

## Universidad Católica de Santa María

### Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



**EVALUACIÓN *in vitro* DE RECUBRIMIENTOS A BASE DE QUITOSANO ADICIONADOS CON COMPUESTOS NATURALES COMO CERA DE ABEJA Y ÁCIDO OLEICO SOBRE BACTERIAS PATÓGENAS COMO: *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* O157-H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* Y *Shigella flexneri* RESPONSABLES DE ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA**

**Tesis presentada por la Bachiller:**

**Rossell Chávez, Jazmine Julia**

**para optar el Título Profesional de:**

**Ingeniero Biotecnólogo**

**Asesor:**

**Dra. Jave Márquez, Jesús Mercedes**

**Asesor externo:**

**Dra. Ramos García, Margarita de Lorena**

AREQUIPA – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA  
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas  
y Biotecnológicas  
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N° 20190000013318

N° Trámite en Fac. 428-2019  
Fecha Recep. Fac. 04-04-2019

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **ROSSELL CHAVEZ, Jazmine Julia**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

**“EVALUACION in vitro DE RECUBRIMIENTOS A BASE DE QUITOSANO SOBRE BACTERIAS PATOGENAS RESPONSABLES DE ENFERMEDADES DE TRANSMISION ALIMENTARIA COMO: E. coli DH5a, E. coli O157-H7, Listeria monocytogenes, Salmonella enteritidis y Shigella flexneri”**

DICTAMINADORES: **Ing. Eugenia Zeballos de Zenteno**      2) **Mgter. Jose Carpio Carpio**

**DICTAMEN DE PLAN:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: **“EVALUACION in vitro DE RECUBRIMIENTOS A BASE DE QUITOSANO SOBRE BACTERIAS PATOGENAS COMO: E. coli DH5a, E. coli O157-H7, Listeria monocytogenes, Salmonella enteritidis Y Shigella flexneri RESPONSABLES DE ENFERMEDADES DE TRANSMISION ALIMENTARIA”**, después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMAS: *Eugenia de Zenteno*      *José Carpio*

FECHA 12/04/2019

ASESOR: **Q. F. Mercedes Jave Márquez**

**DICTAMEN ASESORÍA:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que se ha verificado el cumplimiento de los objetivos y redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes por lo cual considero que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

FIRMA

*M. Jave*  
cod 1426

FECHA 16/04/2019

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Ing. Eugenia Zeballos Delgado**
- 2) **Mgter. José Carpio Carpio**

3) **Dra. Milagro Teran Dianderas**

**DICTAMEN FINAL:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis sugiriendo se cambie el título a: **“EVALUACION in vitro DE RECUBRIMIENTOS A BASE DE QUITOSANO ADICIONADOS CON COMPUESTOS NATURALES COMO CERA DE ABEJA Y ACIDO OLEICO SOBRE BACTERIAS PATOGENAS COMO: E. coli DH5a, E. coli O157-H7, Listeria monocytogenes, Salmonella enteritidis Y Shigella flexneri RESPONSABLES DE ENFERMEDADES DE TRANSMISION ALIMENTARIA”** y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, por lo que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA

*Eugenia de Zenteno*      *Milagro Teran*      *José Carpio*

FECHA 13/05/2019

JURADOS: PRESIDENTE  
VOCAL  
SECRETARIO

**ING. EUGENIA ZEBALLOS DELGADO**  
**DRA. MILAGRO TERAN DIANDERAS**  
**MAG. JOSE CARPIO CARRIO**

FECHA 3/6/19

HORA 19.00

LOCAL

FIRMA DEL DECANO

*[Firma del Decano]*

FECHA



## DEDICATORIA

*El presente trabajo está dedicado a mi abuelita Petita, quien con amor y cariño estuvo a mi lado todos estos años dándome lecciones de vida y procurando siempre ser acertada en sus palabras; quien día tras día me hacía presente el seguir estudiando para convertirme en una gran profesional y retribuir a mis padres todo su esfuerzo. Por su entrega a cuidarme sin excusas y por las sonrisas causadas en mí, por eso y muchas cosas más sólo me queda decirte: GRACIAS MAMITA.*

*En memoria de Fermín Colque Lajo, quien ha sido el ángel de mi familia por muchos años y a quien le hemos rezado con amor ante las situaciones difíciles que nos ha tocado vivir. Porque su recuerdo siempre esté presente en nuestras vidas y respalde nuestro camino.*

*Por el recuerdo de quien en vida fue Vicente Chávez Lizarraga, por que tu pronta partida nos dejó un gran vacío y un dolor incalculable, cuidanos y protégenos siempre.*

## AGRADECIMIENTOS

*Primeramente quiero agradecer a Dios, por las infinitas noches que le rece y a quien muchas veces cuestioné por las cosas que sucedían pero que sin duda me ha dado los mejores regalos de la vida al permitirme abrir los ojos cada día y poder contemplar a mi familia.*

*A la motivación más grande que tengo y quién me ha enseñado a ser adulto para poder sostener sus pasos y darle todo el amor del mundo, a mi pequeño Diego.*

*A mis padres: Angélica y Roberto, porque cada uno desde su rol ha hecho esfuerzos invalorables por proporcionarme educación, quienes me han inculcado valores y me han dado las lecciones más importantes de la vida hasta permitirme abrir las alas y explorar nuevas cosas.*

*A mis hermanos: Lindsay y Ralf, porque a pesar de las rencillas siempre están ahí a mi lado y me han demostrado, cada uno a su manera, su cariño.*

*A mi tía Esther y mis primos: Giuliana, Miguel y Nicolás, por estar muy pendientes de mí, por escucharme y aconsejarme ante los retos de la vida. Por ser como mis segundos hermanos y ser ejemplos de lucha y esfuerzo por salir adelante a pesar de las adversidades.*

*A mi querido colegio Padre Damián SS.CC por la formación secundaria adquirida y los docentes que se ganaron mi cariño y respeto con su seguimiento y amor hacia mí persona.*

*A mi alma máter Universidad Católica Santa María y mi Escuela Profesional Ingeniería Biotecnológica, quienes me permitieron adquirir los conocimientos necesarios para salir al mundo laboral y convertirme en un profesional.*

*Al Voluntariado de Santa María y la Comunidad del Emmanuel, por hacer crecer mi fe y mi capacidad de servir, aventurándome a vivir experiencias únicas y teniendo como mayor mensaje: “Quien no vive para servir, no sirve para vivir”.*

*A los amigos que nunca me abandonaron y quienes estuvieron siempre conmigo en las buenas y malas, dándome ánimos y fuerzas para no rendirme: Melanie, Cynthia, Charlie, Felipe, Derly, Andrea, Juan, Yessica, Karla, Carlos y Erick.*

*A la Ing. Joshelyn Paredes por su amistad y cariño, y a la Dra. Jave por haber aceptado ser asesora de esta tesis, ambas me han proporcionado conocimientos y lecciones que nunca pensé recibir.*

*Al Dr. Jesús Hernández y la Dra. Margarita Ramos García, por la confianza depositada en mí y el acompañamiento durante mi estadía en México, por ser grandes participes de este proyecto.*

*... y a todos aquellos que llegaron a mi vida para enseñarme cosas y dejaron gratos recuerdos en mi vida, a todos ustedes, les estoy eternamente agradecida.*

## INDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	iii
<b>OBJETIVOS</b> .....	v
<b>HIPÓTESIS</b> .....	vi
<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	1
<b>1. INOCUIDAD ALIMENTARIA</b> .....	1
1.1 DEFINICIÓN.....	1
1.2 INICIATIVA MUNDIAL DE SEGURIDAD ALIMENTARIA.....	1
<b>2. BACTERIAS PATÓGENAS</b> .....	2
2.1 DEFINICIÓN.....	2
2.2 PROBLEMÁTICA DE LAS BACTERIAS PATÓGENAS EN SALUD...2	
2.3 BACTERIAS PATÓGENAS RESPONSABLES DE ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA.....	4
2.3.1 <i>Escherichia coli</i> patogénica.....	5
2.3.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	9
2.3.3 <i>Salmonella enteritidis</i> .....	12
2.3.4 <i>Shigella flexneri</i> .....	15
2.4 FUENTES FRECUENTES DE CONTAMINACIÓN EN ALIMENTOS POR BACTERIAS PATÓGENAS.....	18
<b>3. MÉTODOS DE CONTROL DE BACTERIAS PATÓGENAS,     EFECTIVIDAD Y DESVENTAJAS</b> .....	20
3.1 CONTROL QUÍMICO.....	20
3.1.1 CLORO.....	21
3.1.2 OZONO Y AGUA OZONIZADA.....	21
3.1.3 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	23
3.1.4 ÁCIDO PEROXIACÉTICO.....	23
3.1.5 PLAGUICIDAS Y AGENTESANTIMICROBIANOS.....	24
3.2 CONTROL BIOLÓGICO.....	25
3.3 COMPUESTOS BIODEGRADABLES COMO ALTERNATIVAS NATURALES DE CONTROL.....	26



3.3.1	QUITOSANO .....	26
3.3.2	CERA DE ABEJA .....	30
3.3.3	ÁCIDO OLEICO .....	30
3.3.4	ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN .....	31
<b>4.</b>	<b>RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES.....</b>	<b>33</b>
4.1	DEFINICIÓN .....	34
4.2	TIPOS DE RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES .....	35
4.2.1	PROTEÍNAS.....	35
4.2.2	LÍPIDOS .....	36
4.2.3	POLISACÁRIDOS .....	37
4.3	BENEFICIOS DE SU APLICACIÓN.....	38
<b>CAPÍTULO II.....</b>		<b>39</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>		<b>39</b>
<b>1.</b>	<b>MATERIALES .....</b>	<b>39</b>
1.1	INSUMOS .....	39
1.2	MATERIALES DE LABORATORIO .....	39
1.3	MATERIAL DE VIDRIO .....	40
1.4	MATERIAL BIOLÓGICO.....	40
1.5	MEDIOS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO .....	40
1.6	EQUIPOS DE LABORATORIO .....	40
1.7	OTROS MATERIALES .....	41
<b>2.</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
2.1	DETERMINACIÓN DE LA DILUCIÓN IDEAL BACTERIANA .....	41
2.1.1	PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO .....	41
2.1.1.1	AGAR NUTRITIVO .....	41
2.1.1.2	CALDO NUTRITIVO.....	41
2.1.2	OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	42
2.1.3	ACTIVACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS .....	42
2.1.4	METODOLOGÍA DE DILUCIONES SERIADAS.....	42
2.2	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS RECUBRIMIENTOS A BASE DE QUITOSANO CON LA ADICIÓN DE COMPUESTOS NATURALES .....	43
2.2.1	PREPARACIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS.....	43
2.2.2	DISTRIBUCIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS .....	44

2.2.3 EVALUACIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS .....	45
2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDIANTE EL PROGRAMA MINITAB ....	46
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>47</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
3.1 DETERMINACIÓN DE LA DILUCIÓN IDEAL BACTERIANA.....	47
3.2 EVALUACIÓN <i>in vitro</i> DEL EFECTO DE LOS RECUBRIMIENTOS A BASE DE QUITOSANO CON LA ADICIÓN DE COMPUESTOS NATURALES .....	48
3.2.1 <i>Escherichia coli</i> O157-H7 .....	48
3.2.2 <i>Escherichia coli</i> DH5a.....	49
3.2.3 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	49
3.2.4 <i>Salmonella enteritidis</i> .....	50
3.2.5 <i>Shigella flexneri</i> .....	50
3.3 EVALUACIÓN DE AMBAS FORMULACIONES A TRAVÉS DEL PROGRAMA MINITAB.....	51
<b>4. DISCUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>84</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Comparación de la Membrana y Pared Celular de las Bacterias Gram Negativas y Gram Positivas.....	3
<b>Figura 2.</b> Organismos más comunes asociados con brotes, enfermedades, hospitalizaciones y muertes por ETAs (confirmadas y sospechosas), 2009 y 2015 .....	5
<b>Figura 3.</b> Descripción general de los reservorios potenciales y modos de transmisión de <i>Escherichia coli</i> patogénica.....	6
<b>Figura 4.</b> Modelo de colonización de STEC al infectar humanos.....	8
<b>Figura 5.</b> Posibles rutas de transferencia y circulación de <i>Listeria monocytogenes</i> en el entorno de la granja y factores que pueden afectar su supervivencia en el suelo .....	11
<b>Figura 6.</b> Principales pasos de la patogénesis de <i>Salmonella</i> con participación en el desarrollo de la restricción y adaptación del huésped .....	12
<b>Figura 7.</b> Aislamientos de <i>Salmonella</i> más comunes de fuentes humanas (1996 - 2002) 13	
<b>Figura 8.</b> El proceso de invasión de <i>Shigella</i> en las células intestinales.....	15
<b>Figura 9.</b> Contribución relativa de las especies de <i>Shigella</i> que causan ETAs.....	17
<b>Figura 10.</b> Número anual y tasa de incidencia de casos confirmados de shigelosis en Europa, 2006 – 2009.....	18
<b>Figura 11.</b> Representación esquemática de las posibles rutas de contaminación de fuentes contaminadas en las primeras etapas de la cadena alimentaria.....	20
<b>Figura 12.</b> Componentes básicos del proceso de ozonización .....	22
<b>Figura 13.</b> Introducción de los plaguicidas a la cadena alimentaria .....	24
<b>Figura 14.</b> Mecanismo de acción de las toxinas <i>Cry</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	25
<b>Figura 15.</b> Estructuras químicas de quitina y quitosano .....	27



