiempo has sido mi motor para lograr lo que he querido y mi inspiración. Hoy al fin puedo decirte que lo logre, y que cada esfuerzo valió la pena.

Papá: gracias por apoyarme en cada uno de mis proyectos, por alentarme a seguir adelante y por tus palabras de aliento en los momentos difíciles. Eres el mejor papá del mundo.

Dani: eres mejor hermano que Dios pudo darme. Gracias por ayudarme en esta difícil etapa.

A mis abuelitos: gracias por sus cuidados, por su amor incondicional, por formar parte de mi vida y ayudarme a ser la persona que soy hoy en día.

Doctor Carlos Ochoa: gracias por abrirme las puertas a éste proyecto, que fue muy difícil, pues pasamos por muchos obstáculos, pero al final culminó el proyecto.

Infinitas gracias por apoyarme durante el trayecto y por el conocimiento de sus clases. Siempre será una persona que admire mucho.

Doctora Silvia: gracias por su apoyo y consejos.

Doctora Paola: gracias por el apoyo, por ser paciente y por sus consejos. Jamás olvidare sus palabras de aliento.

A Dios: gracias por permitirme culminar una etapa de mi vida, por la familia que me diste, por los amigos y maestros que formaron parte de este trayecto.

Y finalmente, doy gracias a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por ser parte de mi formación académica.

## RESUMEN

El agua de coco es una bebida natural de aspecto claro, incolora, dulce, con sabor ligeramente ácido. Dado que el agua de coco es una bebida popular y es muy comercial, existe un riesgo de contaminación de origen fecal por microorganismos tales como *Escherichia coli* y *Salmonella*. El objetivo de este proyecto fue aplicar métodos combinados (luz UV-C, antimicrobiano, temperatura) para la inactivación de *Salmonella* Typhimurium en agua de coco y evaluar su estabilidad durante el almacenamiento. Para evaluar el proceso de este trabajo se inoculó *Salmonella* Typhimurium en agua de coco para que se procesara en el equipo de luz UV-C con una y dos lámparas (3.5 y 7 minutos respectivamente), agregando un antimicrobiano de origen natural como lo es cinamaldehído, utilizándolo a una concentración de 100 ppm y manteniéndola almacenada a dos diferentes temperaturas (22°C y 5°C) evaluando el crecimiento microbiano durante 16 días, dando como resultado la disminución de carga microbiana de  $3.8 \pm 0.1$  ciclos logarítmicos con una lámpara y  $5.2 \pm 0.1$  ciclos logarítmicos con dos lámparas de luz UV-C. Además el antimicrobiano ayudó a mantener la estabilidad durante el almacenamiento, teniendo mejores resultados con bajas temperaturas. Por lo tanto, los métodos combinados (luz UV-C, antimicrobiano y temperatura) son una buena opción para poder mantener almacenada el agua de coco sin riesgo de crecimiento de microorganismos, siendo la mejor manera mantener el agua de coco a baja temperatura junto con el cinamaldehído.

# 1 INTRODUCCIÓN

El coco (*Cocos nucifera L.*) es una de los frutales más importantes y extensamente cultivadas en todo el mundo. De su parte interna se extrae el agua de coco, la cual es una bebida dulce y refrescante. Pero debido a las malas prácticas de manipulación, existe un riesgo de contaminación por microorganismos de origen fecal como pueden ser *Escherichia coli* y *Salmonella*, que son responsables de enfermedades que pueden causar náuseas, vómito y diarrea (Ochoa-Velasco *et al.*, 2014).

Para evitar que los microorganismos patógenos causen enfermedades a la población se buscan alternativas al tratamiento térmico tradicional; en este sentido, la luz ultravioleta de onda corta (UV-C) es una tecnología no térmica que se utiliza para procesar agua y superficies. Aunque recientemente se ha utilizado como método de pasteurización de bebidas obtenidas a partir de frutas, manteniendo las características sensoriales y nutrimentales deseadas por el consumidor (Guerrero-Beltrán y Barbosa-Cánovas, 2004).

Por otra parte, el uso de antimicrobianos naturales es preferido por la población en lugar de los antimicrobianos sintéticos utilizados actualmente. En este aspecto, el cinamaldehído es un potente antimicrobiano natural extraído a partir de la canela, que debido a sus características sensoriales puede ser utilizados en bajas concentraciones para alargar la vida en anaquel del agua de coco. Por lo anterior, se busca aplicar métodos combinados (luz UV-C, antimicrobianos y temperatura) para la inactivación de *Salmonella Typhimurium* en agua de coco y mejorar su estabilidad durante el almacenamiento.

## 2 JUSTIFICACIÓN

El agua de coco es una de las bebidas que en los últimos años ha tenido un gran auge debido a su alto contenido en vitaminas y bajo aporte calórico, así como el gran contenido de minerales tales como potasio, magnesio, fósforo y calcio. El gran contenido de minerales la hacen una bebida apta para deportistas de alto rendimiento. Sin embargo, es una bebida altamente contaminable por organismos patógenos tales como los de grupo de *Salmonella* y *Escherichia coli*. La industria de alimentos utiliza usualmente los tratamientos térmicos para asegurar la inocuidad de los alimentos; sin embargo, esta genera cambios indeseables, por lo que se busca la utilización de métodos no térmicos o combinados para no generar tantos cambios en los alimentos. En este sentido, la luz UV-C podría funcionar como agente bactericida, el cinamaldehído y las bajas temperaturas como bacteriostáticos para poder así alargar la vida en anaquel de agua de coco.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general.

- Aplicar métodos combinados (luz UV-C, antimicrobianos, temperatura) para la inactivación de *Salmonella* Typhimurium en agua de coco y evaluar su estabilidad durante el almacenamiento.

#### 3.2 Objetivos específicos.

- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de cinamaldehído en la aceptación sensorial del agua de coco.
- Determinar la actividad antimicrobiana de cinamaldehído a diferentes concentraciones sobre *Salmonella* Typhimurium inoculado en agua de coco.
- Aplicar tratamiento con luz UV-C y cinamaldehído sobre agua de coco inoculada con *Salmonella* Typhimurium durante el almacenamiento a dos diferentes temperaturas.

## 4 MARCO TEÓRICO

### 4.1 Coco (*Cocos nucifera* L.).

#### 4.1.1 Generalidades.

Con frecuencia se hace referencia a la palma de coco (*Cocos nucifera* L.) como el “árbol de la vida”, debido a que tiene un gran valor como planta de uso múltiple, encontrándose en el 12avo lugar de la lista de especies de plantas alimenticias más importantes para el hombre. Desde hace miles de años se ha cultivado y su dispersión es tan amplia que en la actualidad existe un fuerte debate sobre su centro de origen geográfico. El cocotero es considerado la joya de los trópicos y es sin duda el cultivo arbóreo más importante del mundo, con alrededor de 3,000 millones de hectáreas cultivadas, que involucra a más de 13 millones de personas relacionadas directa o indirectamente con los productos de esta planta (Granados y López, 2002).

#### 4.1.2 Origen y dispersión.

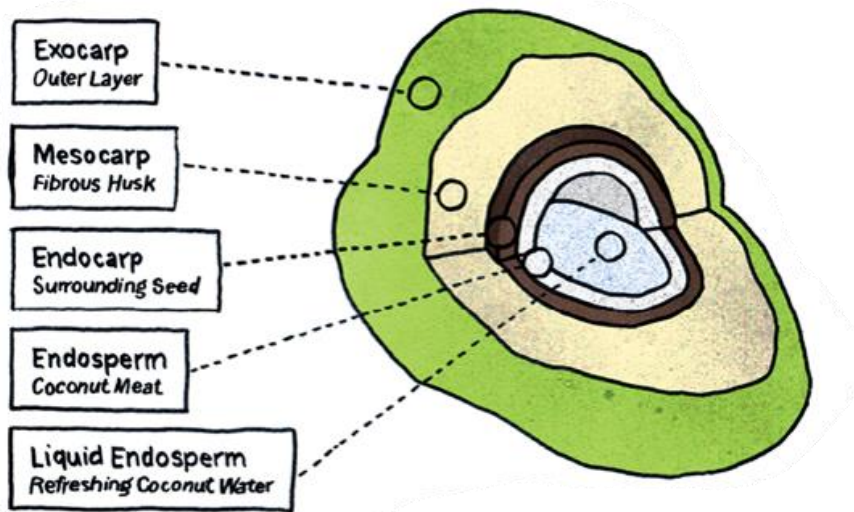
La palabra coco proviene del portugués “cocu” con referencia al fruto, que sugiere una cara de mono. *Cocos nucifera* L. se distribuye en regiones tropicales y subtropicales de África, el Caribe y América del Sur. De esta especie no se conocen individuos silvestres. Su mayor variabilidad se presenta en el sureste asiático y en segundo lugar en el Caribe. En México existen dos tipos contrastantes de cocotero, en cuanto a características genotípicas. Estas corresponden, en términos generales, como tipo silvestre “*niu kafa*” y tipo domesticado “*niu vai*”, distribuidos en América en las costas del Atlántico y del pacífico respectivamente, los cuales fueron introducidos independientemente por los españoles en el siglo XVI. Cabe hacer notar, las variedades de coco enano malayo, probadas como resistentes en Jamaica, arribaron a México durante la última mitad del siglo XX, observándose en diferentes huertas de las costas del Pacífico (Guerrero y Colima), así como del Golfo y el Caribe (Tabasco, Yucatán y Quintana Roo) (Granados y López, 2002). México es uno de los países que tiene zonas fértiles para la producción de coco, como son las regiones costeras entre las que se destacan Colima, Veracruz, Michoacán, etc., sin embargo, no se le ha dado la importancia al aprovechamiento del coco, dando como resultado un desperdicio incontrolado de este fruto (Anurag y Rajamohan, 2003).

#### 4.1.3 Ecología.

*Cocos nucifera* L. se encuentra ampliamente distribuida en islas y zonas costeras tropicales de todo el mundo, entre los 26°C de latitud norte y sur; también puede encontrarse a alturas de hasta 1,200 msnm. Es una planta tropical que prospera mejor en climas sin marcadas fluctuaciones estacionales, con una temperatura promedio superior a 20°C, precipitación media anual de 1,000 a 1,800 mm, pudiendo soportar mayores precipitaciones en suelos con buen drenaje. Tiene un buen desarrollo en suelos de aluvión tipo migajón arenoso, con presencia de materia orgánica, aireación, buen drenaje y con un pH entre 5 y 8. La profundidad mínima del suelo para su óptimo desarrollo radicular debe ser de 80 a 100 cm (Del-Cañizo, 1991). Por su capacidad para crecer en suelos arenosos sujetos a inundación ha desarrollado importantes mecanismos de adaptación. Es el caso de su extenso sistema de raíces que le proporciona un anclaje eficiente para soportar fuertes vientos y su resistencia fisiológica que le permite tolerar la salinidad del suelo, condiciones alcalinas e incluso heladas ocasionales (Granados y López, 2002).

#### 4.1.4 Características botánicas.

*Cocos nucifera* L. pertenece a la familia Palmae, que comprende un solo género. Su número cromosómico es  $2n = 32$ . Es una planta monopódica que mide 12 a 25 m de alto. Su tallo esbelto y estipitoso crece más o menos torcido; a menudo es más ancho en la base, donde puede tener alrededor de 80 cm de diámetro; la porción superior del tronco raramente alcanza los 30 cm. Sus hojas se agrupan en el ápice formando un penacho. Los pecíolos de 90 a 150 cm de largo se disponen en forma envolvente dando la estructura fibrosa al tallo. Las frondas de las hojas tienen una longitud de 1.8 a 6 m; son pinnadas con foliolos de 60 a 90 cm de largo (Granados y López, 2002). La fruta está compuesta por el endospermo (carne blanca), agua (contenido acuoso dentro de la fruta) y una cáscara muy dura (Figura 1). Aproximadamente 100g de endospermo están constituidos de 51.9% de agua, 26.1% de grasas (principalmente ácido láurico y mirístico), 15.1% de carbohidratos, rastros de vitaminas (vitamina C, tiamina, riboflavina y niacina) y minerales (hierro, calcio y fósforo), que proporcionan 293 kcal de energía (Ochoa-Velasco *et al.*, 2014).



**Figura 1.** Estructura del coco. Adaptada de Granados, D y López, G., (2002).

#### 4.1.5 Comercialización.

El valor de la producción de coco va en aumento al tener en 2001 un ingreso de \$588.64 millones de pesos comparado con el del 2010 de \$1,294.7 millones de pesos (Tabla 1) cantidad superior en un 220%. Es importante señalar que la producción del cocotero en el Estado de Guerrero se destina mayoritariamente a la comercialización de copra, ya que el 99.5% de las ventas totales provienen de copra, vendidas a la industria; la diferencia está representada por la venta de coco fruta. Por tanto, la producción de Guerrero se orienta en un 99% a la producción de copra para satisfacer a las empresas aceiteras estatales y a los acopiadores de copra nacionales, siendo característico el establecimiento de eras de secado con bajo nivel tecnológico. El restante 0.5% se destina a la venta de coco fruta en diversas presentaciones, coco verde con cáscara para los lugares turísticos y coco jimado o destopado para su venta en las Centrales de Abasto, sobre todo de su mercado natural en la Cd. de México la cual tiene un valor de \$4,121,620 pesos (CONACOCO, 2012).