<b>Figura 16.</b> Representación esquemática de los efectos antimicrobianos del quitosano.....	28
<b>Figura 17.</b> Representación esquemática del mecanismo de acción del quitosano sobre bacterias Gram Negativas y Gram Positivas .....	
<b>Figura 18.</b> Representación esquemática de los mecanismos detrás de la actividad antibacteriana de los ácidos grasos y los monoglicéridos .....	31
<b>Figura 19.</b> Mecanismo antimicrobiano de los aceites esenciales en microorganismos .....	32
<b>Figura 20.</b> Principales funciones de los recubrimientos comestibles.....	34
<b>Figura 21.</b> Composición de los recubrimientos comestibles.....	35
<b>Figura 22.</b> Recuento en placa y diluciones seriadas.....	43
<b>Figura 23.</b> Distribución de los recubrimientos sobre las placas de Agar Nutritivo.....	45
<b>Figura 24.</b> Patrón del proceso de evaluación de los recubrimientos a base de quitosano sobre cada una de las BP de importancia en inocuidad alimentaria.....	45
<b>Figura 25.</b> Proceso experimental para la evaluación de los recubrimientos .....	46
<b>Figura 26.</b> Placas con medio nutritivo después de 24 horas de incubación en la dilución .....	48
<b>Figura 27.</b> Diferencias significativas de todas las BP a $10^{-4}$ por 24 horas de incubación mediante Tukey (IC 95%) .....	51
<b>Figura 28.</b> Diferencias significativas de todas las BP a $10^{-5}$ por 24 horas de incubación mediante Tukey (IC 95%) .....	52
<b>Figura 29.</b> Evaluación del recubrimiento F1 sobre <i>E. coli</i> O157-H7 a ambos tiempos de incubación.....	87
<b>Figura 30.</b> Evaluación del recubrimiento F2 sobre <i>E. coli</i> O157-H7 a ambos tiempos de incubación.....	88
<b>Figura 31.</b> Evaluación del recubrimiento F1 sobre <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ a ambos tiempos de incubación.....	89
<b>Figura 32.</b> Evaluación del recubrimiento F2 sobre <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ a ambos tiempos de	

incubación.....90

**Figura 33.** Evaluación del recubrimiento F1 sobre *L. monocytogenes* a ambos ti  
de incubación .....

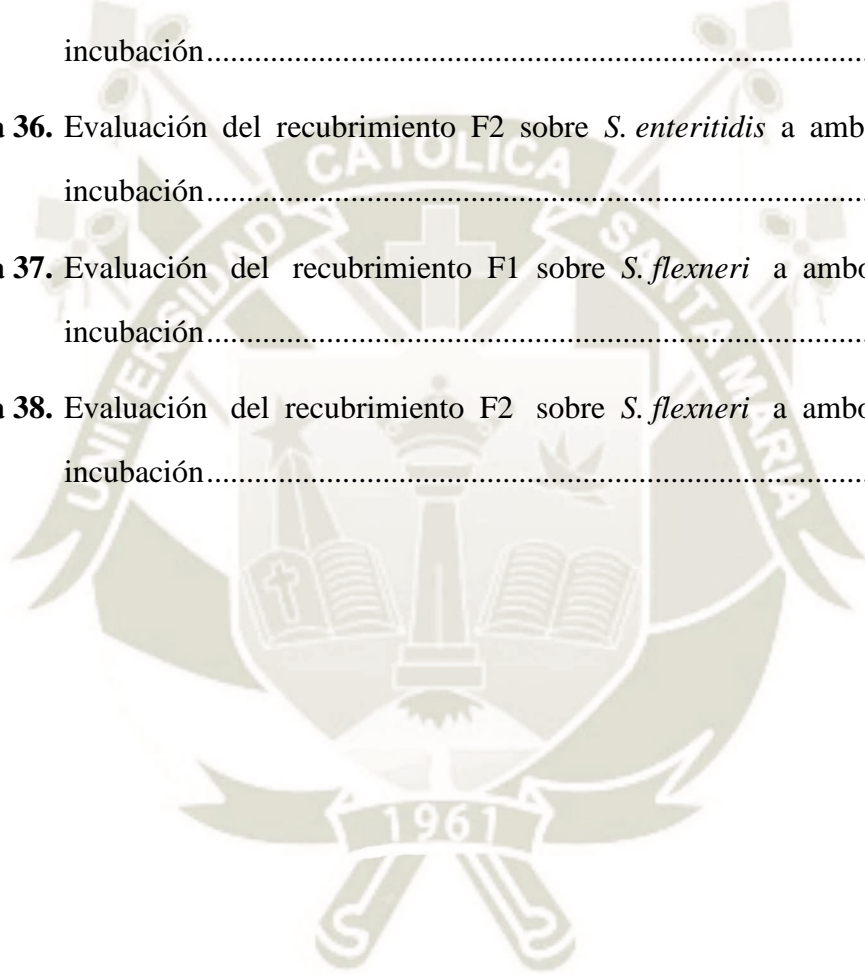
**Figura 34.** Evaluación del recubrimiento F2 sobre *L. monocytogenes* a ambos tiempos  
de incubación .....92

**Figura 35.** Evaluación del recubrimiento F1 sobre *S. enteritidis* a ambos tiempos de  
incubación.....93

**Figura 36.** Evaluación del recubrimiento F2 sobre *S. enteritidis* a ambos tiempos de  
incubación.....94

**Figura 37.** Evaluación del recubrimiento F1 sobre *S. flexneri* a ambos tiempos de  
incubación.....95

**Figura 38.** Evaluación del recubrimiento F2 sobre *S. flexneri* a ambos tiempos de  
incubación.....96

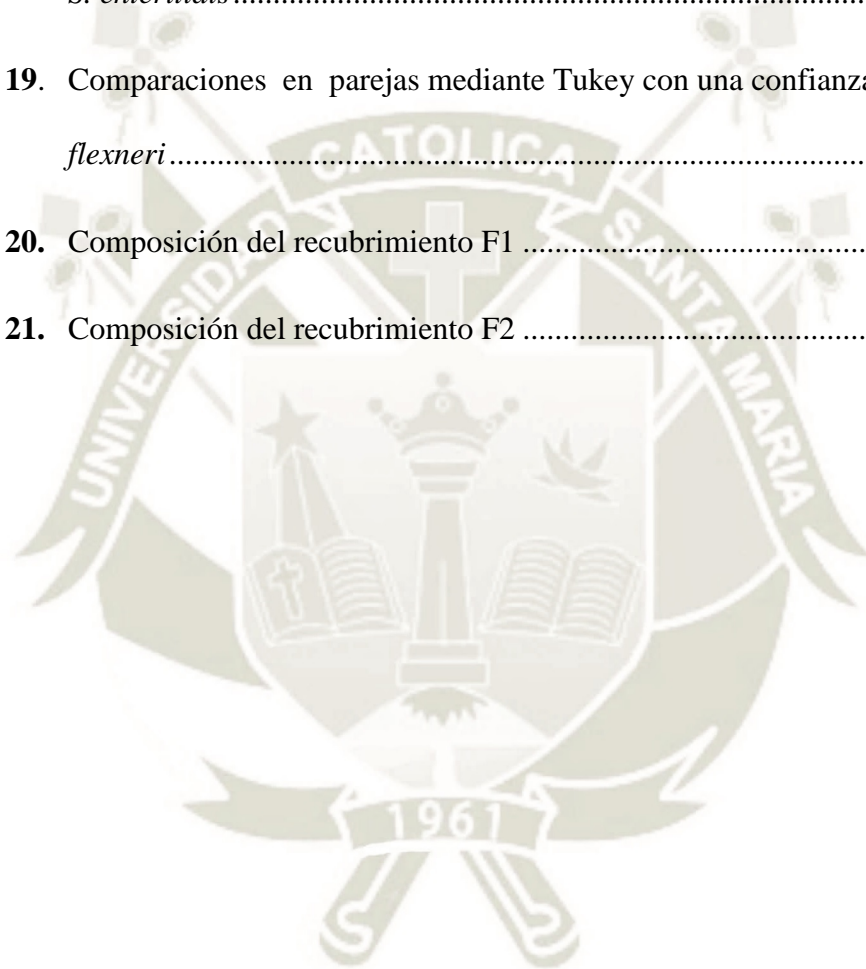




## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Factores que agravan o aumentan el riesgo de infección por ETAs en sectores vulnerables.....	4
<b>Tabla 2.</b>	Características de los grupos de <i>Escherichia coli</i> causantes de diarrea .....	7
<b>Tabla 3.</b>	Factores que determinan la patogenicidad de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	10
<b>Tabla 4.</b>	Factores que determinan la virulencia del género <i>Salmonella</i> .....	14
<b>Tabla 5.</b>	Características de las especies de <i>Shigella</i> .....	16
<b>Tabla 6.</b>	Brotos de bacterias patógenas detectadas en frutas y vegetales .....	19
<b>Tabla 7.</b>	Comparación de la resistencia de diferentes microorganismos a la inactivación con ozono.....	22
<b>Tabla 8.</b>	Efectos del quitosano y otros compuestos naturales sobre BP de importancia en inocuidad alimentaria.....	29
<b>Tabla 9.</b>	Principales compuestos solubles en agua e insolubles en agua presentes en el aceite esencial de cítrico .....	33
<b>Tabla 10.</b>	Algunos recubrimientos a base de proteínas para diferentes productos alimenticios con funciones significativas .....	36
<b>Tabla 11.</b>	Algunos recubrimientos a base de lípidos para diferentes productos alimenticios con funciones significativas.....	36
<b>Tabla 12.</b>	Algunos recubrimientos a base de polisacáridos para diferentes productos alimenticios con funciones significativas .....	37
<b>Tabla 13.</b>	Formulaciones preparadas para la evaluación de las bacterias patógenas de inocuidad alimentaria.....	44
<b>Tabla 14.</b>	UFC de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ obtenidas por metodología de diluciones seriadas.....	48
<b>Tabla 15.</b>	Comparaciones en parejas mediante Tukey con una confianza del 95% para <i>E. coli</i> O157-H7 .....	49

<b>Tabla 16.</b> Comparaciones en parejas mediante Tukey con una confianza del 95% para <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	49
<b>Tabla 17.</b> Comparaciones en parejas mediante Tukey con una confianza del 95% para <i>L. monocytogenes</i> .....	50
<b>Tabla 18.</b> Comparaciones en parejas mediante Tukey con una confianza del 95% para <i>S. enteritidis</i> .....	50
<b>Tabla 19.</b> Comparaciones en parejas mediante Tukey con una confianza del 95% para <i>S. flexneri</i> .....	51
<b>Tabla 20.</b> Composición del recubrimiento F1 .....	97
<b>Tabla 21.</b> Composición del recubrimiento F2 .....	97





## LISTA DE ABREVIATURAS

- APC:** Célula presentadora de antígeno
- AOEV:** Aceite de Oliva Extra Virgen
- BFP:** Pili con forma rizada
- BP:** Bacterias Patógenas
- CFA:** Factor de colonización antigénico
- C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>:** Etileno
- CH<sub>4</sub>:** Metano
- CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono
- DAEC:** *E. coli* adherencia difusa
- EAEC:** *E. coli* enteroagregativa
- EAF:** Factor de adherencia de EPEC
- EAST:** Toxina ST en cepas enteroagregativas
- EHEC:** *E. coli* enterohemorrágica
- EIEC:** *E. coli* enteroinvasiva
- EMC:** Matriz Extracelular
- EPEC:** *E. coli* enteropatógena
- ETAs:** Enfermedades de Trasmisión Alimentaria
- ETEC:** *E. coli* enterotoxigénica
- GRAS:** Generalmente reconocido como seguro
- H<sub>2</sub>O:** Agua
- IC:** Intervalo de Confianza
- LAP:** Proteínas de adhesión

**LT:** Toxina termolábil

**N<sub>2</sub>:** Nitrógeno

**O<sub>2</sub>:** Oxígeno

**OMP:** Proteína de membrana externa

**PMN:** Leucocitos polimorfonucleares

**PGPR:** Polirricinoleato de poliglicerol

**RC:** Recubrimientos comestibles

**RES:** Sistema Reticuloendotelial

**SA:** Seguridad Alimentaria

**ST:** Toxina termoestable

**STEC:** *E. coli* toxigénica Shiga

**STX:** Toxina Shiga

**SUH:** Síndrome Urémico Hemolítico

**TAT:** Twin Arginine Translocation

**Tir:** Receptor translocador de intimina

**UFC:** Unidades Formadoras de Colonia



## RESUMEN

El exceso de concentraciones tolerables de bacterias en seres humanos ha provocado el aumento de brotes, enfermedades, hospitalizaciones y muertes por enfermedades de transmisión alimentaria; observándose como foco de infección productos primarios como frutas y verduras. Por ello, el presente trabajo pretende, evaluar *in vitro* recubrimientos comestibles a base de quitosano con ayuda de la sinergia con otros compuestos naturales como cera de abeja y ácido oleico sobre cinco diferentes bacterias patógenas: *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* O157-H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella flexneri*. Primero se determinó la dilución ideal de las bacterias donde  $10^{-5}$  fue escogida por estar dentro del rango permitido además de  $10^{-4}$  por mostrar una cantidad de UFC muy similar a la dosis mínima de infección de una de las cepas. Después de formular los dos recubrimientos, uno con la adición de cera de abeja y otro con ácido oleico, se procedió a la evaluación *in vitro*. Tras la evaluación estadística con un IC del 95% en el programa MiniTab se determinó que la formulación 1 mostró mayores diferencias significativas con *Listeria monocytogenes* al presentar UFC = 0.00 a 24 horas de incubación mientras que la formulación 2 presenta mayor inhibición del crecimiento bacteriano en *Shigella flexneri* al mantener las UFC = 0.00 por 48 horas de incubación. La bacteria que establece diferencias significativas con ambas formulaciones es *E. coli* DH5 $\alpha$  sugiriendo sólo el poder bacteriostático al presentarse el crecimiento de ciertas colonias a las 48 horas de incubación, estos resultados evidencian la acción positiva del sinergismo de compuestos naturales en recubrimientos comestibles al darse de manera exitosa el retraso de crecimiento de bacterias patógenas, especialmente en aquellas poco estudiadas pero con reportes preocupantes de ETAs.

**PALABRAS CLAVE:** recubrimiento comestible, enfermedades de transmisión alimentaria, quitosano, aceite esencial de limón, cera de abeja, ácido oleico

## ABSTRACT

The excess of tolerable concentrations of bacteria in humans has caused an increase in outbreaks, illnesses, hospitalizations and deaths due to foodborne diseases; it is observed as a source of infection primary products such as fruits and vegetables. Therefore, the present work aims to evaluate *in vitro* edible coatings based on chitosan with the help of synergy with other natural compounds such as beeswax and oleic acid on five different pathogenic bacteria: *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* O157-H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Shigella flexneri*. First was determined the ideal dilution of the bacteria where  $10^{-5}$  was chosen for being within the allowed range in addition to  $10^{-4}$  for showing an amount of CFU very similar to the minimum dose of infection of one of the strains. After formulating the two coatings, one with the addition of beeswax and another with oleic acid, the *in vitro* evaluation. After the statistical evaluation with a CI 95% in the MiniTab program, determined that formulation 1 showed greater significant differences with *Listeria monocytogenes* when presenting CFU = 0.00 at 24 hours of incubation while formulation 2 shows greater inhibition of bacterial growth in *Shigella flexneri* by maintaining the CFU = 0.00 for 48 hours of incubation. The bacterium that establishes significant differences with both formulations is *E. coli* DH5 $\alpha$  suggesting only the bacteriostatic power when the growth of certain colonies appears after 24 hours of incubation, these results show the positive action of the synergism of natural compounds in edible coatings in a successful manner, the delay of growth of pathogenic bacteria, especially in those little studied but with worrying reports of ETAs.

**KEY WORDS:** edible coating, foodborne diseases, chitosan, lemon essential oil, beeswax, oleic acid



## INTRODUCCIÓN

La población urbana calculada durante los últimos 30 años, tanto en América Latina como el Caribe, se incrementó de 61 a 391 millones de personas <sup>(1)</sup>. Este incremento de la población exige una agricultura sustentable, maximizando las cosechas a nivel mundial para aumentar la producción de alimentos <sup>(2)</sup>. Es importante mencionar que los alimentos deben ser considerados inocuos y nutritivos para garantizar la seguridad alimentaria. <sup>(3)</sup>

La seguridad alimentaria (SA) es el acceso físico y económico suficiente para alimentos inocuos y nutritivos, con el fin de satisfacer una necesidad básica como la alimentación <sup>(4)</sup>. El concepto de SA ha ido evolucionando con el tiempo, ya que en los años 70 se identificaba con un manejo de stocks y existencia de alimentos; sin embargo, para los años 80, el concepto se enfocó a la autosuficiencia pensando que un país tenía SA cuando podía producir todo lo que consumía. Ya para los años 90, se asume que el problema radica en la baja disponibilidad de los alimentos y el acceso a los mismos, así como la obtención de alimentos seguros para el consumidor <sup>(5)</sup>. Para la mayoría de las agencias y los gobiernos, la seguridad se ve desde una perspectiva cuantitativa, enfocándose en el aumento de la producción, dejando a un lado la calidad e inocuidad del alimento <sup>(6)</sup>.

Esto ha ocasionado el incremento de enfermedades de transmisión alimentaria, las cuales son la consecuencia del contacto de alimentos con factores biológicos, en su mayoría bacterias del género *E. coli*, *Listeria spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, que sobrepasan los niveles tolerables de ingesta <sup>(7)</sup> y que han derivado en un problema de salud pública que abarca cifras de 25 000 millones de fallecimientos de niños menores de 5 años, una incidencia de listeriosis de 0.2 a 0.8 por cada 1000 partos en mujeres embarazadas además de 13 de 29 muertes por infección en adultos mayores, las cuales engloban junto con cifras de poblaciones no vulnerables un total de 600 millones de personas víctimas de ETAs cada año a nivel mundial <sup>(3) (8) (9)</sup>. Uno de los vectores más

comunes de infección, reportado en los últimos años con mayor frecuencia, ha sido ligado a la producción de alimentos especialmente aquellos considerados frescos como frutas, vegetales y/o hortalizas <sup>(10) (11) (12)</sup>; llevando a la industria a generar un sistema integrado de control donde se pueda prever la infección por patógenos de importancia en inocuidad alimentaria descritos en esta investigación.

El control químico, conformado por diferentes compuestos de la misma naturaleza, ha sido el más utilizado para este combate <sup>(13)</sup>, sin embargo, los subproductos que pueden formar al liberarse al ambiente, la producción de radicales libres, su dosis mínima, así como su tecnología costosa en algunos casos, han llevado la orientación hacia el control biológico; en donde se ha desplazado el uso de otros microorganismos ya que su aplicación a escala sigue siendo limitado <sup>(14)</sup>, poniendo interés en la sinergia entre compuestos naturales que permitan mantener las características organolépticas como fisicoquímicas del producto además de contar con propiedades antimicrobianas <sup>(15) (16)</sup> que permitan la reducción o eliminación de aquellas bacterias patógenas más riesgosas, proponiendo a los recubrimientos comestibles como polímeros biodegradables para la industria alimentaria <sup>(17)</sup>.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar *in vitro* dos formulaciones de recubrimientos a base de quitosano y aceite esencial de limón adicionados con compuestos naturales como cera de abeja y ácido oleico sobre *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* O157-H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* Y *Shigella flexneri*; bacterias patógenas responsables de enfermedades de transmisión alimentaria <sup>(17) (18)</sup>.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Evaluar *in vitro* recubrimientos a base de quitosano adicionados con compuestos naturales como cera de abeja y ácido oleico sobre bacterias patógenas como: *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* O157-H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella flexneri* responsables de enfermedades de transmisión alimentaria.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la dilución ideal bacteriana para la evaluación de los recubrimientos mediante la metodología de diluciones seriadas
- Evaluar el efecto *in vitro* de recubrimientos a base de quitosano con la adición de compuestos naturales como cera de abeja (F1) y ácido oleico (F2) sobre la reducción o inhibición de las UFC de *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* O157-H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella flexneri*.
- Comparar el efecto *in vitro* de los recubrimientos a base de quitosano con la adición de compuestos naturales como cera de abeja y ácido oleico sobre la reducción o inhibición de las UFC de *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* O157-H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella flexneri* través del programa estadístico MiniTab.



## HIPÓTESIS

Dado que los recubrimientos a base de quitosano han sido reportados como agentes antimicrobianos, es posible que, la adición de compuestos naturales como cera de abeja y ácido oleico inhiba o disminuya el crecimiento de bacterias patógenas como de *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* O157-H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella flexneri* responsables de enfermedades de transmisión alimentaria.



## CAPÍTULO I

### MARCO TEÓRICO

#### 1. INOCUIDAD ALIMENTARIA

##### 1.1 DEFINICIÓN

El término inocuo hace referencia a todo alimento que no causa peligro ni daño alguno a la población dándole la confianza de consumirlo <sup>(19)</sup>, por lo cual la inocuidad alimentaria engloba acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad de los alimentos <sup>(3)</sup>. La importancia de la inocuidad en los alimentos es básica para lograr una mejor nutrición a través de una alimentación sana y nutritiva. En el sector alimentario se exigen ciertos requisitos por parte del consumidor, lo que lleva a los productores y comercializadores a buscar métodos que garanticen la seguridad de los alimentos desarrollando una estructura uniforme para los estándares de seguridad alimentaria <sup>(20)</sup>.

##### 1.2 INICIATIVA MUNDIAL DE SEGURIDAD ALIMENTARIA

La Iniciativa Mundial de Seguridad Alimentaria tiene como objetivo principal garantizar que cada país cuide la inocuidad de los alimentos que importa, así como aquellos que exporta. En México se exporta el 90% del total de las hortalizas que se produce y este mercado obliga a los productores a cumplir con un programa adecuado de inocuidad, el cual consiste en el control sobre las áreas de producción, distribución y consumo de alimentos para evitar peligros físicos, químicos y biológicos en los mismos, garantizando así la seguridad alimentaria de los consumidores <sup>(21)</sup> <sup>(22)</sup>; de lo contrario se presentan una serie de riesgos como los alimentos insalubres, las alergias e intolerancias alimentarias,

la contaminación química de los alimentos producida por micotoxinas y/o dioxinas y las bacterias. Estas últimas, son consideradas un peligro microbiológico latente por el reporte de enfermedades tanto en regiones desarrolladas como subdesarrolladas, comprometiendo el estado nutricional de las personas, especialmente de los más vulnerables poniendo en peligro la vida de todos <sup>(23)</sup> <sup>(24)</sup>.

## 2. BACTERIAS PATÓGENAS

### 2.1 DEFINICIÓN

Las bacterias son definidas como organismos unicelulares no visibles al ojo humano, cuyo material genético no presenta membrana celular <sup>(25)</sup>. Se clasifican según el comportamiento de su membrana frente a la tinción (Gram Positivos y Gram Negativos) gracias a los componentes que varían en cada uno de ellos (Figura 1). Una gran diferencia con los hongos es que bajo condiciones ambientales favorables de temperatura, humedad y nutrientes estas pueden dividirse cada 20 minutos <sup>(25)</sup> <sup>(13)</sup>.

### 2.2 PROBLEMÁTICA DE LAS BACTERIAS PATÓGENAS EN SALUD

Cuando las bacterias empiezan a desarrollar un pequeño grupo de genes de virulencia seguido de un mecanismo de patogenicidad que causará daño al huésped son llamadas bacterias patógenas (BP) <sup>(26)</sup> <sup>(27)</sup>. Las BP son causantes de enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs) cuando sobrepasan las concentraciones de UFC tolerantes para la ingesta. Las ETAs generalmente son de carácter infeccioso o tóxico y son causadas por factores biológicos (bacterias, virus, parásitos, etc.) o sustancias químicas. Sin embargo, según reportes de la Organización Panamericana de la Salud, las fuentes más frecuentes de contaminación son las biológicas, debido a que son las responsables del 69% de los brotes censados <sup>(7)</sup> <sup>(28)</sup>. Por otro lado, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria mostró que, de los 4362 brotes reportados en el 2015, 33.7% fueron causados por agentes bacterianos atribuyéndoles un 21.88% a *Salmonella spp.* y un 8.9% a *Campylobacter spp.* <sup>(29)</sup>

Se estima que, a nivel mundial, 600 millones de personas son víctimas de ETAs cada año <sup>(3)</sup> y las poblaciones más vulnerables son los niños menores de 5 años de edad, mujeres embarazadas y adultos mayores (Tabla 1); debido a que su sistema inmune aún no está completamente desarrollado ha sido alterado por cambios hormonales o presentan una inmunidad debilitada siendo más susceptibles a contraer diversas patologías <sup>(30)</sup>.



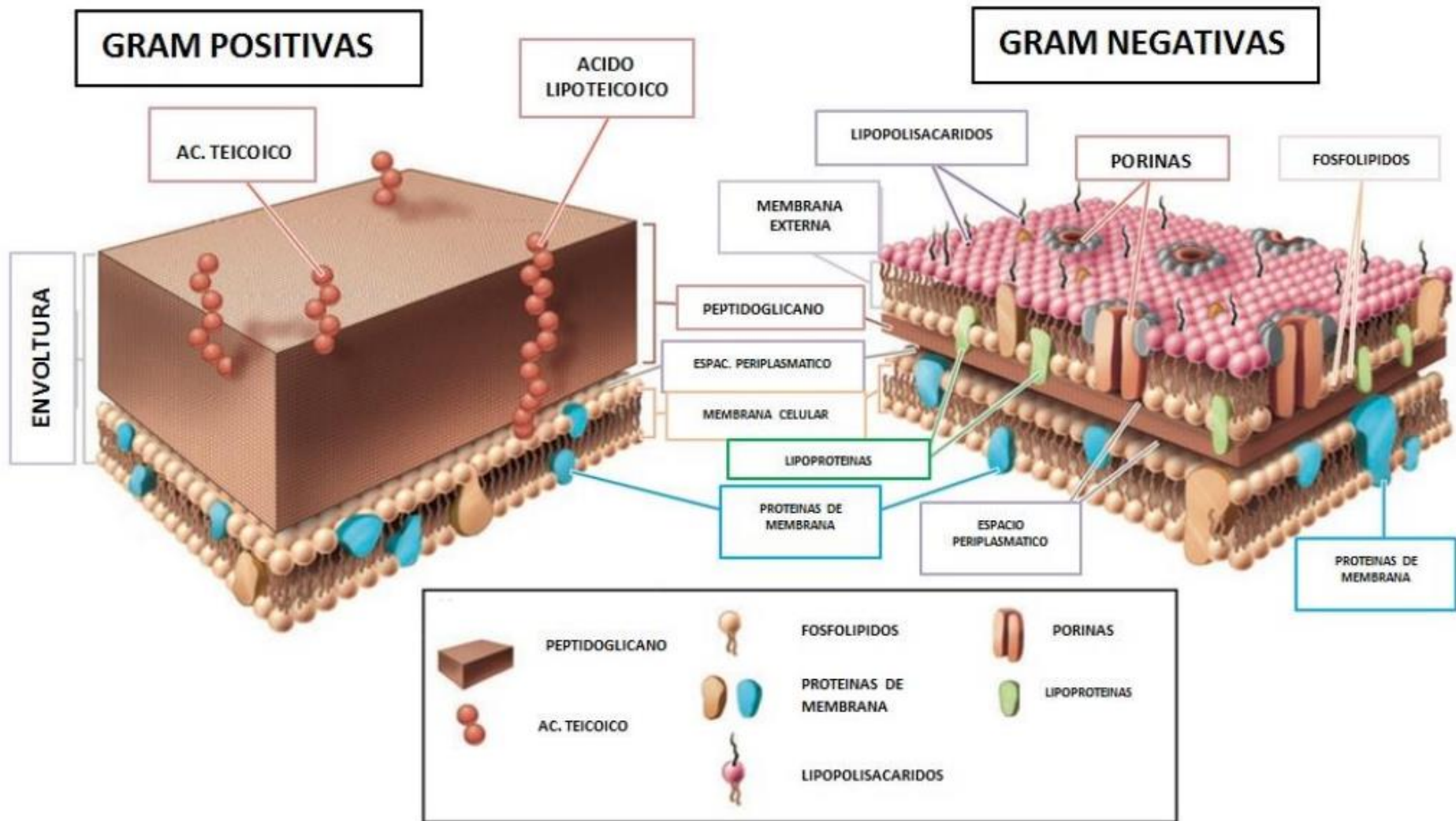


Figura 1. Comparación de la Membrana y Pared Celular de las Bacterias Gram Postivas y Gram Negativas <sup>(33)</sup>.