ESTADO	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2008	2009*	2010*
Guerrero	339.27	360.52	462.6	592.1	655.13	664.48	680.45	904.69	824.6	845.0
Colima	185.45	99.17	117.05	162.6	178.58	175.41	155.5	217.7	118.1	106.9
Tabasco	57	53.58	87.45	82.09	96.82	43.8	42.65	65.06	45.3	52.4
Oaxaca	49.22	47.98	52.1	32.67	29.57	31.99	29.14	35.82	60.5	71.6
Michoacán	32.75	17.49	20.37	23.58	12.58	15.29	14.54	16.42	54.2	75.8
Jalisco	10.06	6.33	7.87	9.47	10.06	8.22	8.42	11.97	59.8	51.5
Veracruz	2.25	2.26	1.61	3.15	3	5.54	3.65	3.98	6.9	25.3
Chiapas	1.27	1.33	1.57	1.49	2.15	2.56	2.58	4.25	0.5	3.3
Campeche	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
Q Roo	0	0	0	0	0.1	0	0	0	4.1	15.7
Yucatan	0	0	0	0	0	0	0	0	27.8	26.9
Nayarit	0	0	0	0	0	0	0	0	24.6	20.4
Total	677.26	588.64	750.61	907.1	987.98	947.29	936.93	1259.89	1226.3	1294.7

**Tabla 1.** Valor de la producción por entidad federativa (millones de pesos). Adaptada de CONACOCO, (2012).

#### 4.1.6 Agua de coco y propiedades funcionales.

El agua de coco, también llamada jugo de coco, es una bebida refrescante y dulce tomada directamente de la parte interna del coco. Debido a sus características únicas, se considera como una bebida “funcional” natural. El agua es estéril, siempre y cuando permanezca en la parte interna, una vez que el coco se abre, su composición bioquímica y su apariencia física cambian (Prades *et al.*, 2012). Como el agua de coco es estéril dentro del coco, se ha utilizado para la hidratación intravenosa a corto plazo de los pacientes. También se ha usado en el tratamiento de diarrea infantil y adulta, gastroenteritis y en la protección contra infecciones del tracto gastrointestinal (Awua *et al.*, 2012).

La composición nutricional del agua de coco ha sido bien documentada. Las amplias aplicaciones del agua de coco pueden atribuirse a su composición química única de sodio, potasio, fósforo, cloruro y magnesio, vitaminas, azúcares, proteínas, aminoácidos libres y factores de crecimiento (Matsui *et al.*, 2008).

El consumo frecuente de agua de coco podría proporcionar algunos efectos a los consumidores. El agua de coco había sido analizado por Chang y Wu (2011) y, por primera vez, informaron la presencia de catequina y epicatequina. Las catequinas poseen actividades antioxidantes, antimicrobianas y anticancerígenas (Nurulain, 2006). El agua de coco fresca es una fuente rica de kinetina (una hormona de crecimiento de plantas de

citoquinina) que puede retrasar el inicio de las características de envejecimiento en las células cutáneas humanas (Ge *et al.*, 2005).

Beber agua de coco ayuda a disolver los cálculos renales y ayuda a equilibrar el azúcar en la sangre. También ayuda a aliviar el estreñimiento y mejora la digestión. Debido a que es naturalmente bajo en calorías y grasas, reduce el riesgo de enfermedad cardíaca. Mejora la circulación sanguínea, disminuye la presión arterial alta y mejora el nivel de colesterol en la sangre. En los riñones, el agua de coco también tiene importantes aplicaciones clínicas, como en el tratamiento de trastornos renales. Los médicos aconsejan beber agua de coco para eliminar las bacterias que causan infecciones urinarias (Emojevwe, 2013).

Sin embargo, dado que el agua de coco es una bebida popular y que los vendedores ambulantes preparan y venden, existe un riesgo de contaminación por microorganismos de origen fecal como *Escherichia coli* y *Salmonella*, debido a la falta de buenas prácticas de fabricación. Éstos microorganismos son responsables de enfermedades que pueden causar náuseas, diarrea y vómitos (Ochoa-Velasco *et al.*, 2014). Un informe de Walter *et al.*, (2009), en el modelo del crecimiento de *Listeria monocytogenes* en agua de coco fresca, presentó datos que era favorable para la supervivencia y crecimiento de ésta bacteria. Además, en agua de coco se ha reportado una alta carga microbiana de hasta 6.0 log UFC/ml, tales como *Salmonella enteritica*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Ochoa-Velasco *et al.*, 2017)

## 4.2 *Salmonella*.

### 4.2.1 Generalidades.

Varios brotes alimentarios se han asociado con la presencia de *Salmonella* spp. en productos alimenticios, incluyendo carne de res, pollo, puerco y sus derivados, mariscos, huevos, productos lácteos, productos frescos, chocolate, cereales para el desayuno, refrigerios y almendras, mantequilla de maní, fórmula infantil y golosinas para mascotas (Bermúdez-Aguirre y Corradini, 2011). La gran variedad de productos muestra que *Salmonella* es capaz de crecer y sobrevivir en una amplia gama de condiciones, incluso con

baja humedad y procesamiento térmico. Algunas especies de *Salmonella* son más resistentes que otras (Álvarez *et al.*, 2006). Además, también se debe tener en cuenta el desarrollo de una resistencia más fuerte de algunas especies de *Salmonella* a las condiciones ambientales adversas (Álvarez-Ordoñez *et al.*, 2008). La razón para la supervivencia en productos secos es que las células de *Salmonella* pueden subsistir en estado latente y volver al crecimiento celular activo cuando las condiciones ambientales son favorables para el crecimiento nuevamente (Podolak *et al.*, 2010). El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos gram negativos, no formadores de esporas, anaerobios facultativos, provistos de flagelos y móviles. Crecen bien en los medios de cultivo habituales (Jurado *et al.*, 2010).

Estos microorganismos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, se encuentran en el tracto gastrointestinal de los mamíferos domésticos y salvajes, los reptiles, las aves y los insectos. Además, se encuentra asociado a nivel mundial con enfermedades diarreicas, las cuales continúan siendo una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Parra *et al.*, 2002). En este sentido, las bacterias del género *Salmonella* pueden producir gastroenteritis, fiebre tifoidea, bacteremia e infecciones localizadas como meningitis y osteomielitis. La gastroenteritis por *Salmonella* puede presentarse como una diarrea acuosa o disentérica (Riveros y Ochoa, 2015).

Diferentes serotipos de *Salmonella* han mostrado capacidad de persistir, es decir, de mantenerse por tiempo prolongado fuera de su hábitat natural y adaptarse a condiciones adversas del ambiente. Por ejemplo, los serotipos Typhimurium y Montevideo de *Salmonella entérica* persistieron en tomate por 9 y 49 días, respectivamente; y por 231 días en perejil. En aguas de río y potable, el serotipo Typhimurium persistió por 45 y 152 días (Landa *et al.*, 2013). Mientras que otros serotipos de *Salmonella*, tales como *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* y *Salmonella sendai*, están muy adaptados a su huésped y no tienen otros huéspedes naturales conocidos (Parra *et al.*, 2002).

La infección por *Salmonella* está asociada con la ingestión de alimentos preparados o manipulados inapropiadamente o previamente contaminados. La bacteria se propaga por ingestión de alimentos, aguas contaminadas o por personas infectadas que manipulan el

alimento. Se requiere un inóculo de  $10^6$  a  $10^8$  colonias de bacterias de *Salmonella* para el desarrollo de la enfermedad (Máttar, 2004).

#### 4.3 Métodos de conservación.

La conservación, el procesamiento y el almacenamiento de los alimentos son vitales para el suministro continuo de alimentos durante y fuera de temporada. Una consideración muy importante que diferencia al agrícola de todos los otros procesos industriales es su naturaleza estacional. Las principales razones para el procesamiento y la preservación de los alimentos son: superar la producción estacional en la agricultura, para producir productos de valor agregado y para proporcionar variedad en las dietas (Khan *et al.*, 2017).

A las personas les gusta comer gran variedad de alimentos, con diferentes gustos, sabores, nutrimentos, dietéticos y otras características. Desafortunadamente, se ha estimado que hasta 2 millones de personas no tienen suficiente para comer y que tal vez unas 40, 000 mueren cada día por enfermedades relacionadas con dietas inadecuadas, incluida la falta de suficientes alimentos, proteínas o nutrientes específicos. Una nutrición inadecuada en casos extremos puede producir en los niños un estado avanzado de deficiencia proteica conocido como kwashiorkor. Los principales procesos de deterioro son causados por factores ambientales tales como la temperatura, la humedad, el oxígeno y la luz, que pueden ser la causa de varios mecanismos de reacción que pueden conducir al deterioro de los alimentos en tal medida que son rechazados o perjudiciales para el consumidor. Los efectos microbianos son la principal causa de deterioro de los alimentos (Desai, 2000).

Los alimentos son perecederos o deteriorados por naturaleza. Con base en el modo de acción, las principales técnicas de conservación de alimentos se pueden categorizar como: ralentizar o inhibir el deterioro químico y el crecimiento microbiano; inactivando directamente bacterias, levaduras, mohos y enzimas y evitando la recontaminación antes y después del procesamiento (Prokopov y Tanchev, 2007).

#### 4.3.1 Métodos convencionales de conservación de alimentos.

##### 4.3.1.1 Conservación de alimentos por tratamiento térmico.

El calor es, con mucho, el método de conservación de alimentos más utilizado. Existen diversos grados de conservación por calentamiento que finalmente dictan el tipo de producto final fabricado, los términos utilizados son pasteurización y esterilización. Sin embargo, para ser efectivos, estos procesos deben llevarse a cabo bajo una combinación de control estricto de temperatura y tiempo para asegurar la eliminación de microorganismos patógenos y no patógenos. Estos mismos factores también causan la inactivación térmica de las enzimas alimentarias y cierta destrucción de los constituyentes de los alimentos (Heldman y Lund, 1992).

El tiempo de muerte térmica es el tiempo de calentamiento requerido para matar todas las células vegetativas de los microorganismos. Teóricamente, esto no es posible, pero esta expresión se usa en termobacteriología para fines prácticos. Los microorganismos son eliminados por el calor a una velocidad que es casi proporcional al número de células de un organismo específico (expresado sobre una base logarítmica) presente en el sistema (alimento, medio nutritivo de laboratorio, agua, etcétera.) que se calienta. Esto se conoce como una orden logarítmica de la muerte (Prokopov y Tanchev, 2007).

##### 4.3.1.2 Preservación por baja actividad de agua ( $a_w$ ).

La actividad del agua se puede reducir mediante la eliminación parcial del agua (secado, ósmosis inversa, concentración) o mediante la adición de sustancias que aumentan la presión osmótica de los alimentos o medios tales como azúcares, etanol, glicerol y sales. (Booth, 1998). La mayoría de los microorganismos son sensibles al estado del agua en su entorno inmediato y pueden permanecer activos metabólicamente solo en un rango estrecho de actividades en alta mar. Hay mucha información acerca de los límites bajos de actividad de agua para el crecimiento de microorganismos. Sin embargo, es típico que aquellos organismos que son tolerantes a la baja  $a_w$  sean también tolerantes de presiones osmóticas muy altas. Los solutos iónicos como NaCl y KCl son más inhibidores que los solutos no iónicos como los azúcares. Los solutos, como el glicerol, a diferencia de las sales y los azúcares, permean rápidamente la mayoría de las bacterias pero no las levaduras. Sin embargo, para las especies más bajas tolerantes, esta simple relación ya no es válida.

*Staphylococcus aureus*, por ejemplo, es extremadamente tolerante a la sal y más sensible a una mayor  $a_w$  en glicerol que en cloruro de sodio. La reducción de la  $a_w$  por diversos medios también puede influir en la tasa de cambios enzimáticos y químicos en los alimentos. Mientras que todo el crecimiento microbiológico se detiene completamente por debajo de  $a_w = 0.6$ , algunas reacciones enzimáticas que causan el deterioro de los alimentos continúan y algunas reacciones, como la oxidación de lípidos, incluso pueden acelerarse a valores  $a_w$  muy bajos (Shapton y Shapton, 1991).

#### 4.3.1.3 Preservación por pH bajo.

Los alimentos se clasifican de acuerdo con su acidez de la siguiente manera: no ácida 7.0-5.3; ácido bajo o medio 5.3-4.6; ácido I 4.6-3.7 y ácido II 3.7 y menor. Los microorganismos tienen un rango característico de valores de pH dentro del cual pueden crecer. La mayoría de las bacterias tienen un pH óptimo cerca de 6.8 y pueden crecer a valores de pH que van de 4.0 a 8.0. Un pequeño número de especies bacterianas se puede multiplicar cuando  $pH < 4.0$  o  $pH > 8.0$ . Las levaduras y los mohos a veces pueden crecer a un pH inferior a 2.0. Por lo general, la tasa de crecimiento disminuye a medida que el pH cae por debajo del valor óptimo. Acercándose al pH limitante más bajo para el crecimiento, las células primero se inhiben y eventualmente se matan. El grado de inhibición aumenta a medida que el pH disminuye y esta relación es lineal. La teoría del enlatado de alimentos acepta un pH de 4.5 o 4.6 (para EE. UU.) (Prokopov y Tanchev, 2007).