En el caso de niños menores a 5 años se ha reportado que el 40% de las enfermedades presentadas son ETAs, lo que ha provocado hasta 125 000 fallecimientos por año a nivel mundial. Las mujeres embarazadas tienen 17% más de probabilidades de contagio que los otros sectores en el caso de infecciones alimentarias por *Listeria monocytogenes* ya que la enfermedad puede darse durante toda la gestación presentando una incidencia de 0.2-0.8/1000 partos. En los adultos mayores se ha observado que cuentan con tasas altas de infección invasiva por *Salmonella* causando 13 de 29 muertes en los Estados Unidos (3) (8) (9).

Tabla 1. Factores que agravan o aumentan el riesgo de infección por ETAs en sectores vulnerables (34).

<i>Factores en el huésped</i>	<i>Razones</i>
Consumo de antiácidos, particularmente inhibidores de la bomba de protones.	Aumenta el pH en el estómago, aumentando la supervivencia de patógenos.
Deficiencia nutricional por una mala absorción de los alimentos, mala nutrición o inanición	Inadecuado sistema inmune
Edad <5 años	Falta de sistema inmunitario desarrollado, se requiere una dosis infecciosa más pequeña para la infección
Edad 60-65 años	Sistema inmune deteriorado, también afectados por enfermedades crónicas.
Embarazadas	Inmunidad alterada
Ingestión de alimentos grasos (chocolate, queso, hamburguesa) que contiene patógenos	La grasa protege a los patógenos del ácido en el estómago
Inmunodeficiencias primarias	Sistema inmune inadecuado para combatir la infección

### 2.3 BACTERIAS PATÓGENAS RESPONSABLES DE ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA

Según la FDA existen 14 patógenos principales transmitidos por los alimentos, de los cuales 13 son BP (31). La mayoría de ellos son mesófilos (como algunos mencionados anteriormente) y se desarrollan óptimamente en un rango de 20°C a 45 °C, no obstante, ciertas bacterias como *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolítica* son capaces de crecer en condiciones inferiores a 10°C (32). Las bacterias más comunes que se presentan

en las ETAs y las cuales serán relevantes para esta investigación son: *Escherichia coli* patogénica, *L. monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella* <sup>(31)</sup>.

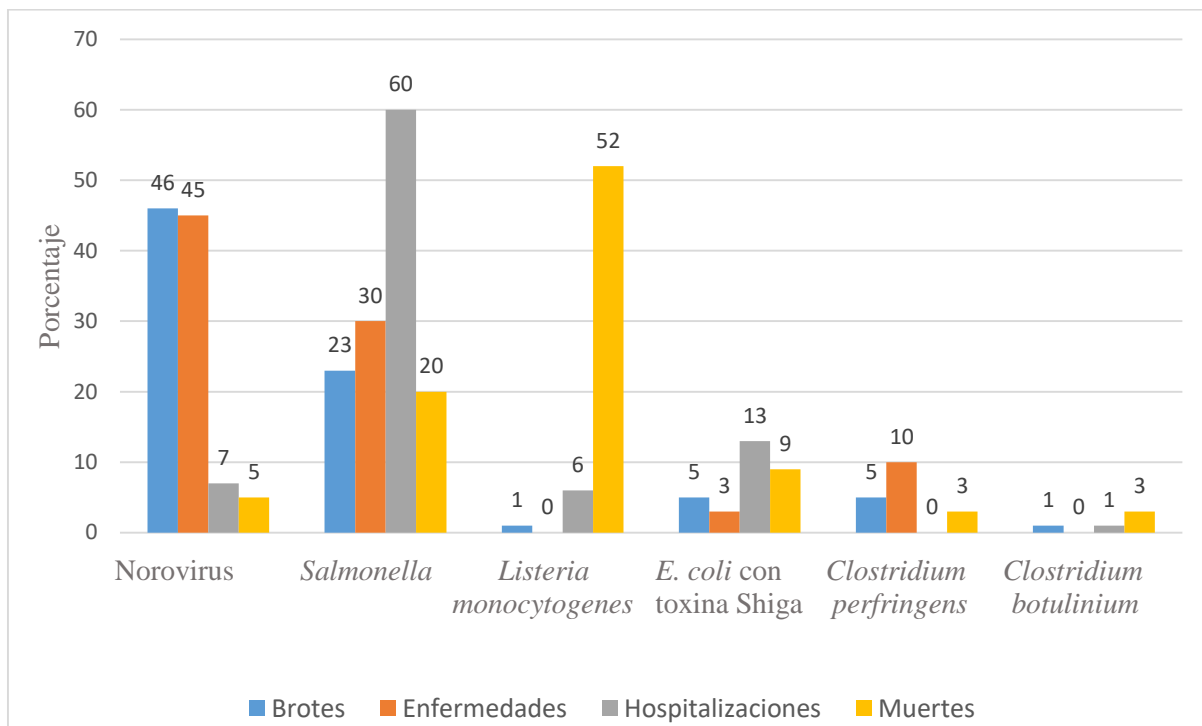


Figura 2. Organismos más comunes asociados con brotes, enfermedades, hospitalizaciones y muertes por ETAs (confirmadas y sospechosas) en EE.UU, 2009 y 2015 <sup>(35)</sup>.

### 2.3.1 *Escherichia coli* patogénica

Perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, *E. coli* es un bacilo Gram Negativo, anaerobio facultativo, reductor de nitritos que puede crecer a un pH entre 6 y 8, con una temperatura óptima de 37°C, tiene la capacidad de fermentar azúcares simples y no forma esporas y algunas de sus especies pueden ser móviles (con flagelos peritricos) o inmóviles <sup>(36)</sup><sup>(37)</sup>. Comprende una amplia gama de hábitats según sus características fisiológicas, una de ellas es la flora intestinal normal, en la cual habita junto con otras bacterias entéricas como *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Providencia*, *Citrobacter* y *Serratia* <sup>(38)</sup>. Sin embargo, existen cepas de *E. coli* que han adquirido ciertos genes de virulencia, dándoles una mayor capacidad para adaptarse a nuevos ambientes generando un amplio espectro de enfermedades y siendo más agresivas para los humanos, <sup>(39)</sup> atribuyéndoles una de las principales causas de las infecciones neonatales por su alta tasa de morbilidad y mortalidad <sup>(40)</sup>.



Cada cepa de *E. coli* tiene características clínicas específicas y una virulencia diferente (Tabla 2), lo que permite clasificarlas en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC) <sup>(41)</sup>. En 1982, la EHEC fue la responsable de la primera enfermedad humana detectada, ya que con menos de 100 células puede causar una infección. Se conoce que la ruta de transmisión es fecal-oral <sup>(37)</sup> localizándola principalmente en el tracto intestinal bovino, sin embargo, se puede encontrar en agua de riego, alimentos procesados y frescos <sup>(39)</sup> <sup>(42)</sup> (Figura 3).

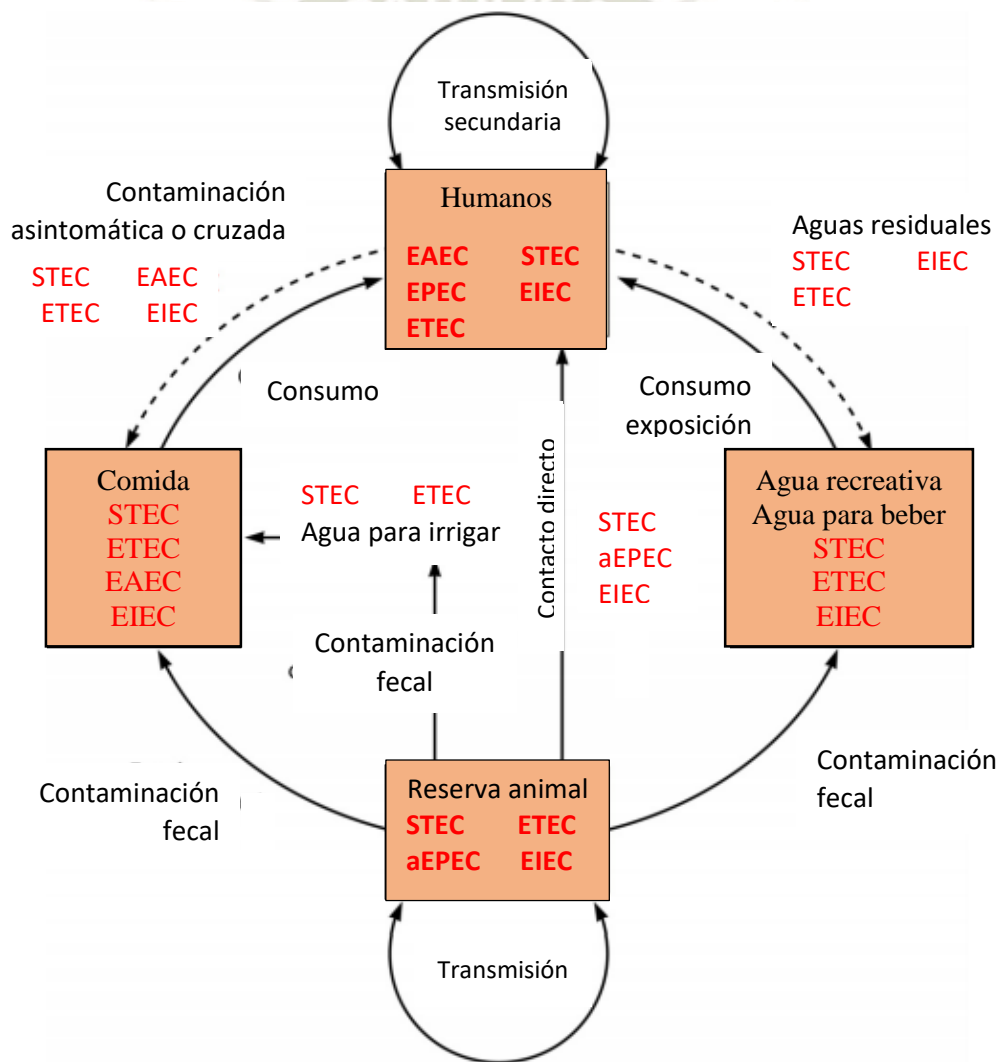


Figura 3. Descripción general de los reservorios potenciales y modos de transmisión de *Escherichia coli* patogénica <sup>(37)</sup>.

Tabla 2. Características de los grupos de *Escherichia coli* causantes de diarrea <sup>(41)</sup>.

<i>Grupo</i>	<i>Síntomas clínicos</i>	<i>Epidemiología</i>	<i>Serogrupos y serotipos más comunes</i>	<i>Factores de patogenicidad</i>
ETEC	Diarrea aguda acuosa	Niños menores de dos años y diarrea del viajero	O8:H9, O15:H11, O20:H-, O25:H-, O27:H7, O78:H12, O148:H28, O159:H20	ST y LT CFA
EHEC	SUH, CH, diarrea sin sangre, dolor abdominal, fiebre, vómito	Niños y adultos que la adquieren por comer carne cruda o mal cocida	O157:H7, O26:H11, O103:H2, H113:H21, O119, O128, O145	STX A/E Intimina pO157
EIEC	Diarrea con moco y sangre o diarrea acuosa, también se presenta cuadro disentérico	Niños menores de seis meses	O28:H, O112ac:H-, O144:H-, O152:H-, 164:H-O167:H-	Invasividad Plásmido140MDa
EPEC	Diarrea aguda, dolor abdominal, vómito, fiebre baja	Niños menores de seis meses hasta dos años	O55, O86, O142, O111:H-O127	A/E, BFP Plásmido EAF de 50-70MDa
EAEC	Diarrea líquida, ver con moco, sin sangre, diarrea persistente hasta 20 días	Recién nacidos y niños menos de dos años	O44:H18	Fimbria AAFI y II EAST I Proteínas Pet/Pic OMP Plásmido 60MDa Citotoxina
DAEC	Diarrea acousa sin sangre	Niños de 1 a 5 años	O126:H27	Fimbria F1845 OMP

LT: toxina termolábil  
 ST: toxina termo estable  
 CFA: factor de colonización antigénico  
 BFP: pili con forma rizada  
 A/E: lesión adherencia y eliminación  
 EAF: factor de adherencia de EPEC  
 OMP: proteína de membrana externa  
 STX: toxina shiga  
 EAST: toxina ST de cepas enteroagregativas

En 2011, una nueva cepa de EHEC causó el segundo brote más mortal de la historia, al enfermarse más de 4 000 personas en 16 países provocando la muerte de 50 individuos <sup>(36)</sup>; esta aparición trajo como resultado la clasificación de un nuevo subgrupo en las

EHEC llamado *E. coli* toxigénica Shiga o STEC. Con el fin de comprender mejor la patogenicidad de este subgrupo se logró aislar de los pacientes a la *E. coli* O157-H7, quien representa de manera más significativa a las EHEC hoy en día <sup>(43)</sup>.

La patogenicidad de esta cepa comienza cuando coloniza la mucosa intestinal una vez consumidos los alimentos o agua contaminada y para que se dé de manera eficiente se requiere de una buena motilidad bacteriana, ya que le confieren funciones adicionales como la adhesión a la célula y la inmunidad innata, sin embargo, no se considera un factor definitivo de virulencia ya que algunas cepas no móviles también pueden ser patógenas <sup>(43)</sup> (Figura 4). La toxina Shiga, factor que permitió la subclasificación de las STEC, juega un papel importante en la patogenicidad al inhibir la síntesis de proteínas del riñón desencadenando la apoptosis de este <sup>(44)</sup>, ocasionando diarreas leves o graves, y entre el 5 y 10% de estas infecciones derivan en el síndrome urémico hemolítico o SUH caracterizado por un sangrado abundante que provoca insuficiencia renal o la muerte <sup>(43)</sup>.

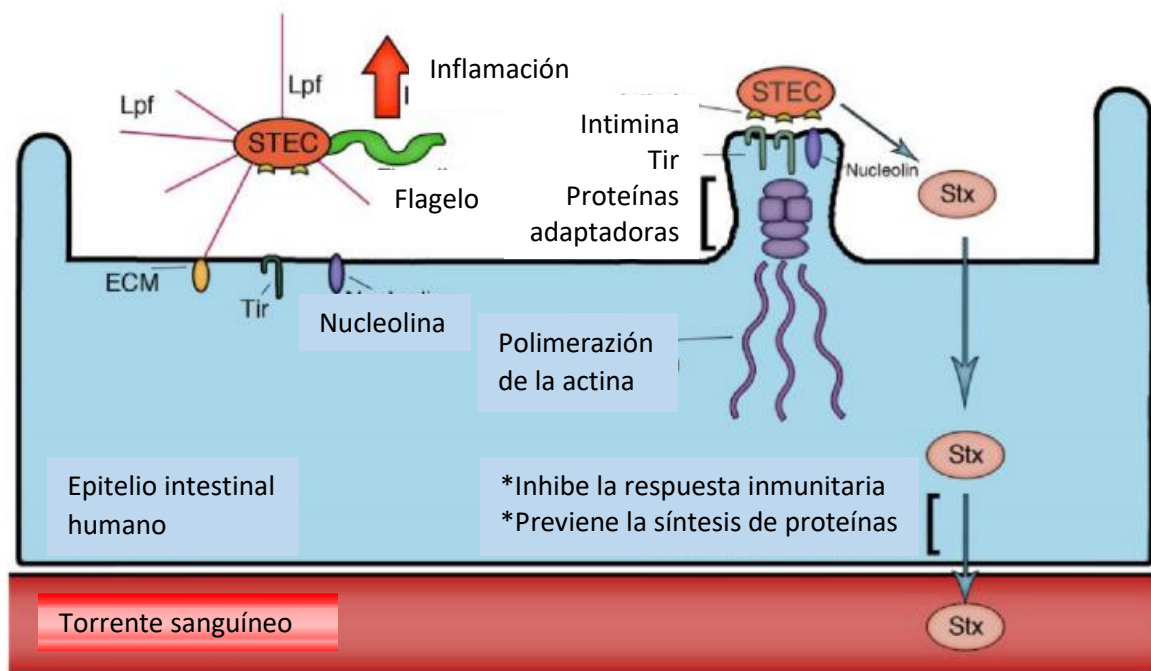


Figura 4. Modelo de colonización de STEC al infectar humanos <sup>(45)</sup>.

En la Figura 4 podemos observar una célula epitelial intestinal humana que muestra las primeras etapas de la colonización por STEC. Las cepas STEC O157 o no O157 interactúan con el intestino a través de las fimbrias Lpf. A esto le sigue la formación de lesiones A/E. La producción de Stx ocurre en el tracto intestinal, y la translocación a



través del lumen intestinal al torrente sanguíneo donde póstumamente se distribuye a los órganos diana, como los riñones.

Los Miembros de la Unión Europea reportaron para 2009 una incidencia global de STEC de 0.75 por cada 100 000 habitantes <sup>(37)</sup>. Scallan y col. <sup>(46)</sup> reportaron, en 2011, 63 000 enfermedades, 2 100 hospitalizaciones y 20 muertes por año en EE. UU por STEC pero para el año 2015, se confirmaron 5 901 casos anualmente <sup>(29)</sup>. En 1995, 40 residentes de Montana fueron identificados con una infección de *E. coli* O157-H7 <sup>(47)</sup> y en EE. UU el 47.01% de los casos informados en 2011 fueron por esta misma cepa causando tasas de hospitalización más altas que el otro 52.99%. Ese mismo año, se reportó que las incidencias de *E. coli* O157-H7 disminuyó un 42% en comparación a la incidencia de los años 1996 a 1998, dando un panorama prometedor sobre las acciones que se tomaba ante esta cepa <sup>(37)</sup>. La preocupación que causó estas cifras no sólo llevó al incremento de las investigaciones, además, busco la seguridad de quienes manipulaban estas muestras aumentando el uso de cepas que carezcan de los factores de virulencia como *E. coli* DH5 $\alpha$  <sup>(48)</sup>.

### 2.3.2 *Listeria monocytogenes*

En base a sus características, *Listeria* es un bacilo Gram Positivo, aerobio facultativo, no formador de esporas, carente de capsula, posee motilidad estando sólo entre los 10 y 25°C y tiene la particularidad de sobrevivir a condiciones extremas de pH (entre 4.4 y 9.4), concentraciones mayores a 20% de sal y temperatura, al poderse desarrollar entre un rango de -18°C y 45°C <sup>(8) (49) (50)</sup>. De las 8 especies de este género (*innocua*, *ivanovii*, *welshimeri*, *seeligeri*, *marthii*, *rocourtiae* y *grayi*), *L. monocytogenes* es considerada mortal para los humanos por ser un patógeno intracelular que no solo penetra las células intestinales, también lo hace en otros órganos como bazo, cerebro, placenta en el caso de mujeres embarazadas e hígado, donde se multiplica principalmente. Su patogenicidad se da gracias a 7 factores de virulencia que tienen como objetivo la adhesión e invasión a las células huésped, así como resistir ante los mecanismos de defensa del sistema inmunitario, provocando una grave ETA, la listeriosis <sup>(49)</sup> (Tabla 3).

Tabla 3. Factores que determinan la patogenicidad de *Listeria monocytogenes* <sup>(49)</sup>.

Factores de Virulencia	Descripción
Proteína de adhesión (LAP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Adherencia de las bacterias al epitelio intestinal</li> <li>- Expresión con una baja disponibilidad de oxígeno y nutrientes, a 37–42 ° C</li> <li>- Secretada por SecA2 al exterior de la célula y se une a la superficie de la bacteria en el caso de cepas patógenas</li> </ul>
Internalinas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Adhesión e invasión de las células del huésped</li> <li>- Anclado en la pared celular o unido covalentemente al peptidoglicano</li> <li>- El papel más importante lo desempeña la internalina A e internalina B ya que permiten la producción de un biofilm</li> <li>- InlA e InlB son codificados por el operón inLAB localizado en el cromosoma bacteriano</li> <li>- Otros internalinas son responsables principalmente de la adhesión de patógenos a las células huésped.</li> </ul>
Listeriolisina O	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La unión a las moléculas de colesterol contenidas en las membranas y la oligomerización, permite la penetración de la listeriolisina en la membrana, formando aberturas y finalmente permitiendo que <i>L. monocytogenes</i> salga de las vacuolas</li> <li>- Evita los macrófagos y la penetración en el citosol de la célula huésped</li> <li>- Afecta a las vías de señal en el citosol</li> </ul>
Sistemas de secreción	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Un camino que depende de Sec (un sistema clásico de secreción de proteínas marcado con un péptido señal en el terminal N en procariotas)</li> <li>- vía TAT</li> <li>- FPE (exportador de proteína fimbriada)</li> <li>- FEA (aparato de exportación flagelar): homólogo al sistema de secreción tipo III</li> <li>- el sistema Esx-1 / Wss</li> </ul>
Fosfolipasas C PlcA y PlcB	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Salir de las células huésped y transportar a las células vecinas</li> <li>- Apoyar el efecto de la listeriolisina O</li> </ul>
Proteínas superficiales ActaA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activación del proceso de polimerización de actina alrededor de las células bacterianas, formación de la cola de actina que permite que <i>L. monocytogenes</i> se mueva y penetre en otras células del organismo</li> <li>- Posible promoción de la autoagregación, formación de un biofilm, evitando la autofagia (supervivencia del patógeno en el intestino)</li> </ul>
Proteína OrfX	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Oxidación de macrófagos - desarrollo de infección.</li> </ul>

La listeriosis es una enfermedad que tiene diferentes vías de transmisión: fecal-oral, animal-hombre y madre-feto, sin embargo, el suelo se ha convertido en el nicho ecológico



ideal de *Listeria monocytogenes* permitiendo su transferencia hacia las plantas estableciendo como principal fuente de contaminación los alimentos <sup>(51)</sup> (Figura 5), los cuales tendrían que tener una dosis bacteriana entre  $10^4$  y  $10^6$  UFC/g para provocar una infección. La presencia de esta bacteria ocasiona padecimientos como meningoencefalitis, septicemia y abortos atacando sobre todo a las poblaciones vulnerables: niños menores de 5 años, ancianos mayores de 65 años y mujeres embarazadas además de pacientes inmunocomprometidos; estas poblaciones pueden contraer la infección con tan sólo 0.3 UFC/g de alimento <sup>(52)</sup> <sup>(53)</sup>. En 2010, la listeriosis resulto ser la tercera causa de muerte por ETAs en EE. UU al reportarse 1 662 casos, 1 520 hospitalizaciones y casi 300 muertes <sup>(54)</sup>. La Unión Europea confirmó en el 2015, 2 206 casos y la cifra de muertes de ese año fue una de las más altas reportadas desde el 2008 que derivaba en una tasa de mortalidad del 17% y una incidencia de 0.46 por cada 100 000 habitantes <sup>(29)</sup>, por su parte la organización oficial que desarrolla normas alimentarias en Australia, Food Standards, reportó que cada año en ese mismo país, 150 personas son hospitalizadas por esta misma bacteria y 15 de ellas fallecen <sup>(55)</sup>.

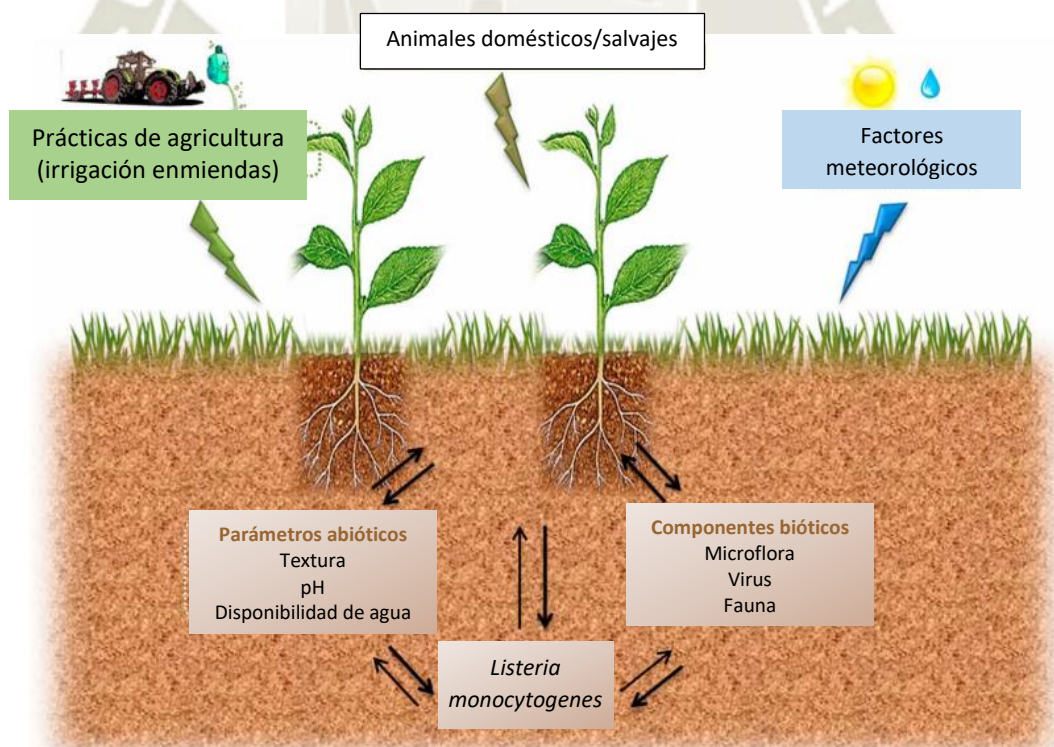


Figura 5. Posibles rutas de transferencia y circulación de *L. monocytogenes* en el entorno de la granja y factores que pueden afectar su supervivencia en el suelo <sup>(51)</sup>.