#### 4.3.1.4 Preservación por atmósferas modificadas y controladas.

El efecto del ambiente gaseoso de los alimentos en los microorganismos es menos conocido por microbiólogos y tecnólogos de alimentos que otros factores que influyen en el crecimiento microbiano como el pH,  $a_w$ , etc. El mantenimiento de una fase de gas constante es difícil de lograr, pero la modificación de la atmósfera se utiliza principalmente para almacenar en mayor cantidad alimentos frescos y parcialmente procesados, como carne, pescado, frutas, verduras, etcétera, aunque los envases individuales a menudo se llenan de gas (Rooney, 1995). Los intentos deliberados de modificar la atmósfera para ayudar a la conservación de los alimentos se producen en tres niveles de sofisticación:

- 1) **Atmósferas controladas.** Se utilizan principalmente para almacenamiento o transporte a granel. La composición del gas, la humedad y la temperatura se pueden controlar para proporcionar las condiciones óptimas para el almacenamiento a largo plazo de frutas, carne y otros alimentos.
- 2) **Empaque de gas.** Este método se usa para almacenamiento masivo y paquetes minoristas. Se usan mezclas de gases. Durante el almacenamiento, el contenido de gas de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> puede cambiar posteriormente como consecuencia de la permeabilidad del paquete, las actividades biológicas del producto envasado, la reacción química, por ejemplo, del oxígeno con algunos componentes de los alimentos como la vitamina C.
- 3) **Envasado al vacío.** Este método se usa predominantemente para paquetes minoristas. La atmósfera de aire original se evacua y la atmósfera, que se desarrolla durante el almacenamiento, es principalmente el resultado de actividades biológicas de los productos en sí (Rooney, 1995).

#### 4.3.1.5 Preservación por bajas temperaturas.

La conservación de alimentos mediante refrigeración y congelación son los métodos más antiguos que usan bajas temperaturas naturales. En 1875 se inventó el sistema de refrigeración de amoníaco, que era capaz de soportar la refrigeración y congelación comercial para alimentos. A partir de 1920, la industria moderna de alimentos congelados creció rápidamente. Hoy en día, la refrigeración influye notablemente en las prácticas de comercialización e industria alimentaria y establece el clima económico en la industria agroalimentaria (Gould, 1995). El enfriamiento se utiliza para reducir la tasa de cambios bioquímicos y microbiológicos y, por lo tanto, para extender la vida útil de los alimentos frescos y procesados. Los alimentos refrigerados se agrupan en tres categorías de acuerdo con su rango de temperatura de almacenamiento de la siguiente manera:

- 1) De -1°C a +1°C, pescado fresco, carne, embutidos, carne molida, etc.

- 2) De 0°C a +5°C, leche pasteurizada, crema, yogur, ensaladas preparadas, sándwiches, productos horneados, pasta fresca, sopa fresca y salchichas, pizzas, etc.
- 3) De 0°C a +8°C, carnes, pescados, pasteles, cocidos y crudos totalmente cocidos carnes, mantequilla, margarina, quesos, frutas y verduras, etc.

La tasa de cambios bioquímicos de los alimentos, causada por microorganismos o enzimas de origen natural aumentan logarítmicamente con el aumento de la temperatura. Por lo tanto, el enfriamiento reduce la tasa de cambios enzimáticos y microbiológicos y retarda la respiración de los alimentos frescos. Los factores que controlan la vida propia de los cultivos frescos durante el almacenamiento en frío incluyen:

- 1) Tipo de comida y variedad.
- 2) Condiciones de los alimentos en la cosecha, por ejemplo, grado de contaminación microbiana, grado de madurez, etcétera.
- 3) Temperatura de cosecha, distribución de almacenamiento, exhibición de venta minorista, etcétera.
- 4) La humedad relativa de la atmósfera de almacenamiento que influye en la deshidratación pérdidas.

Las principales preocupaciones microbiológicas con los alimentos refrigerados son una serie de patógenos que pueden crecer durante el almacenamiento refrigerado prolongado por debajo de 5°C o como resultado de un aumento de la temperatura (abuso de temperatura) y esto puede causar intoxicación alimentaria. Pero ahora se sabe que algunas especies patógenas pueden crecer a grandes cantidades a estas temperaturas o son lo suficientemente virulentas como para causar envenenamiento después de la ingestión de solo unas pocas células. Por ejemplo, *Aeromonas hydrophilica*, *Listeria spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli enteropatógena*, pueden causar colitis hemorrágica después de la ingestión de tan solo 10 células (Prokopov y Tanchev, 2007).

La congelación es un método de conservación de alimentos en el que la temperatura de los alimentos se reduce por debajo del punto de congelación y una proporción del agua experimenta un cambio de estado para formar cristales de hielo, resultando la concentración

de solutos disueltos en agua descongelada reduciendo respectivamente la actividad del agua ( $a_w$ ) y valores de pH. La conservación se logra mediante una combinación de bajas temperaturas, actividad de agua reducida en algunos alimentos, pretratamiento por escaldado y también retraso del crecimiento de microorganismos (Ray, 2000). La proporción de agua que permanece sin congelar a la temperatura utilizada en la congelación comercial depende del tipo y la composición de los alimentos y la temperatura de almacenamiento. Por ejemplo, a una temperatura de almacenamiento de  $-20^{\circ}\text{C}$ , el porcentaje de agua congelada es del 88% en cordero, 91% en pescado y 93% en albúmina de huevo (Prokopov y Tanchev, 2007).

#### 4.3.2 Métodos combinados para la conservación de alimentos.

En los países industrializados existe una demanda del consumidor cada vez mayor de productos alimentarios mínimamente procesados similares a los frescos y, en los países en desarrollo, los alimentos almacenables sin refrigeración son de especial interés, porque la refrigeración es costosa y no está continuamente disponible. Además, en los países menos desarrollados, los procedimientos de preservación de los alimentos deberían ser baratos y simples, pero confiables (Neeha y Subhash, 2014).

La estabilidad y seguridad microbiana de la mayoría de los alimentos tradicionales y novedosos se basa en la combinación de varios factores conservadores (llamados métodos combinados) que los microorganismos presentes en los alimentos no pueden superar. Esto se ilustra mediante el llamado método combinado, introducido por Leistner y Gorris (1994). El método combinado es de fundamental importancia para la conservación de los alimentos, ya que los obstáculos en un producto estable controlan el deterioro microbiano, la intoxicación alimentaria, así como los procesos de fermentación deseados. De hecho, el concepto de método combinado ilustra solo el hecho bien conocido de que la interacción compleja de la temperatura, la actividad del agua, el pH, el potencial redox, etcétera, son importantes para la estabilidad microbiana de los alimentos. La relación entre la tecnología y la homeostasis de los microorganismos está bien establecida (Leistner y Gorris, 1994). Los alimentos conservados por este método son seguros, estables, nutritivos, sabrosos y económicos. A partir de la comprensión del efecto método combinado, se derivó la tecnología de obstáculo, que permite mejoras en la seguridad y calidad de los alimentos

mediante la combinación deliberada e inteligente. En los países industrializados, la tecnología de obstáculos es actualmente de interés práctico para los alimentos mínimamente procesados, mientras que en los países en desarrollo, los alimentos almacenables sin refrigeración, debido a la estabilización mediante tecnología de obstáculo, son actualmente de suma importancia. La aplicación de la tecnología de obstáculo deliberada e inteligente está aumentando rápidamente en todo el mundo. Este concepto también se conoce como conservación de alimentos por métodos combinados, procesos combinados, combinación de conservaciones o combinación de técnicas. En la actualidad, el término tecnología de obstáculo se usa con mayor frecuencia.

Muchos métodos de conservación se utilizan para hacer que los alimentos sean estables y seguros, por ejemplo calentamiento, enfriamiento, congelación, secado, curado, salazón, adición de azúcar, acidificación, fermentación, ahumado, eliminación de oxígeno, etcétera. Sin embargo, estos procesos se basan en relativamente pocos parámetros u obstáculos, por ejemplo alta temperatura (valor F), baja temperatura (valor t°C), actividad del agua ( $a_w$ ), acidificación (pH), potencial redox (Eh), conservantes, flora competitiva, etcétera. En algunos de los métodos de conservación mencionados, estos parámetros son de gran importancia; en otros, son obstáculos secundarios (Tapia de Daza *et al.*, 1996).

Los valores críticos de estos parámetros para la muerte, supervivencia o crecimiento de microorganismos en los alimentos se han determinado en las últimas décadas y ahora son la base de la conservación de los alimentos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el valor crítico de un parámetro particular cambia si se presentan otros factores conservadores en los alimentos. Por ejemplo, la resistencia al calor de las bacterias aumenta a baja  $a_w$  y disminuye en presencia de algunos conservantes, mientras que un Eh bajo aumenta la inhibición de microorganismos causada por una  $a_w$  reducida. Además, como se mencionó anteriormente, la estabilidad microbiana y la seguridad de muchos alimentos se basan en los efectos combinados de los obstáculos. Por ejemplo, alimentos enlatados calientes llamados "medio conservados" o "conservados en tres cuartos" necesitan refrigeración durante el almacenamiento (Ray, 2000).

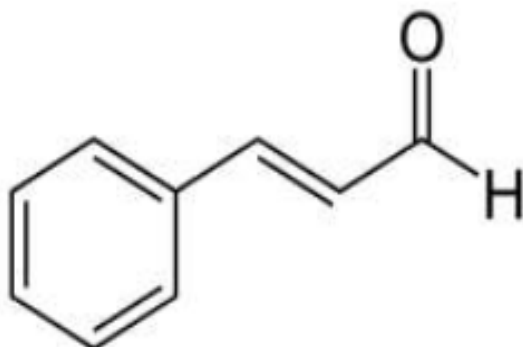
#### 4.4 Generalidades de los aceites esenciales

Los aceites esenciales derivados de plantas o especias han sido ampliamente estudiados por sus actividades fungicidas, insecticidas y antimicrobianas, y se ha encontrado que los aceites esenciales de tomillo, orégano, menta, canela, salvia y clavo poseen las más potentes propiedades antimicrobianas de entre muchos probados (Kalemba y Kunicka, 2003). Se obtienen principalmente de plantas mediante destilación al vapor (Li *et al.*, 2010) o mediante extracción con dióxido de carbono supercrítico (Sylvia *et al.*, 2015). Los principales compuestos presentes en los aceites esenciales, que imparten propiedades antimicrobianas a las plantas, incluidas las hierbas y las especias, son compuestos fenólicos (flavonoides y no flavonoides), terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, saponinas, tiosulfatos, glucosinolatos (Zilberberg *et al.*, 2008). Las plantas comestibles, medicinales, a base de plantas y los aceites esenciales y subproductos correspondientes, como los hidrocolesteroles, así como los metabolitos secundarios, son capaces de retrasar o inhibir el desarrollo de bacterias, levaduras y mohos. Las plantas/especias comestibles y herbales como orégano, canela, clavo de olor, citral, ajo, cilantro, perejil, romero, limoncillo, salvia y vainillina, se han empleado solos o combinados con otras técnicas de conservación (Wong *et al.*, 2014).

##### 4.4.1 Cinamaldehído.

Desde hace mucho tiempo, el cinamaldehído se ha utilizado como un agente aromatizante en los chicles, helados, bebidas y dulces. Además, ha sido ampliamente utilizado para dar un sabor a canela a productos médicos, cosméticos y perfumes (Hooth *et al.*, 2004). Cinamaldehído es un líquido oleoso amarillento con un fuerte olor a canela y sabor dulce. De fórmula molecular  $C_9H_8O_2$  y masa molecular 136.2 g/mol. Está compuesto por un aldehído insaturado unido a un grupo fenilo (Figura 2), es por ello que tiene aromaticidad. Presenta una baja solubilidad en agua, siendo muy soluble en aceites (Carrizosa, 2014). Andre Dumas y Peligot fueron los primeros en aislar el cinamaldehído del aceite de canela en 1834. Sin embargo, el cinamaldehído fue sintetizado por primera vez en laboratorio por Chiozza en 1854. Cinnamaldehído obtenido de extractos naturales o sintetizado en laboratorio; demuestra excelentes actividades biológicas. Se informa que muestra actividades insecticidas, antimicrobianas, antifúngicas, antiinflamatorias,

inmunomoduladoras, anticancerosas y antiangiogénicas. Además, también induce la muerte celular apoptótica e inhibe el crecimiento tumoral (Sheikh *et al.*, 2016).