### 2.3.3 *Salmonella enteritidis*

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae; son bacilos Gram Negativos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas con flagelos que les confieren movilidad <sup>(56)</sup>. Su ruta de transmisión más conocida es la oral-fecal (de manera directa o indirectamente) a través de los alimentos, y ha sido capaz de evadir las barreras del sistema inmunológico en el organismo al sobrevivir a la acidez del estómago, resistir la fagocitosis ejercida por macrófagos y células dendríticas con el fin de multiplicarse y propagarse en el intestino o el resto del organismo. La razón por la que la *Salmonella* ha logrado persistir en varios ambientes hostiles es la formación de biopelículas, gracias a la mezcla de sustancias poliméricas las cuales los protegen de los agentes antimicrobianos, evitando la deshidratación del microorganismo y la facilidad de capturar nutrientes <sup>(57)</sup>. *Salmonella spp.* provoca una infección con una dosis de  $10^6$  y  $10^8$  células <sup>(49)</sup>, causando más de 90 millones de enfermedades asociadas a diarrea por año a nivel mundial en donde el 85% de ellas se relaciona directamente por consumo de alimentos; pero también se estima que los casos reportados por salmonelosis a nivel mundial son de 200 millones a 1.3 mil millones por año. La Unión Europea en 2009, estimó que solo 1 de 57 casos de salmonelosis eran reportados, provocando que el número de incidencias varíe de 16 a 11 800 por cada 100 000 personas <sup>(58) (59)</sup>.

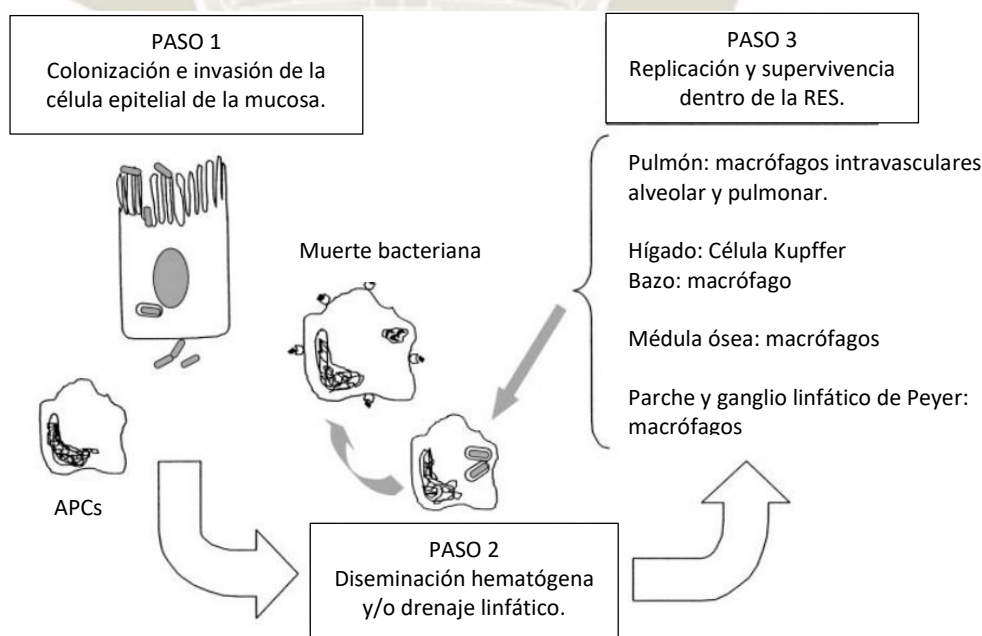


Figura 6. Principales pasos en la patogénesis de *Salmonella* con participación en el desarrollo de la restricción y adaptación del huésped <sup>(60)</sup>.

Este microorganismo se divide en dos especies: *S. bongori* y *S. enterica* las cuales pueden causar enfermedades en los humanos, añadiendo la subdivisión en serotipos de acuerdo a las propiedades antigénicas de superficie y flagelares <sup>(36)</sup>, pero la última en mención es quien tiene mayor potencial patogénico. *S. enterica* serovar Enteritidis (*S. enteritidis*) y *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) son los serovares que poseen un rango más amplio de hospedadores generando en su mayoría enfermedades gastrointestinales en las personas y algunos cuadros clínicos en animales (Figura 7). Sin embargo, *S. enterica* serovar Typhi (*S. typhi*) afecta sólo al ser humano generando fiebre tifoidea <sup>(60)</sup>. La fiebre tifoidea es una enfermedad sistemática que tiene como huésped único a los seres humanos al ingerir alimentos o agua contaminada con una ruta de transmisión fecal-oral sobre todo en áreas con malas condiciones sanitarias. Se estimó que, en el año 2000, la fiebre tifoidea causó 21.7 millones de enfermedades y 217 000 muertes en todo el mundo, presentando el mayor número de casos en África y Asia sudoriental y central <sup>(56) (49) (61)</sup>.

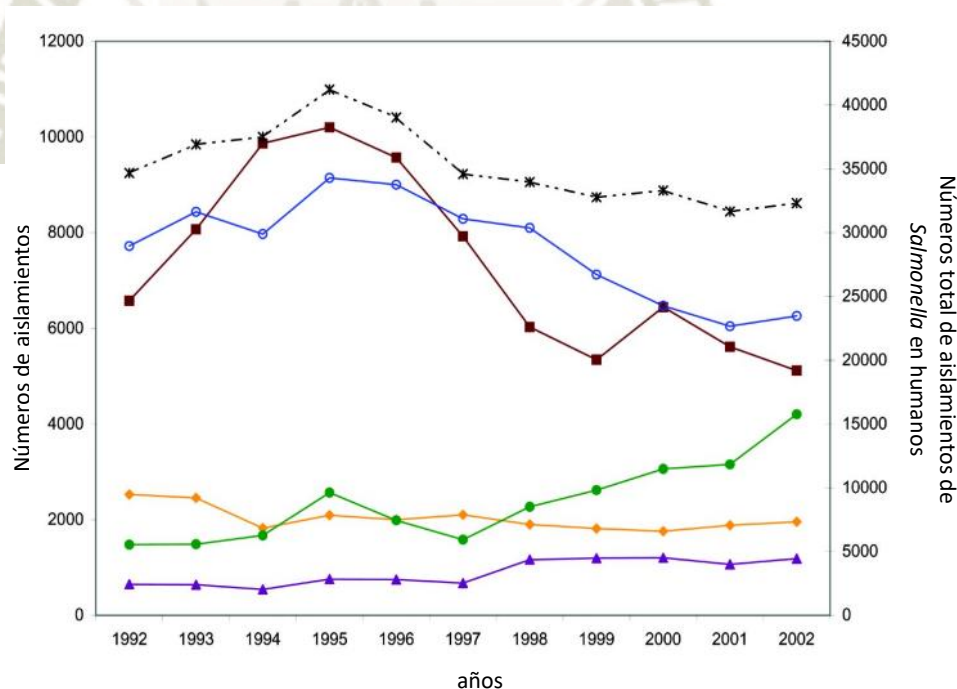


Figura 7. Aislamientos de *Salmonella* más comunes de fuentes humanas (1996-2002) (◆) Heidelberg, (■) Enteritidis, (△) Javiana, (●) Newport, (○) Typhimurium; eje derecho: (\*--\*) Número total de aislamientos de *Salmonella* en humanos <sup>(62)</sup>.

*S. enteritidis* y *S. typhimurium* también son un problema latente alrededor del mundo al causar 93.8 millones de enfermedades al año, el 85.6% de estas se relacionan con ETAs derivando en 155 000 fallecimientos. Ambos serotipos generan enfermedades cuando el

ser humano entra en contacto directo con animales infectados y que al momento de liberar sus desechos al ambiente provocan un contagio indirecto <sup>(63)</sup>. La patogenicidad se expresa a través de ciertos genes como el SPI-1 (implicado en la penetración inicial de la bacteria) y SPI-2, quien permite los siguientes estadios de infección <sup>(64)</sup> (Tabla 4), por eso la mayoría de las investigaciones dadas para estudiar este mecanismo se enfocó en *S. typhimurium* pero para la década de 1980, la *S. enteritidis* se convirtió en la principal causa de salmonelosis a nivel mundial reemplazando a la *S. typhimurium*. Durante el año 2004, *S. enteritidis* se registró como el serotipo más común en EE. UU <sup>(65)</sup> <sup>(66)</sup> y para el año 2014 en la Unión Europea se registró como uno de los de mayor frecuencia al representar el 44.4% de todos los casos confirmados en humanos <sup>(67)</sup>.

Tabla 4. Factores que determinan la virulencia del género Salmonella <sup>(49)</sup>.

<i>Mecanismo de virulencia</i>	<i>Descripción</i>
Adherencia a la célula huésped	<p>Adherencia modulada por:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fimbrias (crecimientos protoplásmicos): proteínas que interactúan con los receptores del huésped en las puntas;</li> <li>- Adhesinas (proteínas): BapA, SiiE, ShdA, MisL y SadA;</li> <li>- Flagelos (hasta 10 distribuidos al azar sobre la superficie de la célula), la movilidad de la célula puede facilitar indirectamente la adhesión.</li> </ul>
Invasión y replicación dentro de la célula del huésped	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se da después de unir el patógeno a las células del huésped</li> <li>- Transmisión de efectores al citosol de la célula infectada. Los cuales estimulan el sistema de señalización celular a través de la secreción tipo III y son responsables de la invasión y replicación de la bacteria</li> <li>- Los genes de codificación del sistema de secreción se localizan en SPI</li> </ul>
Recubrimiento de polisacárido	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La parte superficial de la bicapa de la membrana de las bacterias Gram-negativas está compuesta casi en su totalidad por lipopolisacáridos</li> <li>- Lípido A: la parte lipídica de la capa externa de lipopolisacáridos, causa diversas respuestas inmunológicas del organismo huésped</li> </ul>
Producción de toxinas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- endotoxinas (lípidos A);</li> <li>- exotoxinas (citotoxinas y enterotoxinas)</li> </ul>



### 2.3.4 *Shigella flexneri*

Pertenciente a la familia Enterobacteriaceae, el género *Shigella* es un bacilo Gram Negativo, anaerobio facultativo, no fermenta la lactosa, no forma esporas y carece de motilidad. Las condiciones aptas para su crecimiento tienen rangos amplios, si bien su temperatura ideal es 37°C también puede desarrollarse entre 6 y 48°C; para el caso del pH es igual, pudiendo crecer entre 6 y 8, pero hay reportes de crecimiento en medios más ácidos (4.8) y alcalinos (9.3) <sup>(68)</sup> <sup>(69)</sup>.

Su ruta de transmisión más conocida es por la vía fecal-oral, que puede desglosarse en un contagio directo, de una persona a otra, e indirecto por la ingestión de alimentos y/o agua contaminada <sup>(69)</sup>. Sin embargo, Ugbogu *et al.* <sup>(70)</sup> encontraron una nueva ruta de transmisión a través de las moscas domésticas, al aislar *Shigella* de todas las muestras analizadas en su investigación concluyendo que las superficies y utensilios también pueden ser una fuente previa de contaminación de los alimentos. La patogenicidad empieza colonizando las células epiteliales del colon, en donde se multiplica y disemina, causando la muerte de las células infectadas que al desprenderse darán como resultado una diarrea con sangre; esto sumando a la presencia de enterotoxinas como la toxina Shiga, aumentará la virulencia de la bacteria <sup>(71)</sup> <sup>(72)</sup> <sup>(73)</sup> (Figura 8).

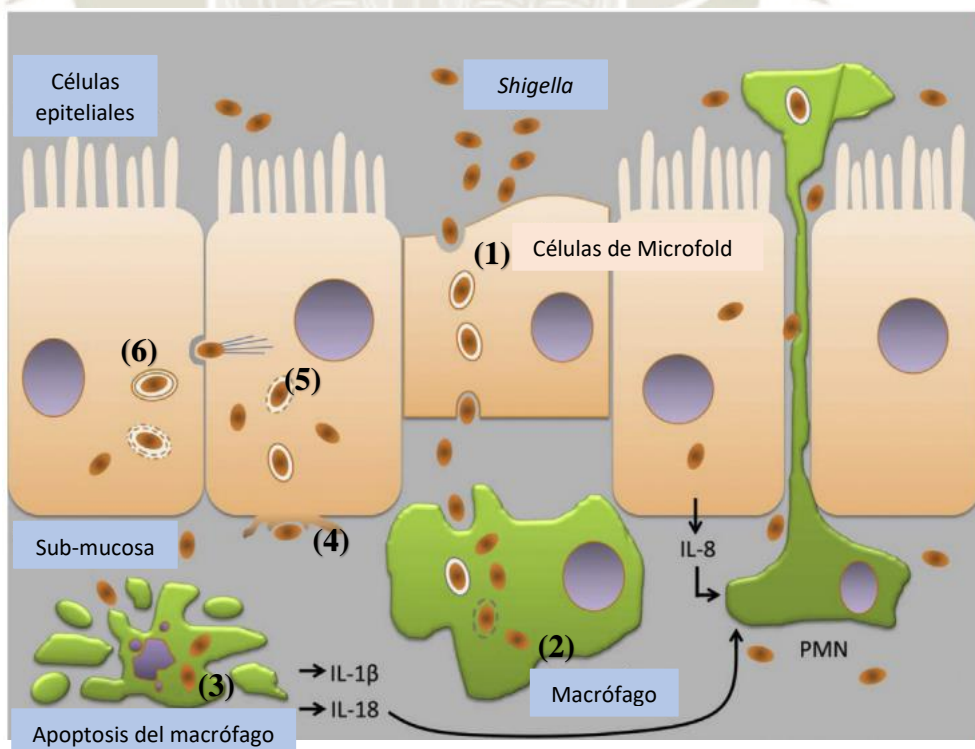


Figura 8. El proceso de invasión de *Shigella* en las células intestinales <sup>(77)</sup>.