**Figura 2.** Estructura química del cinamaldehído. Adaptada de Carrizosa, C., (2014).

Muchos estudios han indicado que el cinnamaldehído interactúa con las membranas de las células microbianas, pero la forma en que este compuesto perturba las membranas celulares aún no es concluyente. De hecho, el cinamaldehído es capaz de alterar el perfil lipídico de las membranas de las células microbianas (Wendakoon y Morihiko, 1995). Se demostró que un estudio altera el perfil lipídico de la membrana que conduce a un aumento de la permeabilidad y la desintegración de la envoltura celular en el caso de las células de *Staphylococcus aureus* tratadas con cinamaldehído (Pasqua *et al.*, 2006). El cinamaldehído es altamente efectivo contra *Escherichia coli* y *Salmonella*, los resultados obtenidos para microscopía electrónica de células tratadas con aceite revelaron daño estructural y pérdida de contenido celular (Yossa *et al.*, 2013). Los estudios demuestran que además inhibe la actividad de ATPasa unida a la membrana de *E. coli* y *Listeria monocytogenes* (Gill y Holley, 2006).

Las evidencias experimentales disponibles sugieren que el cinamaldehído muestra actividades antimicrobianas debido a la inhibición de la pared celular biosíntesis, función de membrana y actividades enzimáticas específicas (Pasqua *et al.*, 2007). Aunque los objetivos más específicos del cinamaldehído no están bien establecidos; a concentraciones letales, el cinnamaldehído perturba la membrana celular. En concentraciones sub-letales, entra en el periplasma e inhibe la actividad de la ATPasa transmembrana (Gill y Holley, 2006) y en niveles muy bajos, puede inhibir las enzimas que están involucradas en la interacción de las citoquinas.

#### 4.4.2 Toxicidad y consumo.

La cantidad máxima permisible de cinamaldehído en diferentes productos es; 6400 ppm en frutas y jugos, 3500 ppm en alimentos horneados, 2200 ppm en cereales para el desayuno, 2000 ppm en alimentos para bebés y postres, y 1100 ppm en chicles (Gowder, 2014). FEMA USA (Asociación de fabricantes de sabores y extractos de EE. UU.) ha aprobado el estado GRAS (generalmente reconocido como seguro) para el cinamaldehído. La FDA de EE. UU. (Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos) también aprobó los alimentos y otros usos del cinamaldehído. Las investigaciones toxicológicas del cinamaldehído se han llevado a cabo por necesidad y adecuación. Un estudio repasó la toxicidad del alcohol cinámico, cinamaldehído y ácido cinámico, y encontró el bajo orden de toxicidad por estos agentes cuando se toma por vía oral o por vía dérmica de exposición (Bickers *et al.*, 2005).

Aproximadamente 180,000 kg de cinamaldehído se consumen anualmente en alimentos, de los cuales 39,000 kg se consumen por el uso de canela y el consumo de 141,000 kg se debe a su adición deliberada como sabor. Casi el 95% del consumo de cinamaldehído se debe a sus usos aromatizantes. Se espera que el uso de cinamaldehído pueda crecer aproximadamente un 3% anual durante los próximos cinco años (Sheikh *et al.*, 2016).

#### 4.5 Luz ultravioleta de onda corta (UV-C).

##### 4.5.1 Generalidades.

Las tecnologías emergentes ofrecen productos en su estado más natural, aumentan la vida en anaquel y ofrecen sobre todo productos inocuos al reducir significativamente la cuenta total microbiana, principalmente los considerados patógenos y de putrefacción en los alimentos (Raybaudi- Massilia *et al.*, 2006). Por lo tanto, existe la demanda de tecnologías de procesamiento mínimo tales, como la alta presión, irradiación, pulsos eléctricos, ultrasonidos de potencia, ozono y los campos magnéticos oscilantes. Los consumidores buscan alimentos con productos de alta calidad: frescos, sin aditivos, nutritivos, seguros y lo más naturales posible (Patil *et al.*, 2009). Los procesos térmicos para alimentos se usan comúnmente para la pasteurización de jugos con el fin de inactivar microorganismos y

enzimas responsables de cambios indeseables. Sin embargo, los atributos sensoriales (sabor, aroma, color) y los compuestos bioactivos (fenólicos totales, vitaminas y pigmentos) de los productos de frutas y vegetales podrían verse dañados por las altas temperaturas utilizadas en la pasteurización (Ibarz y Barbosa, 2003).

La luz UV es la radiación electromagnética con longitud de onda más corta que la luz visible y más larga que los rayos X; se divide en UV-Cercano (380-200 nm), UV-Lejano (200-10 nm) y UV-Extremo (31-1 nm) (Pachau y Tiwari, 2008). Considerando el efecto de la radiación sobre la salud humana y el medio ambiente, a una longitud de onda de 100 a 400 nm, se divide en: UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320 nm), UV-C (200-280 nm) y Vacío-UV (100-200 nm) (a veces considerada UV-Extremo). En la literatura, han sido documentadas variaciones en los intervalos y la nomenclatura. La luz UV-C posee el mayor efecto germicida, específicamente entre 250 y 270 nm, y la máxima eficiencia para la desinfección se sitúa específicamente a 254 nm (Christen *et al.*, 2013).

Las lámparas típicamente usadas para la desinfección con UV-C consisten en tubos de cuarzo que contienen un gas inerte en su interior, como argón, y pequeñas cantidades de mercurio. Las fuentes de radiación usadas pueden ser clasificadas en lámparas de baja y media presión de descarga de mercurio (Pombo, 2009).

La luz UV-C es utilizada para la inactivación de microorganismos en el área alimenticia. El tratamiento consiste en energía bajo forma de ondas electromagnéticas, esto implica que parámetros tales como temperatura, alcalinidad, carbono inorgánico total y pH no interfieren con la radiación ultravioleta, sin embargo existen factores críticos que si alteran el efecto de la luz UV-C sobre el alimento líquido, tales como la transmisividad del producto (asociada a la concentración inicial de microorganismos, partículas en suspensión, color y composición del producto), la configuración geométrica del reactor, la potencia, la longitud de onda y la disposición física de la fuente de UV, el perfil de flujo de producto y la trayectoria de la radiación. Asimismo, el material orgánico y la turbidez pueden proteger a los microorganismos de las radiaciones, bajando la eficiencia del proceso, esto se debe a la penetración de luz UV-C sobre líquidos que no son transparentes y/o tienen gran cantidad de sólidos en suspensión. Además, elementos como sulfitos, hierro, nitritos y fenoles absorben UV, así como el contenido orgánico del agua, lo cual también afecta la

eficiencia del proceso (Ríos, 2010). Por lo contrario, los líquidos con buena transmitancia de luz no presentan inconvenientes en el tratamiento con radiación UV-C (Domínguez y Parzanese, 2015).

La luz UV-C se ha utilizado en jugos principalmente para inactivar microorganismos (patógenos, desechos o flora nativa) y para evaluar su efecto sobre algunas características fisicoquímicas (sólidos solubles, pH, acidez y color) y compuestos funcionales (fenoles, pigmentos, vitaminas y capacidad antioxidante). Sin embargo, existen pocos estudios que evalúen la estabilidad y vida útil de los productos tratados con luz UV-C (Ochoa-Velasco y Guerrero-Beltrán, 2013). Algunos investigadores indicaron que la luz UV-C tiene una aplicación potencial en las industrias de jugos y néctares debido al bajo costo de procesamiento (Bintsis *et al.*, 2000). Guerrero-Beltrán y Barbosa-Cánovas (2005) señalaron que la penetración de la luz UV-C en los jugos de fruta es de aproximadamente 1 mm para un 90% de absorción de la luz. Por lo tanto, se recomienda un flujo turbulento durante el procesamiento de luz UV-C de alimentos líquidos (FDA, 2001). Aunque existen muchos estudios sobre la aplicación de luz UV-C en los zumos de frutas, solo unos pocos han informado del efecto de la luz UV-C sobre el crecimiento microbiano y las características de calidad durante el almacenamiento (Ochoa-Velasco y Guerrero, 2013).

#### 4.5.2 Mecanismo de desinfección de la luz UV-C.

El uso de luz UV-C de onda corta en los alimentos tiene como objetivo reducir la carga microbiana total para extender su vida útil inactivando los microorganismos patógenos (Demirci y Panico, 2008). El proceso de irradiación UV-C implica la exposición del producto a una luz germicida con una longitud de onda de 254 nm para inactivar bacterias y virus contaminantes (Gabriel y Nakano, 2009). El efecto de la luz UV-C sobre los microorganismos está en el nivel de ADN. La luz UV-C puede penetrar a través de las membranas celulares de los microorganismos y generar fotoproductos (dímeros de pirimidina), que pueden bloquear la transcripción y replicación del ADN; por lo tanto, las funciones celulares están inhibidas y puede producirse la muerte de microorganismos (Quek y Hu, 2008). Como cualquier otro desinfectante, el tiempo de exposición es vital

para asegurar un buen desempeño. No es fácil determinar con exactitud el tiempo de contacto (ya que éste depende del tipo de flujo y de las características del equipo), pero el período debería estar relacionado con la dosificación necesaria (Solsona y Méndez, 2002). Entonces se podría decir que cuanto mayor es el tiempo de exposición a una determinada dosis, tanto más eficaz es el tratamiento (Suárez, 2001). El tiempo de aplicación de UV-C oscila entre 1 y 5 minutos, periodo que no incrementa significativamente la temperatura del producto (1-3°C), ni produce alteraciones o favorece los procesos deteriorativos del producto (Rivera-Pastrana *et al.*, 2007). No obstante, es posible que ocurra una reactivación dado que el ADN puede ser reparado por factores proteínicos cuando las células dañadas se exponen a longitudes de onda superiores a 330 nm (Barbaros y Gülsün, 2014). Por ello, un ambiente oscuro y/o la refrigeración evitan la foto-reactivación de productos tratados con UV y la restauración de las células expuestas (Sastry *et al.*, 2000).

El uso de luz UV-C ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) de EE. UU., como un proceso de pasteurización en frío para productos alimenticios líquidos; sin embargo, se requieren cinco reducciones microbianas logarítmicas de los patógenos más resistentes presentes en el jugo (FDA, 2001). Hasta ahora, existen pocos estudios sobre el efecto de la luz UV-C sobre la reducción microbiana en el agua de coco, especialmente los realizados por Gabriel (2015) y Gabriel y Colambo (2016); sin embargo, en ninguno de ellos se evaluó la estabilidad del agua de coco durante el almacenamiento.

#### 4.5.3 Ventajas y desventajas de la luz UV-C.

A continuación se listan las ventajas y las desventajas de los tratamientos con luz UV-C (Pérez, 2006).

##### Ventajas

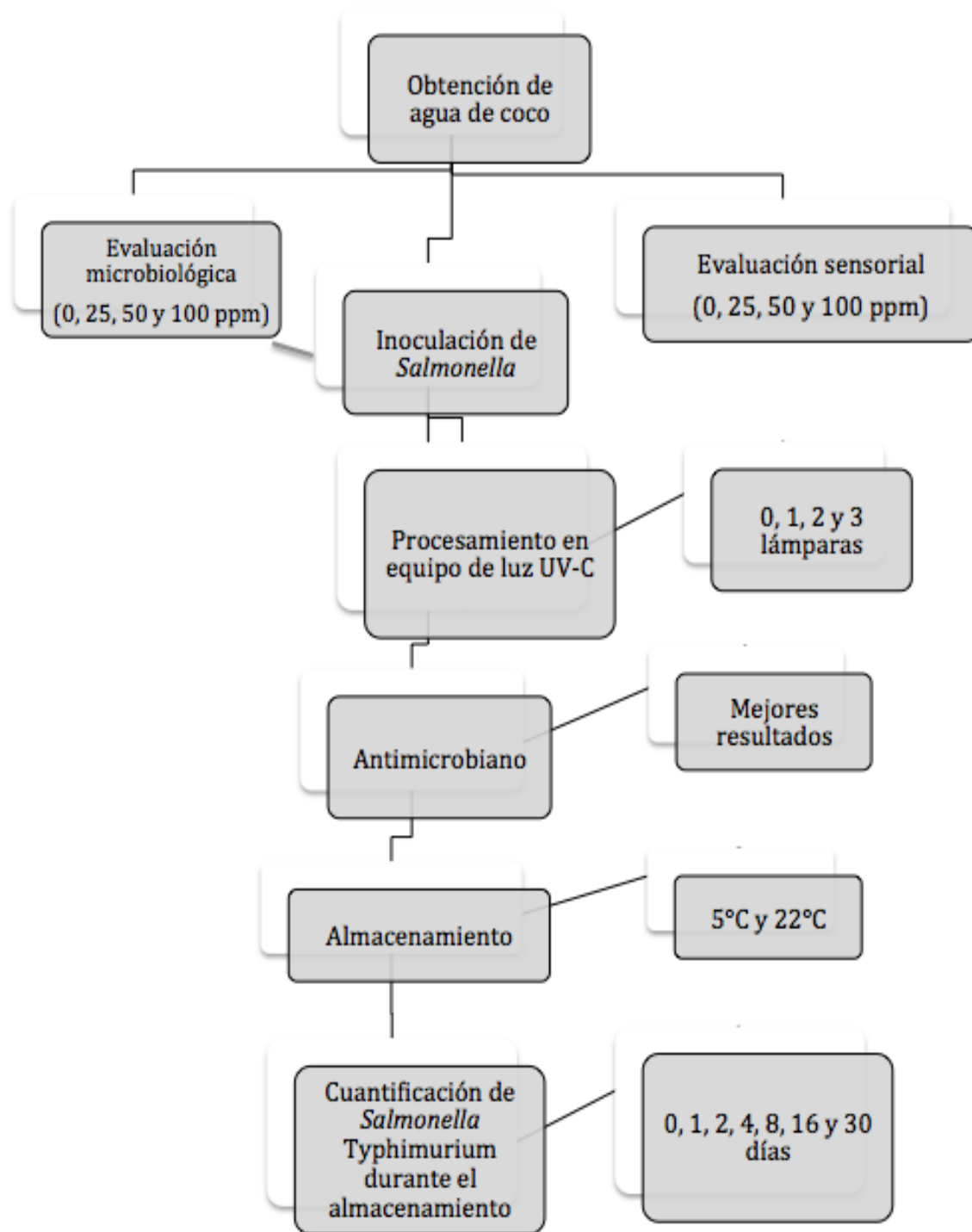
- La desinfección con luz UV-C es eficaz para la desactivación de la mayoría de los virus, esporas y bacterias.

- La desinfección con luz UV-C es más un proceso físico que una desinfección química, lo cual elimina la necesidad de generar, manejar, transportar, o almacenar productos químicos tóxicos, peligrosos o corrosivos.
- No existe ningún efecto residual que pueda afectar a los seres humanos.
- La desinfección con luz UV-C es de uso fácil para los operadores.
- El equipo de desinfección con luz UV-C requiere menos espacio que otros métodos.

#### Desventajas

- La baja dosificación puede no desactivar efectivamente algunos virus, esporas y bacterias.
- Algunas veces los organismos pueden reparar o invertir los efectos destructivos de la radiación UV-C mediante un “mecanismo de reparación”, también conocido como fotoreactivación o, en ausencia de radiación, como “reparación en oscuro”.
- La desinfección con luz UV-C no es tan económica como la desinfección con cloro, pero los costos son competitivos cuando la cloración requiere descloración y se cumple con los códigos de prevención de incendios.

## 5 DIAGRAMA DE TRABAJO



## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Material.

Material de vidrio, cajas Petri, agar selectivo Salmonella-Shigella, agua de coco natural, aceite cinamaldehído, tween 20, glicerol al 20%.

### 6.2 Material biológico.

Cepa pura de *Salmonella enterica* subespecie enterica serovar Typhimurium (ATCC 14028).

La cepa se obtuvo del cepario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

### 6.3 Agua de coco.

El agua de coco se obtuvo de cocos frescos.

**Tabla 2. Equipos que se utilizaron en la investigación.**

<b>Nombre</b>	<b>Modelo</b>	<b>Marca</b>
Campana de flujo laminar.	CFLV-102	ESEV
Estufa de cultivo	E-41	BG
Autoclave	As-25	Cisa
Balanza analítica	8-14.5VAC	El crisol
Equipo de luz UV-C		BUAP
Micro pipeta		BRAND

**Tabla 3. Métodos utilizados.**

<b>Determinación</b>	<b>Método</b>	<b>Referencia</b>
Confirmación de la cepa <i>Salmonella</i> Typhimurium.	Siembra en medios selectivos y diferenciales.	Rodriguez-Cavallini <i>et al.</i> , 2003.
Cuantificación de bacterias	Vertido en placa	NOM-210-SSA1-2014.

#### 6.4 Metodología:

##### 6.4.1 Preparación de cinamaldehído.

Para preparar el cinamaldehído se tomaron 10 ml de una solución madre que se encontraba a una concentración de 100,000 ppm. Se puso en un matraz aforado con 90 µl de tween 20 y se aforo con agua destilada a 100 ml (10,000 ppm).

##### 6.4.2 Evaluación sensorial.

Se realizó una evaluación sensorial con agua de coco natural y cinamaldehído a diferentes concentraciones: 0 ppm, 25 ppm, 50 ppm y 100 ppm. La evaluación se realizó a 100 jueces no entrenados alumnos de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y se les pidió que calificuen del 1 (me disgusta extremadamente) al 9 (me gusta extremadamente) el grado de aceptación al agua de coco con cinamaldehído (ver anexo).

##### 6.4.3 Inoculación microbiana

###### 6.4.3.1 Obtención de *Salmonella* Typhimurium.

Se tomó una asada de *Salmonella* Typhimurium que se obtuvo del cepario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, para inocularla en 100 ml de caldo nutritivo para reactivarla. Se dejó en la estufa de cultivo a 37°C por 24 horas. Después de las 24 horas se tomó 1 ml del caldo y se pasó a un Eppendorf con 1 ml de glicerol al 20%. Se hicieron 20 Eppendorf con caldo y glicerol al 20% manteniéndose en congelación.

#### 6.4.3.2 Inoculación de *Salmonella Typhimurium* en agua de coco.

Posteriormente se tomó un Eppendorf que contenía caldo nutritivo con glicerol al 20% y se inoculó en 100 ml de agua de coco natural dejándolo incubar por 24 horas a 37°C. Después de las 24 horas se tomó 1 ml del agua de coco natural inoculada con *Salmonella Typhimurium* y 1 ml de glicerol al 20% para ponerlo en un Eppendorf. Se realizaron 20 Eppendorf y se mantuvieron en congelación.

#### 6.4.3.3 Realización de sistemas con agua de coco inoculada con *Salmonella Typhimurium* adicionada con antimicrobiano almacenadas a diferentes temperaturas (22°C y 5°C).

A continuación se realizó el siguiente diseño experimental (tabla 4). Se tomaron cuatro Eppendorf que contenía el microorganismo en el agua de coco con el glicerol al 20% y se inocularon en 400 ml de agua de coco natural por 24 horas a 37°C. 24 horas después se dividieron los 400 ml, realizándose 8 sistemas los cuales contenían 50 ml de agua cada uno. A dos sistemas se les agregó 500 µl de cinamaldehído y dos sistemas no contenían antimicrobiano, almacenándolos a temperatura ambiente (22°C). Se hicieron otros 4 sistemas, agregando 500 µl de cinamadehído a dos de ellos y los otros dos sin antimicrobiano. Se mantuvieron a temperatura de refrigeración (5°C). Durante 30 días se monitoreó el efecto del cinamaldehído en el agua de coco con *Salmonella*. Se sembraron diferentes diluciones en agar *Salmonella-Shigella* los días 0, 1, 2, 4, 8, 16 y 30 mediante la técnica de vertido en placa.

**Tabla 4. Diseño experimental que se siguió.**

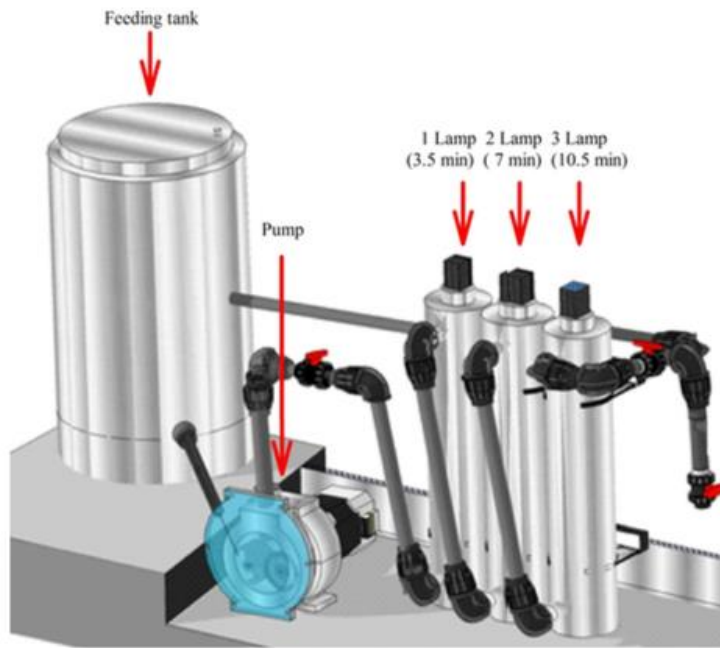
<b>Tratamiento</b>	<b>Número de lámparas</b>	<b>Concentración de cinamaldehído (ppm)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
1	0	0	5
2	0	0	22
3	0	100	5
4	0	100	22
5	1	0	5
6	1	0	22
7	1	100	5
8	1	100	22
9	2	0	5
10	2	0	22
11	2	100	5
12	2	100	22
13	3	0	5
14	3	0	22
15	3	100	5
16	3	100	22

6.4.3.4 Realización de sistemas con agua de coco procesada con luz UV-C adicionada con antimicrobiano y almacenada a diferentes temperaturas (22°C y 5°C).

Nuevamente se tomaron cuatro Eppendorf y se inoculó en 400 ml de agua de coco. Se procesó en un equipo de luz UV-C (Figura 3) con tres lámparas. Se repartió en 8 sistemas el agua de coco procesada, con 50 ml cada uno. A dos envases se les agregó 500 µl de cinamaldehído y a dos envases no se les agregó nada, dejándolos a temperatura ambiente (22°C). Otros dos sistemas se les agregó 500 µl de cinamadehído, los otros dos solo contenían el agua de coco y los cuatro se dejaron en refrigeración (5°C). Nuevamente se

monitoreó el crecimiento por 16 días, sembrándose diferentes diluciones en agar *Salmonella-Shigella* los días 0, 1, 2, 4, 8 y 16.

Se repitió el proceso anterior, utilizando dos y una lámpara para procesar el agua de coco inoculada con *Salmonella Typhimurium*.



**Figura 3.** Equipo de luz UV-C. Adaptada de Ochoa-Velasco, C.E y Guerrero-Beltrán, J.Á., (2013).

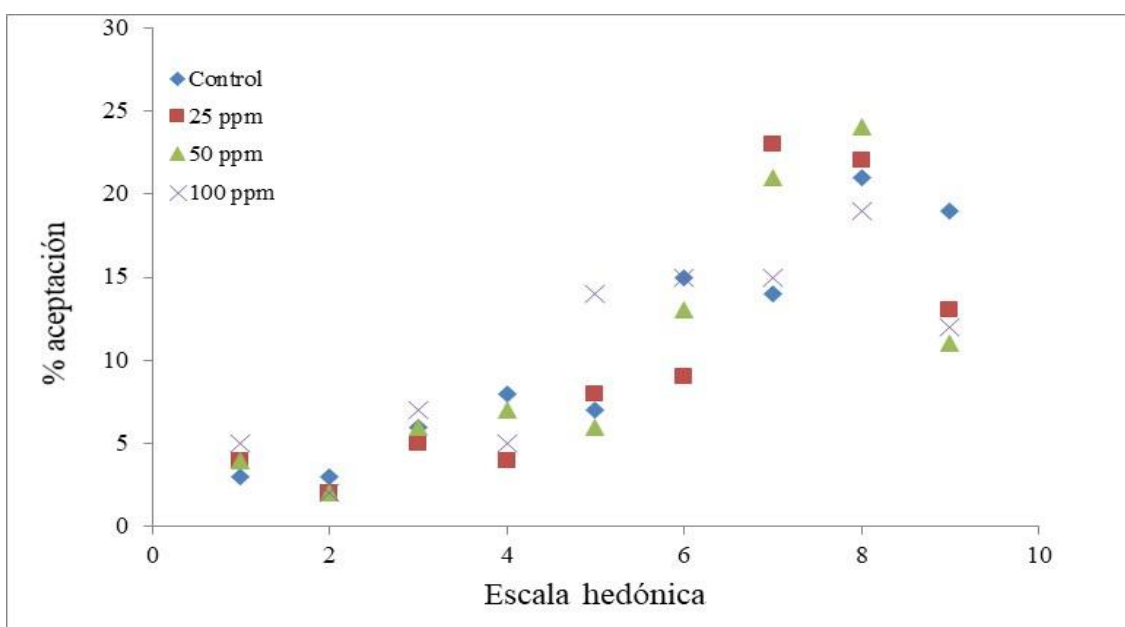
### 6.5 Análisis Estadístico.

Se realizó un análisis estadístico (ANOVA) a los resultados obtenidos con el programa Minitab Inc. PA, USA, 2008. La diferencia entre las medias de los tratamientos se analizó mediante la prueba de Tukey con un 95% de estadística.

## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Evaluación sensorial.