En la Figura 8 podemos observar los seis pasos que sigue *Shigella* durante el proceso de invasión en las células intestinales. (1) Transporte de la bacteria a través de las células de Microfold (2) Destruye y escapa de las células inmunes (3) Invasión celular (4) Multiplicación intracelular (5) Diseminación intra e intercelular (6) Destrucción de las células hospedadoras.

*Shigella spp.* cuenta con 4 especies: Grupo A o *S. dysenteriae*, Grupo B o *S. flexneri*, Grupo C o *S. boydii* y Grupo D o *S. sonnei* (Tabla 5); y cualquiera de ellas necesitará una cantidad mínima de 10 a 100 células para causar shigelosis, la cual es una enfermedad diarreica que puede durar pocos días, provocando un malestar general, o complicarse hasta generar SUH, artritis reactiva, convulsiones o neurotoxicidad <sup>(74)</sup> <sup>(75)</sup>.

Tabla 5. Características de las especies de *Shigella* <sup>(69)</sup>.

Especies	Serotipos	Síntomas	Lugar de ocurrencia
<i>S. dysenteriae</i>	1-15	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Síntomas más severos con mayores tasas de mortalidad.</li> <li>- En la mayoría de los casos, causa inflamación y ulceración de la parte inferior del intestino que causa heces con sangre.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Países menos desarrollados</li> <li>- Causa brotes viciosos en poblaciones confinadas, especialmente en campos de refugiados</li> </ul>
<i>S. flexneri</i>	1-6 (con 15 subtipos)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diarrea, dolor abdominal, calambres y fiebre (pero a menudo es más grave que la infección por <i>S. sonnei</i>)</li> <li>- La inflamación y la ulceración de la parte inferior del intestino también son comunes. La enfermedad puede ser prolongada y más grave.</li> </ul>	Países en desarrollo, por ej. Bangladesh, China, Pakistán, Indonesia, Vietnam, excepto Tailandia
<i>S. boydii</i>	1-18	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Enfermedades diarreicas de gravedad variable, pero en su mayoría son similares a las causadas por <i>S. sonnei</i></li> </ul>	Principalmente en el subcontinente indio.
<i>S. sonnei</i>	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Menos severo</li> <li>- Diarrea (que a veces es sangrienta), dolor abdominal y calambres, y fiebre. También pueden ocurrir náuseas y / o vómitos, pérdida de apetito, dolor de cabeza o malestar.</li> </ul>	Países desarrollados, por ej. Estados Unidos, Europa

En 2006, se registró como la tercera infección bacteriana más común de los EE. UU, al causar más de 5 000 hospitalizaciones y un estimado de 38 fallecimientos <sup>(66)</sup>, siendo *S. sonnei* uno de los más predominantes con un 80% de las infecciones y con mayor frecuencia en países industrializados; el segundo más común es *S. flexneri*, el cual predomina en países de bajos ingresos siendo el transporte aéreo un modo rápido de propagación de esta especie, afectando a viajeros internacionales que regresan a país de origen <sup>(68)</sup> <sup>(76)</sup>. Para el 2014, la shigelosis causo preocupación a autoridades internacionales tras reportarse una incidencia a nivel mundial de aproximadamente 165 millones de casos <sup>(74)</sup> (Figura 9) (Figura 10).

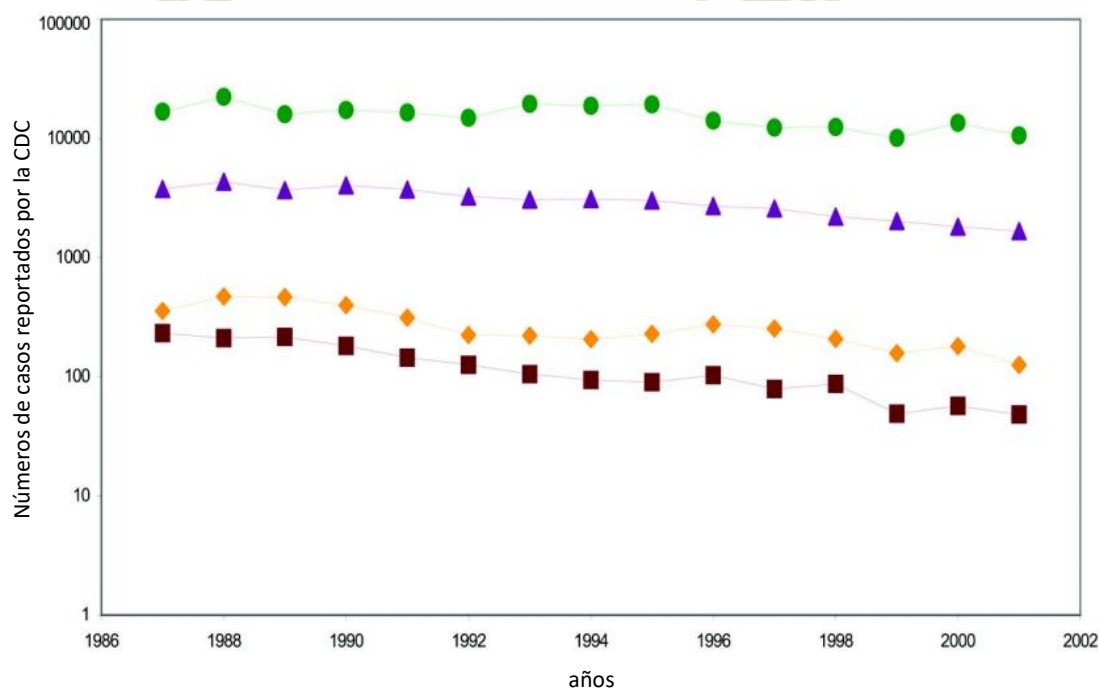


Figura 9. Contribución relativa de las especies de *Shigella* que causan ETAs. (■) *S. dysenteriae*, (▲) *S. flexneri*, (●) *S. sonnei*, (◆) *S. boydii* <sup>(62)</sup>.



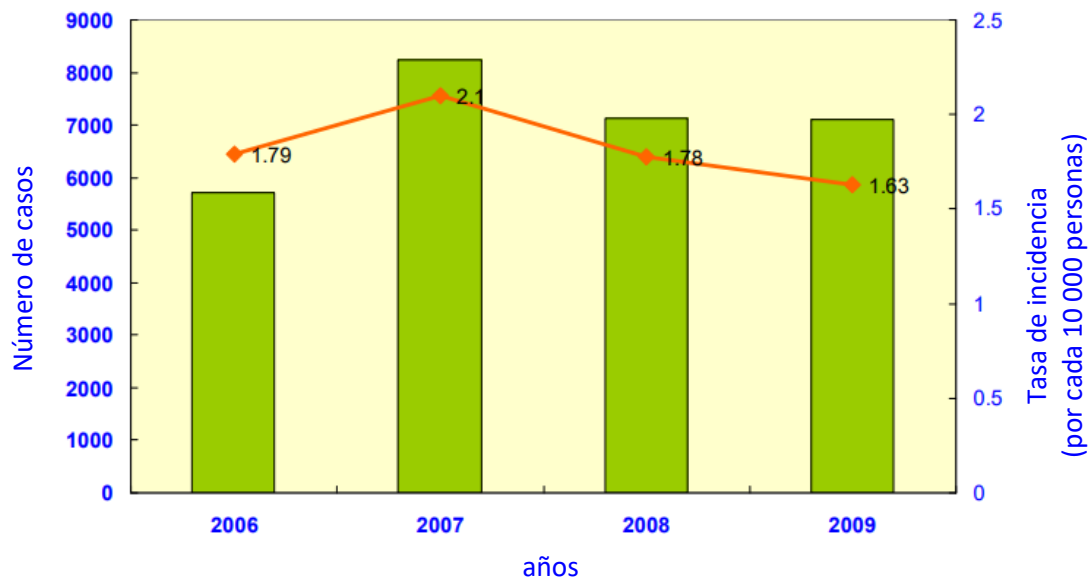


Figura 10. Número anual y tasa de incidencia de casos confirmados de shigelosis en Europa, 2006 – 2009 <sup>(69)</sup>.

## 2.4 FUENTES FRECUENTES DE CONTAMINACIÓN DE ALIMENTOS POR BACTERIAS PATÓGENAS

Las bacterias patógenas pueden inducir la contaminación en los alimentos durante la producción (frutas y hortalizas), cosecha, transporte, almacenamiento, distribución y procesamiento <sup>(68)</sup>. El ser humano debe consumir por lo menos 400 gramos de frutas y verduras por día con el fin de prevenir enfermedades crónicas y mantener una vida saludable, sin embargo, con el paso de los años se han identificado mayores incidencias de ETAs provenientes de alimentos frescos <sup>(10) (11) (12)</sup>.

Se sabe que del total de brotes de ETAs reportados en EE. UU entre 1996 y 2010, el 23% estaba relacionado con producción de alimentos y si bien en Europa la vinculación fue menor, hablando del 10% total de los brotes durante los años 2007 y 2011, el porcentaje de hospitalizaciones y fallecimientos atribuidas fue de 35 y 46% respectivamente <sup>(78) (79)</sup>. En una actualización del CDC <sup>(80)</sup> se registró que, durante los años 2006 y 2014 en EE. UU, el 23% de todos los brotes multiestatales transmitidos por alimentos se asociaron con vegetales.

En la Tabla 6, se muestra los productos frescos que han sido las fuentes más frecuentes que se han relacionado con las BP más relevantes para esta investigación.

Tabla 6. Brotes de bacterias patógenas detectadas en frutas y vegetales (Fuente propia)

Bacteria patógena	Fuente de contaminación	Referencia
<i>E. coli</i> O157-H7	lechuga	Scott y col. <sup>(194)</sup>
	cebollas	Söderström y col. <sup>(195)</sup>
	tomate	Kozak y col. <sup>(196)</sup>
	calabaza	Frank y col. <sup>(197)</sup>
	coles	Kupferschmidt <sup>(198)</sup>
	manzanas	Alegre y col. <sup>(199)</sup>
	espinaca fresca	Maki <sup>(200)</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	manzanas	Angelo y col. <sup>(201)</sup>
	melones	CDC <sup>(202)</sup>
	pepinos	CDC <sup>(203)</sup>
	perejil	Jeyaletchumi <sup>(204)</sup>
	lechuga	Gómez y col. <sup>(205)</sup>
	col	Scallan y col. <sup>(46)</sup>
	zanahorias	Shrivastava <sup>(206)</sup>
	maíz	Ponniah y col. <sup>(207)</sup>
<i>Salmonella spp.</i>	pimientos	Ruiz y col. <sup>(67)</sup>
	tomates	Aureli y col. <sup>(208)</sup>
	jalapeño	Warriner y Namvar <sup>(209)</sup>
	chiles serranos	Maki <sup>(210)</sup>
	mango	Penteado y col. <sup>(211)</sup>
<i>Shigella spp.</i>	cilantro	Sivapalasingam y col. <sup>(212)</sup>
	espinaca	Campbell y col. <sup>(213)</sup>
	guisantes	Kozak y col. <sup>(196)</sup>
	zanahorias	Mei-Soon y col. <sup>(214)</sup>
	perejil	Warriner y Namvar <sup>(209)</sup>
		Naimi y col. <sup>(215)</sup>

Existen factores de riesgo que elevan las posibilidades de una baja inocuidad especialmente en productos frescos; ya que el agua de riego, los fertilizantes biológicos y las prácticas en el manejo de los alimentos también han sido asociados a fuentes previas de contaminación <sup>(81)</sup> (Figura 11). En consecuencia, las bacterias patógenas transmitidas por los alimentos no son sólo una restricción para la seguridad de aquellos productos que se establecen antes y después de una cosecha, también causan grandes pérdidas

económicas a los propios agricultores, indicando como BP más significativas a *E. coli* O157:H7, *Salmonella spp.* y *Listeria spp.* <sup>(82) (83) (84)</sup>, despertando la necesidad de prevenir la contaminación a través de controles más efectivos más allá de las buenas prácticas agrícolas <sup>(85)</sup>.

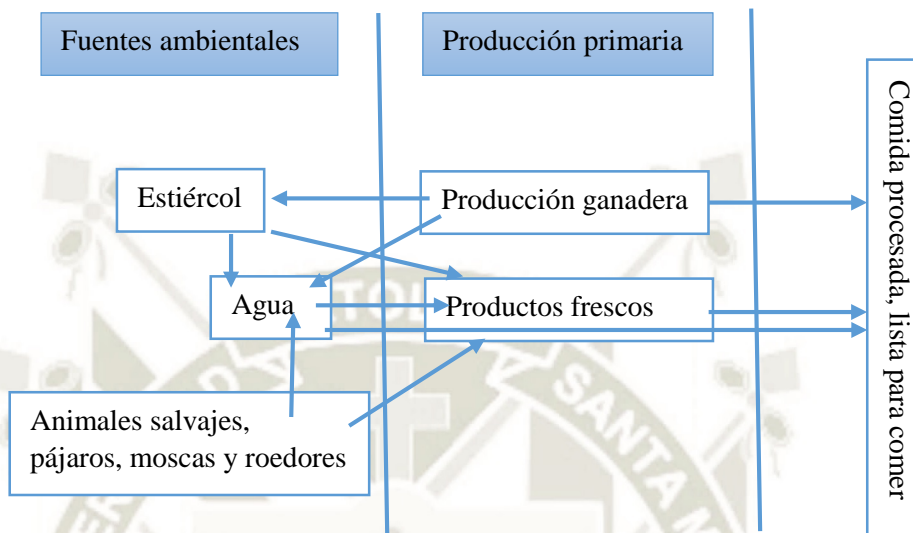


Figura 11. Representación esquemática de las posibles rutas de contaminación de fuentes contaminadas en las primeras etapas de la cadena alimentaria <sup>(68)</sup>.