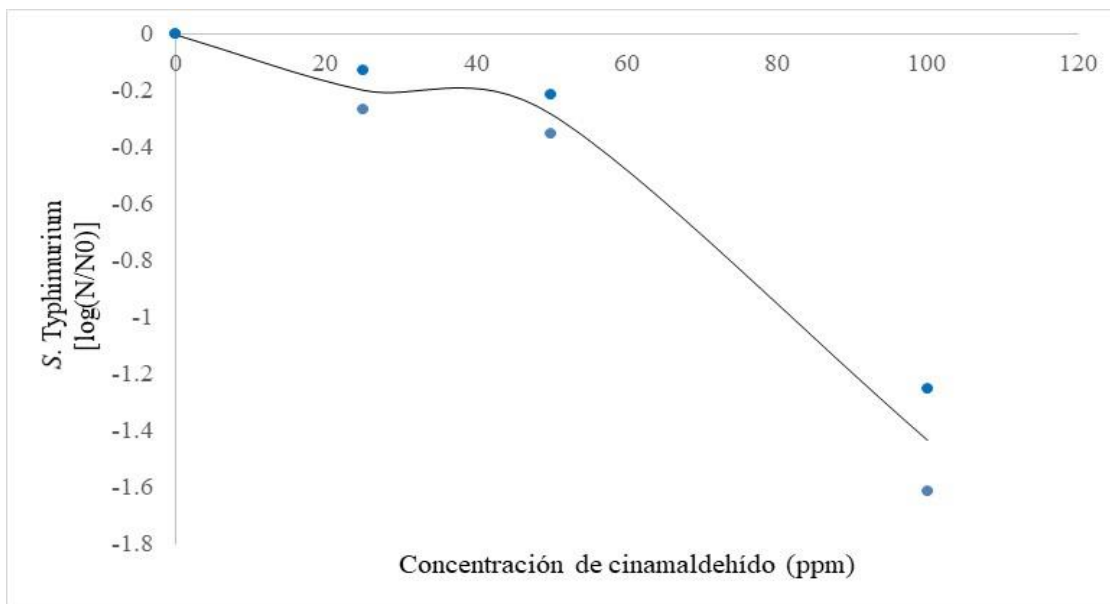
La Figura 4 muestra el efecto de la adición de cinamaldehído sobre la aceptación general de agua de coco. Como se observa en la figura 4, la aceptación sensorial del agua de coco fresca y adicionada con cinamaldehído fue buena ya que la mayor parte de los jueces (mayor o igual al 20%) las calificaron con un valor de 8 (me gusta mucho); siendo la de mayor aceptación aquella adicionada con 50 ppm de cinamaldehído, aunque no existió diferencia significativa ( $p>0.05$ ) entre las muestras de agua de coco fresca y adicionada con cinamaldehído, sin importar la concentración del mismo. Lo anterior puede deberse al sabor y aroma ligeramente dulce que le provee el cinamaldehído al agua de coco, dado que es un extracto de la canela. Hasta el momento existen pocos estudios de la evaluación sensorial de agua de coco; sin embargo, los valores obtenidos en este estudio son superiores a los reportados por Damar *et al.*, (2009). Ellos reportaron valores de 4.58-5.03 de una escala hedónica de 9 puntos para bebidas refrescantes a base de agua de coco.



**Figura 4.** Evaluación sensorial de agua de coco fresca adicionada con cinamaldehído a diferentes concentraciones (0, 25, 50 y 100 ppm).

## 7.2 Efecto de cinamaldehído a diferentes concentraciones sobre *Salmonella* Typhimurium.

Posteriormente, la Figura 5 muestra el efecto del cinamaldehído sobre *Salmonella* Typhimurium inoculado en agua de coco. Como se observa al aumentar la concentración del antimicrobiano hay una reducción microbiana de *Salmonella* Typhimurium. Cuando se tiene una concentración de 25 ppm existe una reducción microbiana de aproximadamente 0.3 ciclos logarítmicos. Con 50 ppm se tiene una reducción de aproximadamente 0.4 ciclos logarítmicos, notando que entre estas dos concentraciones no hay diferencia significativa de reducción de *Salmonella* Typhimurium. Sin embargo, con una concentración de 100 ppm de cinamaldehído fue posible reducir aproximadamente 1.4 ciclos logarítmicos, siendo ésta concentración la más efectiva. Se ha demostrado que el cinamaldehído es activo contra una variedad de bacterias patógenas transmitidas por los alimentos, incluyendo *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* Typhimurium, hongos y virus. Diferentes estudios analizaron los efectos de cinamaldehído en bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, demostrando que permeabiliza las membranas internas, alterando su estructura (Qing-Yi *et al.*, 2011). La reducción microbiana con cinamaldehído obtenida en este estudio fue similar a los resultados obtenidos de Zhou *et al.*, (2007) con *Salmonella* Typhimurium CGMCC 1.1174 inoculado en caldo Mueller Hinton, donde reportan una reducción de 1.1 ciclos logarítmicos usando la misma concentración de 100 ppm.

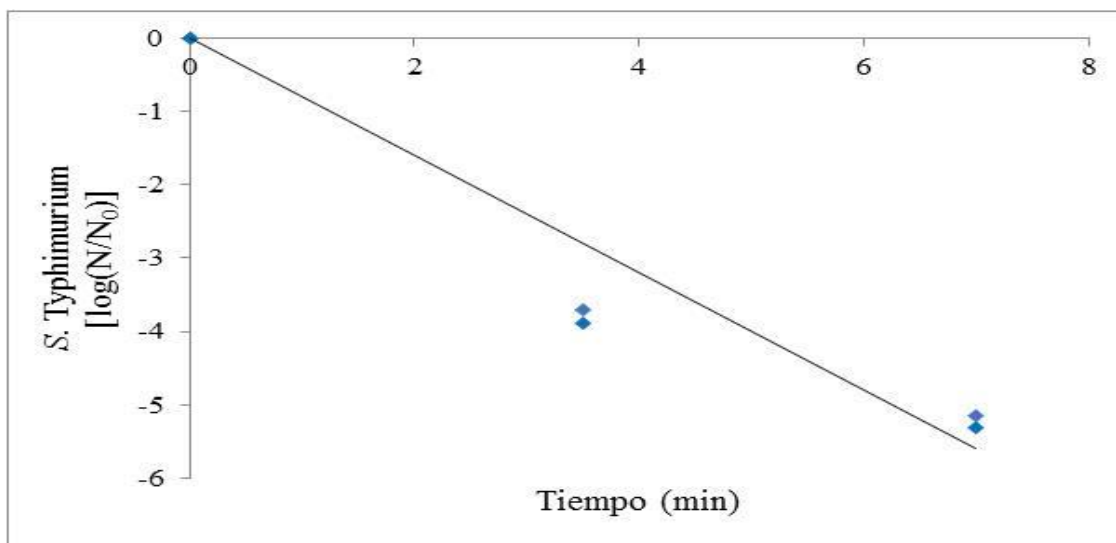


**Figura 5.** Efecto de diferentes concentraciones de cinamaldehído (25, 50 y 100 ppm) sobre *Salmonella Typhimurium* inoculada en agua de coco.

### 7.3 Efecto de diferentes tiempos de exposición a la luz UV-C sobre *Salmonella Typhimurium*.

La Figura 6 muestra el efecto de la dosis de tratamiento con UV-C sobre la inactivación de *Salmonella Typhimurium* en agua de coco. En dicha figura se observa que al incrementar el tiempo de tratamiento se reduce la carga microbiana de *Salmonella Typhimurium* alcanzando una reducción de 3.8 ciclos logarítmicos con una lámpara (3.5 min), 5 ciclos logarítmicos con dos lámparas (7 min). Los resultados con la exposición de tres lámparas (10.5 min) muestran una inhibición completa de *Salmonella Typhimurium*. Se observó una respuesta lineal ( $R^2 > 0.912$ ) entre la inactivación microbiana y el tiempo de tratamiento (0-7.0 min); por lo tanto, se calculó el valor de tiempo de reducción decimal, obteniendo un  $D_{uv}$  de  $1.2 \pm 0.0$  min ( $3.2 \text{ J cm}^{-2}$ ). La luz ultravioleta en el rango de 200-280 nm es letal para la mayoría de los microorganismos, incluyendo bacterias, virus, hongos y levaduras, pero la eficacia difiere entre especies, cepas e incluso en la etapa de crecimiento del cultivo. La radiación UV-C provoca una reorganización de los ácidos nucleicos de los microorganismos que afectan su reproducibilidad. La acción bactericida del tratamiento depende principalmente de la dosis de luz ultravioleta aplicada al microorganismo (García *et al.*, 2017). Aunque se ha demostrado que los efectos del tratamiento con luz UV-C

también dependen de varios factores que incluyen propiedades fisicoquímicas y ópticas de los alimentos líquidos, como el pH y los grados brix, por lo que las propiedades del agua de coco fueron adecuadas para observar una respuesta lineal contra el tratamiento con luz UV-C; en este aspecto, Gabriel (2015) y Gabriel y Colambo (2016) informaron una tendencia similar del tratamiento con luz UV-C contra diferentes microorganismos inoculados en agua de coco. Reportaron valores de  $D_{uv}$  inferiores a los obtenidos en este estudio.

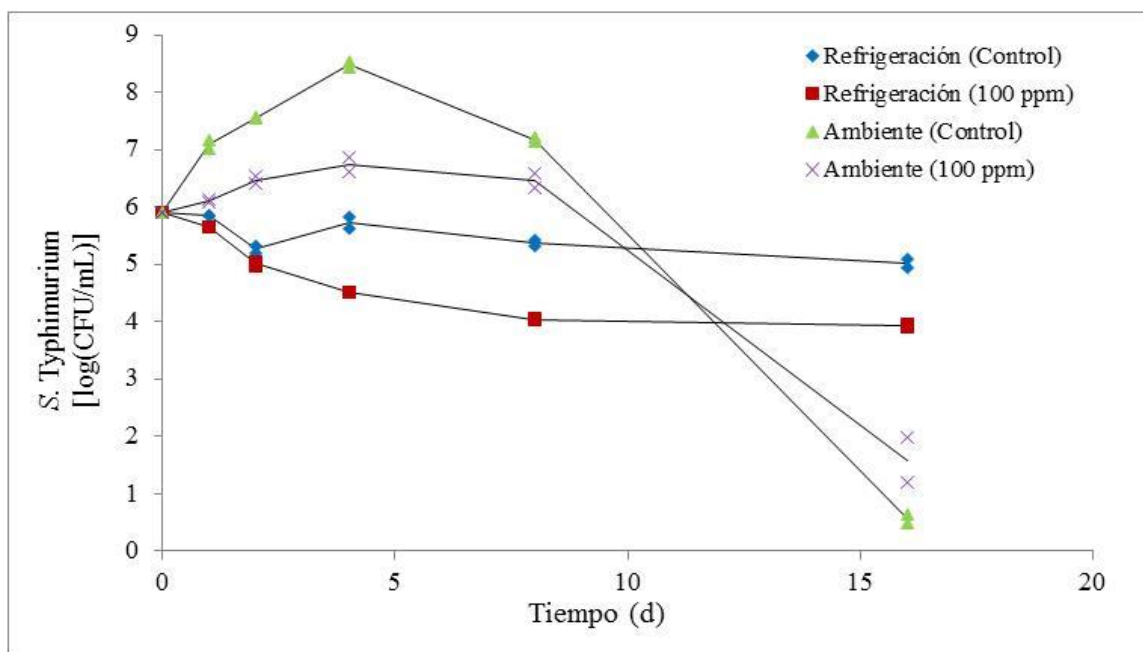


**Figura 6.** Efecto de luz ultravioleta de onda corta (UV-C) sobre la inactivación de *Salmonella Typhimurium* inoculada en agua de coco.

#### 7.4 Efecto de cinamaldehído y temperatura sobre *Salmonella Typhimurium*.

En la Figura 7 se muestra el efecto de los métodos combinados (antimicrobiano y temperatura) sobre el crecimiento de *Salmonella Typhimurium* inoculada en agua de coco. Se observa que la carga de *Salmonella Typhimurium* aumentó durante el almacenamiento a 22°C, aunque la carga siempre fue mayor en los sistemas que no contenían cinamaldehído. En el agua de coco almacenada a 5°C se observa una disminución de *Salmonella Typhimurium* durante el almacenamiento, obteniéndose una mayor reducción en agua de coco añadida con cinamaldehído. Esto se debe a que las bajas temperaturas ayudan a disminuir el crecimiento microbiano (Aguayo, 2003), aunado a que el cinamaldehído ejerce fuertes propiedades antimicrobianas contra las bacterias (Tajkarimi, 2010).

Hasta el momento, no hay estudios sobre la aplicación de cinamaldehído como antimicrobiano para mejorar la vida de almacenamiento de agua de coco; sin embargo, en jugos como el de zanahoria (2.0  $\mu\text{l/ml}$  de cinamaldehído) o jugos de bayas (1.5  $\mu\text{l/ml}$  de cinamaldehído), *Salmonella entérica* se inactivó completamente en unas pocas horas de combinación con baja temperatura de 4°C en almacenamiento (Manu *et al.*, 2017).