### 3. MÉTODOS DE CONTROL DE BACTERIAS PATÓGENAS, EFECTIVIDAD Y DESVENTAJAS

Para el control de bacterias patógenas se han empleado diferentes tecnologías como intervención térmica, radiación gamma y UV, métodos físicos y control químico; las cuales tras su utilización deberán reducir las poblaciones microbianas a través de la medición del crecimiento de las mismas con diferentes métodos como el de las diluciones seriadas <sup>(86)</sup>, determinando así su efectividad. Basado en lo anterior, el control químico ha sido el más utilizado para controlar o eliminar bacterias patógenas en los alimentos <sup>(13)</sup>.

#### 3.1 CONTROL QUÍMICO

El control químico se conoce como el uso de sustancias químicas para matar o inhibir al patógeno en alguna etapa de su diseminación <sup>(87)</sup>, los compuestos químicos más utilizados son: cloro, ozono y agua ozonizada, peróxido de hidrógeno, ácido peroxiacético y plaguicidas o agentes antimicrobianos <sup>(88)</sup>.



### 3.3.1 CLORO

Los desinfectantes a base de cloro se consideran un biocida de elección para la industria alimentaria al tener la capacidad de desinfectar productos y herramientas utilizadas en el área de procesamiento <sup>(89)</sup>, también cuenta con un amplio espectro de actividad, ya que es capaz de repercutir en bacterias Gram Positivas como Gram Negativas además de presentar cierta actividad frente a los microorganismos formadores de esporas. Su mecanismo de acción recae en su carga, ya que el cloro es electronegativo lo que permite oxidar las uniones peptídicas provocando la desnaturalización de las proteínas <sup>(90)</sup>. García-Robles y *col.* <sup>(91)</sup> comprueban la efectividad del cloro a 10 y 20 ppm al reducir en un 100% a *E. coli*, además de probar con hipoclorito de sodio donde obtuvieron una eliminación del 99.3% y 99.54% a 10 y 20 ppm respectivamente. Sin embargo, actualmente los desinfectantes a base de cloro se indican como destructores de la microflora además del efecto perjudicial para la salud al formarse subproductos halogenados, como los trihalometanos y cloraminas, debido a su reacción con otros compuestos orgánicos <sup>(92)</sup>.

### 3.1.2 OZONO Y AGUA OZONIZADA

El ozono es un oxidante 1.5 veces más potente que el cloro, muy corrosivo y no se acumula en tejidos grasos ni causa efectos crónicos, mutagénicos o cancerígenos <sup>(92)</sup> promoviendo su aplicación en alimentos y considerado como una sustancia GRAS (Generally Recognized Safe) <sup>(93)</sup>. Su aplicación permite inactivar múltiples microorganismos (como las bacterias) (Tabla 7) y bajo condiciones adecuadas de exposición en el lavado y almacenamiento de frutas y hortalizas, ha logrado extender la vida útil de anaquel preservando las características organolépticas <sup>(94)</sup> <sup>(95)</sup>. El ozono destruye la pared celular y membrana plasmática de las bacterias mediante una oxidación progresiva demostrando su acción en BP como *L. monocytogenes* y *S. enteritidis*. y a pesar de que no genera ningún subproducto, es un gas inestable que solo debe estar expuesto con el alimento por 4 minutos con una concentración máxima de 0.4 mg/L, además que su producción *in situ* requiere de una gran inversión de capital por su tecnología costosa <sup>(96)</sup> <sup>(97)</sup> (Figura 12).

Tabla 7. Comparación de la resistencia de diferentes microorganismos a la inactivación con ozono <sup>(47)</sup>.

<i>Organismos</i>	<i>pH</i>	<i>Temp.</i> (°C)	<i>Concentración</i> (mg/L)	<i>Tiempo</i> (min)
<i>Escherichia coli</i>	7.2	1	0.007	0.083
	7.2	1	0.065	0.33
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	7.0	24	0.8 – 1.08	0.58
	7.2	20	0.15	0.5
<i>Poliovirus 1</i>	7.2	20	0.15	0.5
	7.2	5	0.15	1.47
<i>Poliovirus 2</i>	7.2	20	0.15	0.83
<i>Giardia muris</i>	7.0	25	0.03 – 0.15	9.0 - 1.8
	7.0	5	0.15 – 0.7	12.9 – 2.8
<i>Naegleria gruberi</i>	7.0	25	0.3 – 1.2	4.3 – 1.1
	7.0	5	0.55 – 2.0	7.8 – 2.1
<i>Entamoeba histolytica</i> (quiste)	7.5- 8.0	19	0.7 – 1.1	<5.0

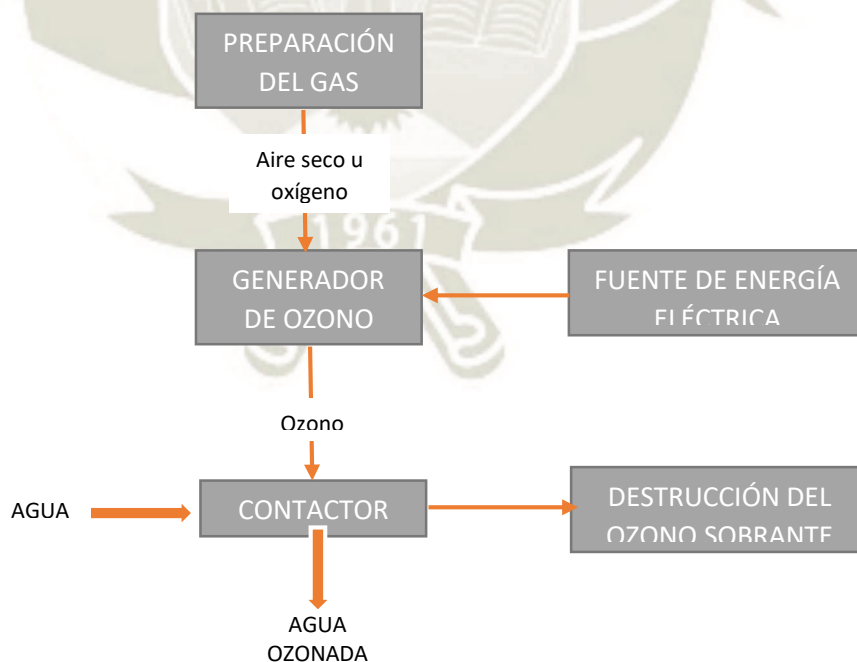


Figura 12. Componentes básicos del proceso de ozonización <sup>(47)</sup>.

### 3.1.3 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Utilizado ampliamente como biocida, el peróxido de hidrógeno es una solución relativamente segura ya que, al momento de descomponerse, libera agua y oxígeno los cuales son subproductos no tóxicos. Su amplio espectro de toxicidad, que incluye endosporas bacterianas, además de su nula toxicidad al ambiente son sus principales ventajas; las que han permitido su uso en superficies, ambientes y sobre todo alimentos frescos <sup>(98)</sup> <sup>(99)</sup>. Según revisiones generales, su mecanismo de acción se da por ser un agente oxidante y producir radicales hidroxilos que serán eficaces al momento de reducir patógenos en frutas y verduras como uva, ciruelas, manzana, naranja, champiñones, melón, tomate, pimiento rojo y lechuga además de prolongar su vida útil sin dejar residuos, que puedan generar una pérdida en la calidad del producto <sup>(89)</sup>. El problema de este compuesto radica es que no es considerado una sustancia GRAS por lo cual cualquier ingestión provoca dolor de garganta, dolor abdominal, náuseas y vómitos <sup>(100)</sup>.

### 3.1.4 ÁCIDO PEROXIACÉTICO

Este compuesto, producto de la combinación del ácido peracético y peróxido de hidrógeno, ha demostrado ser un fuerte antioxidante efectivo para el control de microorganismos patógenos. Inicialmente se utilizó para la desinfección de superficies destinadas a la preparación de alimentos con dosis de 85 ppm <sup>(92)</sup> <sup>(93)</sup>, años después se vio factible el utilizarlo como solución de lavado para los alimentos ya que la principal ventaja del compuesto es el gran espectro biocida además de ser efectivo en un rango amplio de temperaturas y pH entre 1 y 8 <sup>(89)</sup>, permitiendo un mayor empleo en frutas y hortalizas. Se ha probado su efectividad para controlar *E. coli*, *Salmonella spp.* y *L. monocytogenes* en productos como melones, espárragos, lechuga, fresas, zanahorias y manzanas <sup>(101)</sup> <sup>(65)</sup> <sup>(102)</sup>. El mecanismo de acción de este compuesto radica en la oxidación por medio de una transferencia de electrones, mientras más oxidante es el compuesto mayor es la transferencia lo que provoca la inactivación o eliminación de las células. Sin embargo, este mecanismo ha puesto en duda que no sea riesgoso para la salud humana habiendo reportes sobre la posible producción de radicales libres y subproductos orgánicos halogenados <sup>(103)</sup>.



### 3.1.5 PLAGUICIDAS Y AGENTES ANTIMICROBIANOS

Los plaguicidas y agentes antimicrobianos son compuestos sintéticos con alto poder biocida destinados a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga. Su clasificación varía de acuerdo a la plaga que controla que en nuestro caso son los bactericidas además del modo de acción, estrategia de uso, familias químicas, grado de toxicidad, época de aplicación y tipo de formulación <sup>(104)</sup>. El mecanismo de acción para los bactericidas es amplio ya que hay diferentes maneras de afectar la pared celular bacteriana: en diferentes etapas de síntesis, transporte de sus precursores metabólicos o por acción directa sobre su organización estructural <sup>(105)</sup>.

Gracias a esto han adquirido un papel preponderante en la protección de cultivos, sin embargo, su empleo intensivo ha provocado efectos negativos sobre el ambiente al eliminar a los enemigos naturales de los organismos nocivos causándoles la muerte o reduciendo las poblaciones que les sirven de alimento, provocando alteraciones en el ecosistema <sup>(14)</sup>. Otros efectos considerados son la resistencia de plagas y los efectos adversos sobre la salud de las personas que entran en contacto con estos compuestos, ya que los contaminantes que desprenden tienen la característica de ser liposolubles y acumularse progresivamente en la grasa de los seres vivos causando efectos fisiológicos de largo plazo <sup>(106) (107)</sup>, lo que conlleva a la necesidad de buscar otras alternativas a las tradicionales a través de un manejo integrado de plagas, donde el control biológico despierta gran interés al buscar la preservación del ambiente y la inocuidad alimentaria.

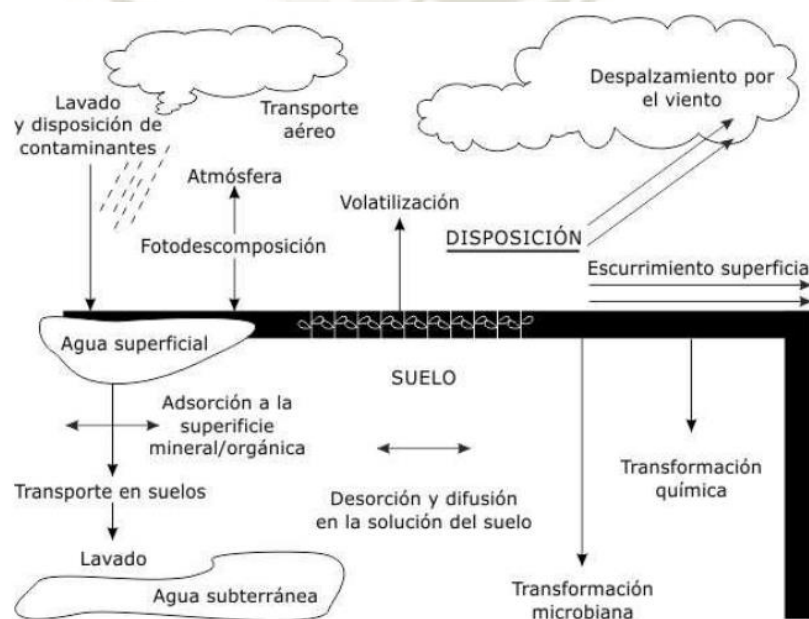


Figura 13. Introducción de los plaguicidas a la cadena alimentaria <sup>(107)</sup>.

En la Figura 13 se puede observar como los plaguicidas ingresan en las cadenas alimentarias y se distribuyen a través de ellas. Estos compuestos químicos se concentran en cada nicho ecológico y se acumulan sucesivamente hasta que alcanzan una concentración letal para algún organismo constituyente de la cadena, o bien hasta que llegan a niveles superiores de la red trófica.

## 2.2 CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico es el uso de organismos, o sus metabolitos o subproductos, que son considerados enemigos naturales y previenen, reducen o retrasan el desarrollo excesivo de las plagas <sup>(13)</sup> <sup>(14)</sup>. En países como México donde el 50% de pérdidas de toda la producción era provocado por patógenos, la aplicación de agentes de control biológico es crucial para promover la exportación de productos inocuos <sup>(108)</sup>. Los plaguicidas biológicos es una de las opciones más estudiados destacando a *Bacillus thuringiensis*, al ser