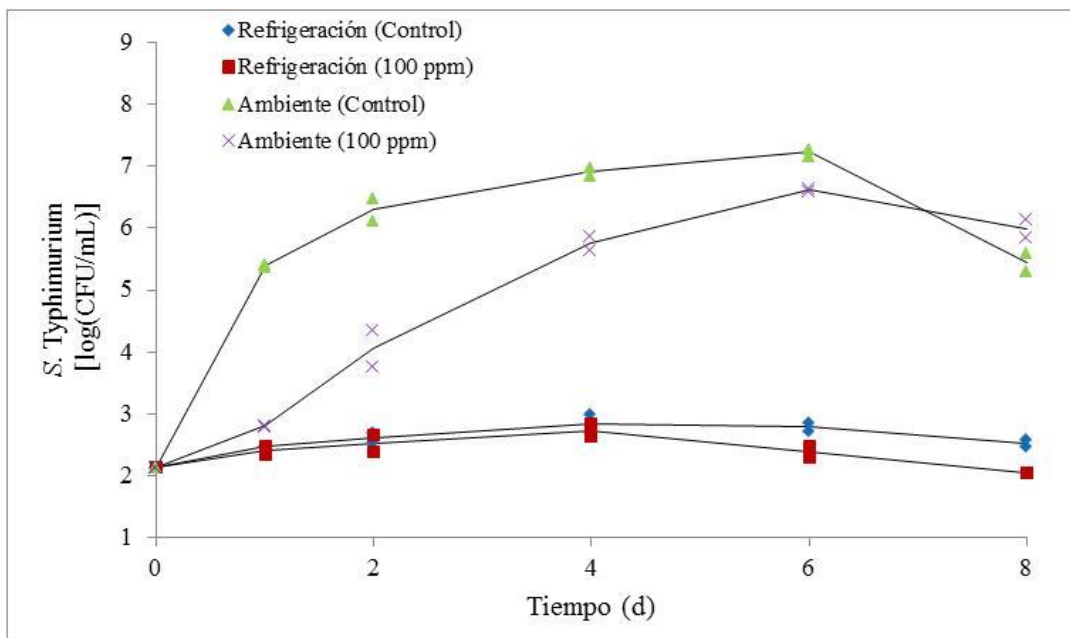


**Figura 7.** Efecto de métodos combinados (temperatura y cinamaldehído) sobre *Salmonella Typhimurium* inoculada en agua de coco.

### 7.5 Efecto de métodos combinados [luz UVC (3.5 minutos), cinamaldehído y temperatura] sobre *Salmonella Typhimurium* durante el almacenamiento.

En la Figura 8 se muestra el efecto que tuvo la luz UV-C en el agua de coco inoculada con *Salmonella Typhimurium*. Se observa que la carga inicial para los sistemas es de 2 log (UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) debido al tratamiento con luz UV-C (3.5 min); sin embargo, es posible notar que en el agua de coco almacenada a temperatura ambiente, la carga de *Salmonella Typhimurium* fue aumentando durante los siguientes días, aunque la carga fue mayor en el sistema que no contenía el antimicrobiano; después de eso, la carga microbiana se redujo ligeramente a partir del sexto día. En los sistemas almacenados en refrigeración se observa

que la carga microbiana no aumento tanto a partir de la carga inicial y la diferencia de carga microbiana entre el sistema con y sin antimicrobiano es mínima pero significativamente mayor en el agua de coco sin antimicrobiano. En este sentido, Ochoa-Velasco *et al.*, (2017) informaron que si las células viables (<10 UFC/ml) de *Salmonella* Typhimurium permanecen viables en agua de coco después del tratamiento con luz UV-C, son capaces de alcanzar una carga microbiana alta en tres días. Por lo tanto, la utilización de métodos combinados evitaría el proceso de reactivación microbiana.

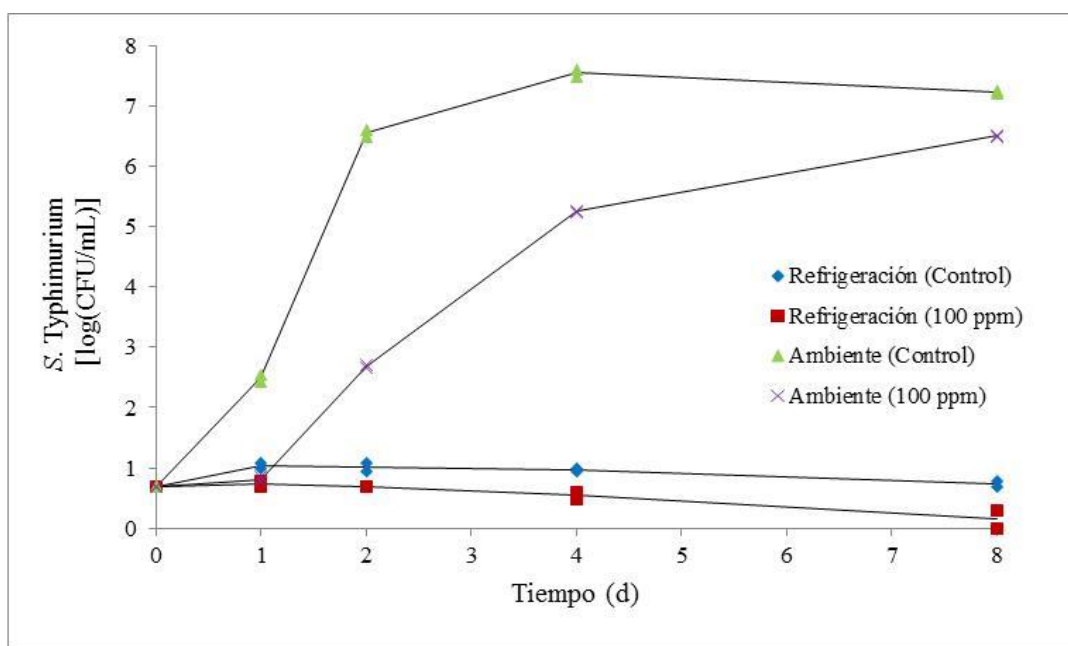


**Figura 8.** Efecto de métodos combinados [luz UV-C (3.5 minutos) temperatura y cinamaldehído] sobre *Salmonella* Typhimurium inoculada en agua de coco.

#### 7.6 Efecto de métodos combinados [luz UVC (7 minutos), cinamaldehído y temperatura] sobre *Salmonella* Typhimurium durante el almacenamiento.

Finalmente, en la Figura 9 se muestra el efecto que tuvo la luz UV-C (7 min) en el agua de coco inoculada con *Salmonella* Typhimurium. Durante el almacenamiento a 5°C, se percibió un ligero aumento de *Salmonella* Typhimurium sin antimicrobiano; mientras que en agua de coco adicionada con cinamaldehído se mantuvo la carga microbiana, hasta el cuarto día de almacenamiento, posteriormente se observó una disminución, mostrando una carga microbiana menor que 10 UFC/ml, lo que indica que el tratamiento de conservación

ejerció un efecto inhibitorio significativo ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, a 22°C se observa que *Salmonella* Typhimurium aumentó poco más de 2 ciclos logarítmicos en el primer día de almacenamiento y para el cuarto día su crecimiento fue mayor a 5 ciclos logarítmicos. Mientras que en agua de coco adicionada con cinamaldehído, aunque hubo crecimiento, este fue menor que en el agua de coco sin antimicrobiano. Un comportamiento similar fue informado por Antonelli *et al.* (2008), informaron que a bajas dosis de tratamiento con luz UV-C se produce un proceso de reactivación en *Escherichia coli*, coliformes totales y fecales; sin embargo, cuando aumenta la dosis de luz UV-C, el daño causado es tan fuerte que las células no pueden repararlo. Los tratamientos con dos lámparas de luz UV-C más cinamaldehído y almacenados a 5°C o tratamientos con tres lámparas, independientemente de otras barreras, no mostraron un crecimiento detectable de *Salmonella* Typhimurium durante 30 días. En este sentido, aunque no analizaron el crecimiento microbiano durante el almacenamiento, Gautam *et al.* (2017) señalaron que el agua de coco tratada con un reactor UV-C en espiral de flujo continuo mantiene sus características de calidad durante 28 días.



**Figura 9.** Efecto de métodos combinados [luz UV-C (7 minutos) temperatura y cinamaldehído] sobre *Salmonella* Typhimurium inoculada en agua de coco.

## 8 CONCLUSIONES

- El agua de coco es un buen medio de crecimiento para *Salmonella* Typhimurium.
- El cinamaldehído demostró tener una buena aceptación sensorial (me gusta moderadamente) debido a que da un sabor dulce al agua de coco. Además, a una concentración de 100 ppm, el cinamaldehído fue capaz de reducir la carga microbiana de *Salmonella* Typhimurium en 1.4 ciclos logarítmicos.
- El tratamiento con una lámpara de luz UV-C (3.5 min) redujo la carga microbiana de *Salmonella* Typhimurium en el agua de coco en  $3.8 \pm 0.1$  ciclos logarítmicos, mientras que con dos lámparas de tratamiento con luz UV-C (7 min) redujo  $5.2 \pm 0.1$  ciclos logarítmicos. En agua de coco procesada con 3 lámparas de luz UV-C (10.5 min) no se detectó presencia de *Salmonella* Typhimurium.
- En agua de coco almacenada a 22°C, se observó crecimiento de *Salmonella* Typhimurium, sin importar el uso de luz UV-C o cinamaldehído. Sin embargo, en agua de coco procesada con luz UV-C (7 min), añadida con cinamaldehído y almacenada a 5°C se observó que *Salmonella* Typhimurium disminuyó durante el almacenamiento ( $< 10$  UFC/ml).
- Los métodos combinados son una buena opción para poder mantener almacenada el agua de coco sin riesgo de crecimiento de microorganismos, siendo la mejor manera mantener el agua de coco a baja temperatura.

## 9 SUGERENCIAS

- Evaluar otras concentraciones de cinamaldehído para valorar su eficiencia contra *Salmonella Typhimurium* en agua de coco.
- Probar el antimicrobiano contra otros microorganismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, o *Listeria Monocitogenes*, pues son de las bacterias que más encontramos en los alimentos.
- Evaluar el tratamiento combinado con jugos o incluso con algún alimento sólido para ver si pueden tener el mismo efecto que tuvieron con el agua de coco.

## 10 BIBLIOGRAFÍA

1. Aguayo, E. (2003). Innovaciones tecnológicas en la conservación de melón y tomate procesado en fresco. Tesis de doctorado, Universidad Politécnica de Cartagena, España.
2. Álvarez, I., Condón, S. y Raso, J. (2006). Microbial inactivation by pulsed electric fields. *Pulsed electric fields technology for the food industry*, 97-129.
3. Álvarez-Ordoñez, A., Fernández, A., López, M., Arenas, R. y Bernardo, A. (2008). Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella Typhimurium* in response to growth conditions and their effect on heat resistance. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 212-219.
4. Antonelli, M., Mezzanotte, V., y Nurizzo, C. (2008). Wastewater disinfection by UV irradiation: short and long-term efficiency. *Environmental Engineering Science*, 25, 363-373.
5. Anurag, P. y Rajamohan, T. (2003). Cardioprotective effect of tender coconut water in experimental myocardial infarction. *Plant foods for human nutrition*, 58, 1-12.
6. Barbaros H.Ö. y Gülsün A.E. (2014). Dairy microbiology and biochemistry: Recent developments. *CRC Press*. New York. 340.
7. Bermúdez-Aguirre, D. y Corradini, M. (2011). Inactivation kinetics of *Salmonella* spp. under thermal and emerging treatments: A review. *Food Research International*, 45, 700-712.
8. Bickers, D., Calow, P., Greim, H., Hanifin, J., Rogers, A., Saurat, J., Sipes, I., Smith, R. y Tagami, H. (2005). A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients. *Food and chemical Toxicology*, 43, 799-836.
9. Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E. y Robinson, R.K. (2000). Existing and potential applications of ultraviolet light in food industry – a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 637-645.
10. Booth, I. (1998). Bacterial Responses to Osmotic Stress. *International Symposium on the Properties of Water*, 6, 346-360.

11. Carrizosa, C. (2014). Cinamaldehído: no sólo un dulce aroma. *Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide*, 14, 1-4.
12. Chang, C. y Wu, R. (2011). Quantification of (+)-catechin and (-)-epicatechin in coconut wáter by LC-MS. *Food Chemistry*, 126, 710-717.
13. Christen, L., Lai, C., Hartmann, B., Hartmann, P. y Geddes, D. (2013). Ultraviolet-C radiation: a novel pasteurization method for donor human milk. *PLOS One*, 8 (6), 68-120.
14. CONACOCO. (2012). Plan rector sistema producto nacional palma de coco. Comité sistema producto palma de coco. Disponible en: [http://dev.pue.itesm.mx/sagarpa/nacionales/EXP\\_CNSP\\_PALMA%20DE%20COCO/PLAN%20RECTOR%20QUE%20CONTIENE%20PROGRAMA%20DE%20TRABAJO%202012/PR\\_CNSP\\_PALMA%20DE%20COCO\\_2012.pdf](http://dev.pue.itesm.mx/sagarpa/nacionales/EXP_CNSP_PALMA%20DE%20COCO/PLAN%20RECTOR%20QUE%20CONTIENE%20PROGRAMA%20DE%20TRABAJO%202012/PR_CNSP_PALMA%20DE%20COCO_2012.pdf). Consultado: mayo, 2018.
15. Damar, S., Balaban, M.O. y Sims, C.A. (2009). Continuous dense-phase CO<sub>2</sub> processing of a coconut water beverage. *International Journal of Food Science & Technology*, 44, 666-673.
16. Del-Cañizo, P. (1991). Palmeras. *Ediciones Mundi-Prensa*, 132-138.
17. Demirci, A. y Panico, L. (2008). Pulsed ultraviolet light. *Food Science and Technology International*, 14, 443-446.
18. Desai, B. (2000). Handbook of Nutrition and Diet. *Marcel Dekker Inc.*, New York.
19. Domínguez, L. y Parzanese, M. (2015). Luz ultravioleta en la conservación de alimentos. *Secretaría de agricultura, ganadería y pesca de Argentina*. Disponible en: <http://copal.org.ar/wp-content/uploads/2015/06/luzultravioleta.pdf>. Consultado: mayo, 2018.
20. Emojevwe, V. (2013). *Cocos nucifera* (Coconut) Fruit: A review of its *Medical Properties*. *Advances in Agriculture, Sciences and Engineering Research*, 3 (3), 718-723.
21. FDA. (2001). Hazard Analysis and Critical Point (HACCP); Procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice; Final rule. Federal Register 66, 6137-6202.
22. Gabriel, A.A. (2015). Previous physicochemical stress exposures influence subsequent resistance of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, and

- Listeria monocytogenes* to ultraviolet-C in coconut liquid endosperm beverage. *Int. Journal of Food Microbiology*, 201, 7-16.
23. Gabriel, A.A. y Colambo, J.C.R. (2016). Comparative resistances of selected spilage and pahogenic bacteria in ultraviolet-C treated, turbulent-flowing young coconut liquid endosperm. *Food Control*, 69, 134-140.
  24. Gabriel, A. y Nakano, H. (2009). Inactivation of *Salmonella*, *E. coli* and *Listeria monocytogenes* in phosphate-buffered saline and apple juice by ultraviolet and heat treatments. *Food Control*, 20, 443-446.
  25. García, M., Ferrario, M. y Guerrero, S. (2017). Study of the inactivation some microorganisms in turbid carrot-orange juice bland processed by ultraviolet light assisted by mild heat treatment. *Journal of Food Enginerring*, 212, 213-225.
  26. Gautam, D., Umagiliyage, A.L., Dhital, R., Joshi, P., Watsn, D.G., Fisher, D.J. y Choudhary, R. (2017). Nonthermal pasteurization of tender coconut water using a continuous flow coiled UV reactor. *LWT-Food Science and Technology*, 83, 127-131.
  27. Ge, L., Yong, J., Go, N., Chia, L., Tan, S. y Ong, E. (2005). Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (*Cocos nucifera*, L.) water using a combined approach of liquid chromatography-tandem mass spectrometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 829, 26-34.
  28. Gill, A. y Holley, R. (2006). Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *Journal Food Microbiology*, 111, 170-174.
  29. Gould G. (1995). *New Methods in Food Preservation*. Black Academic and Professional, London.
  30. Gowder, S. (2014). Safety assessment of food flavor-cinnamaldehyde. *Biosafety*, 3, 147.
  31. Granados, D y López, G. (2002). Manejo de la palma de coco (*Cocos nucifera* L.) en México. *Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 8 (1), 39-46.
  32. Guerrero-Beltrán, J.A. y Barbosa-Cásanovas, G.V. (2005). Reduction of *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in Apple juice by ultraviolet light. *Journal of Food Process Engineering*, 28, 437-452.

33. Heldman, D. y Lund, B. (1992). Handbook of Food Engineering, *Marcel Dekker Inc.*, New York.
34. Hooth, M.J., Sills, R.C., Burka, L., Haseman, J.K., Witt, K.L., Orezech, D.P., Graves, S. y Bucher, J.R. (2004). Toxicology and carcinogenesis studies of microencapsulated *trans*-cinnamaldehyde in rats and mice. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 1757-1768.
35. Ibarz, A. y Barbosa, G.V. (2003). Unit Operations in Food Engineering. *CRC Press*, Boca Ratón, Florida, USA.
36. Jurado, R., Arenas, C., Doblas, A., Rivero, A. y Torres-Cisneros, J. (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. *Hospital de Alta Resolución Valle del Guadiato*, 10 (52), 3497.
37. Kalembe, D. y Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 813-829.
38. Khan, I., Nkufi, C., Miskeen, S., Lee, B. y Deog-Hwan, Oh. (2017). Hurdle technology: A novel approach for enhanced food quality and safety – A review. *Food Control*, 73, 1426-1444.
39. Landa, P., Hernández, A., Vargas, M., Eslava, C., Chaidez, C. y Patel, J. (2013). Persistencia de *Salmonella* Typhimurium en nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*). *Fitotecnica Mexicana*, 36 (2), 147-153.
40. Leistner, L y Gorris, M. (1994). Food Preservation by Combined Processing. *FLAIR Concerted*, 7, 4-15.
41. Li, R., Wang, Y., Zi-Tao, J. y Shan, J. (2010). Chemical composition of the essential oils of *Cinnamomum loureirii* Nees. From China obtained by hydrodistillation and microwave-assisted hydrodistillation. *Journal of Essential Oil Research*, 22, 129-131.
42. Manu, D., Mendonca, A.F., Daraba, A., Dickson, J., Sebranek, J., Shaw, A., Wang, F. y White, S. (2017). Antimicrobial Efficacy of Cinnamaldehyde Against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in Carrot Juice and Mixed Berry Juice Held at 4°C and 12°C. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14, 302-307.
43. Matsui, K., Gut, W., Victoriano de Oliveira, P. y Tadini, C. (2008). Inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in green coconut water by

- microwave processing. *Journal of Food Engineering*, 88, 169-176.
44. Máttar V., S. (2004). *Salmonella* un patógeno re-emergente. *Revista MVZ Córdoba*, 9 (2), 473.
  45. Neeha, V. y Subhash, B. (2014). Use of Hurdle Technology in Food Preservation. *International Journal of Engineering and Management Research*, 4 (5), 204-211.
  46. Norma Oficial Mexicana (2014). NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.
  47. Nurulain, T. (2006). Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cáncer and noncancer applications. *Life Sciences*, 78, 2073-2080.
  48. Ochoa-Velasco, C.E. y Guerrero-Beltrán J.Á. (2013). Short-wave ultraviolet-C light effect on pitaya (*Stenocereus griseus*) juice inoculated with *Zygosaccharomyces bailii*. *Journal of Food Engineering*, 117, 34-41.
  49. Ochoa-Velasco, C.E., Cruz-González, M. y Guerrero-Beltrán, J.A. (2014). Ultraviolet-C light inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium in coconut (*Cocos nucifera* L.) milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 26, 199-204.
  50. Ochoa-Velasco, C.E., Díaz-Lima, M.C., Ávila-Sosa, R., Ruiz-López, I.I., Corona-Jiménez, E., Hernández-Carranza, P., López-Malo, A. y Guerrero-Beltrán, J.A. (2017). Effect of UV-C light on *Lactobacillus rhamnosus*, *Salmonella* Typhimurium, and *Saccharomyces cerevisiae* kinetics in inoculated coconut water: Survival and residual effect, *Journal of Food Engineering*, 1-7.
  51. Pachuau Z. y Tiwari, R. (2008). Ultraviolet light- its effects and applications. *Science Vision*, 8 (4), 128-136.
  52. Parra, M., Durango, J. y Máttar, S. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *Revista MVZ Córdoba*, 7 (2), 187-200.
  53. Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G. y Mauriello, G. (2006). Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2745-2749.

54. Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D. y Mauriello, G. (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4863-4870.
55. Patil, S., Bourke, P., Frias, J.M., Tiwari, B.K. y Cullen, P.J. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* in orange juice using ozone. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 551-557
56. Pérez, L.V.M. (2006). Sistema de desinfección de alimentos mediante luz ultravioleta. *Universidad de Alicante*. Disponible en: <http://sgitt-otri.ua.es/es/empresa/documentos/ot-1406-desinfeccion-uv.pdf>. Consultado: mayo, 2018.
57. Podolak, R., Enache, E., Stone, W., Black, D. y Elliott, P. (2010). Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods. *Journal of Food Protection*, 73, 1919-1936.
58. Pombo, M. (2009). Irradiación de frutillas con UV-C: efecto sobre la síntesis de proteínas, degradación de la pared celular y mecanismos de defensa. San Martín: Universidad Nacional de San Martín, Laboratorio de Bioquímica y Fisiología de la Maduración y Senescencia, 120.
59. Prades, A., Dornier, M., Diop, N. y Pain, J.P. (2012). Coconut water preservation and processing: a review. *EDP Sciences*, 67 (3), 157-171.
60. Prokopov, T. y Tanchev, S. (2007). Methods of Food Preservation. *ResearchGate*, 3, 3-24.
61. Qing-Yi, W., Jia-Jun X., Hong, J., Chao, Z. y Wen, Y. (2011). The antimicrobial activities of the cinnamaldehyde adducts with amino acids. *International Journal of Food Microbiology*, 150, 164-170.
62. Quek, P.H. y Hu, J.Y. (2008). Indicators for photoreactivation and dark repair studies following ultraviolet disinfection. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, 533-541.
63. Raybaudi-Massilia, R.M., Soliva, R. y Martín, O. (2006). Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas. *Aseguramiento de la calidad microbiológica*. CIAS, Hermosillo, Sonora, México, 15-21.

64. Ray, B. (2000). *Fundamental Food Microbiology*. Segunda Edición. CRC Press, London.
65. Ríos, D. (2010). Riesgos biológicos y subproductos de la desinfección en el agua de bebida. *Obras sanitarias del estado*. República Oriental del Uruguay. Disponible en: <http://www.elaguapotable.com/Riesgos%20bioilgicos%20y%20subproductos%20de%20la%20desinfecci%C3%B3n.pdf>. Consultado: mayo, 2016.
66. Rivera-Pastrana, D., Gardea-Béjar, A., Martínez-Téllez, M., Rivera-Domínguez, M y González-Aguilar, G. (2007). Efectos bioquímicos postcosecha de la irradiación UV-C en frutas y hortalizas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30 (4), 361-372.
67. Riveros, M. y Ochoa, T. (2015). Enteropatógenos de importancia en salud pública. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32 (1), 157-164.
68. Rooney, M. (1995). *Active Food Packaging*. Blackie Academic and Professional, London.
69. Rodríguez-Cavallini E., Camboa-Coronado M., Hernández-Chavarría F. y García-Hidalgo, J. (2003). Sección IV, Cultivo de bacterias. En bacteriología general: Principios y Prácticas de Laboratorio, 1-477. Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
70. Sastry, S.K., Datta A.K. y Woroboo R.W. (2000). Ultraviolet light. *Journal Food Science*, 65, 90- 92.
71. Shapton, D. y Shapton, N. (1991). Principles and Practices for the Safety Processing of Foods. *Butterworth*, London.
72. Sheikh, S., Waseem, A., Behbehani, J., Raja, V., Irshad, M., Karched, M., Ali, I., Siddiqi, W. y Ting, L. (2016). Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia*, 112, 116-131.
73. Solsona, F y Méndez, J. (2002). Desinfección del agua. *CEPIS*, Lima, Perú, 77-91.
74. Suárez, R. (2001). Conservación de alimentos por irradiación. *Universidad del centro educativo latinoamericano*. Disponible en: <file:///C:/Users/Samsung/Downloads/Dialnet-ConservacionDeAlimentosPorIrradiacion-3330300.pdf>. Consultado: mayo, 2018.
75. Sylvia, U., Ellen, L., Sandra, W., Rinaldhi, I., Triana, H. y Cees, V. (2015). Effect of *Cinnamomum burmannii* Nees ex Bl. and *Massoia aromatica* Becc. essential oils on planktonic growth and biofilm information of *Pseudomonas aeruginosa* and

- Staphylococcus aureus in vitro. International Journal of Applied Research in Natural Products*, 8, 1-13.
76. Tajkarimi, M. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21, 1199-1218.
77. Tapia de Daza, M., Alzamora, S. y Chanees, J. (1996). Combination of Preservation Factors Applied to Minimal Processing of Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 629-659.
78. Walter, E., Nascimiento, M. y Kuaye, A. (2009). Efficacy of sodium hypochlorite and peracetic acid in sanitizing Green coconuts. *Letters in Applied Microbiology*, 49, 366-371.
79. Wendakoon, C. y Morihiko, S. (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection*, 58, 280-283.
80. Wong, Y., Ahmad-Mudzaqqir, M. y Wan-Nu, W. (2014). Extraction of essential oil from cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*). *Oriental Journal of Chemistry*, 30, 37-47.
81. Yossa, N., Patel, J., Millner, P., Ravishankar, S. y Lo, Y. (2013). Antimicrobial activity of plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on lettuce. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10, 87-96.
82. Zilberberg, M., Shorr, A. y Kollef, M. (2008). Secular trends in candidemia-related hospitalization in the United States. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 29, 978-980.
83. Zhou, F., Ji, B., Zhang, H., Jiang, H., Yang, Z., Li, J. y Yan, W. (2007). The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Food Safety*, 27, 124-133.

## 11 ANEXOS

Boleta de evaluación sensorial.

**A continuación, se presentan 4 muestras de agua de coco, indicar el grado de aceptación general de cada una de ellas.**

CALIFICACIÓN	9603	7520	0131	3412
9				
8				
7				
6				
5				
4				
3				
2				
1				

Comentarios: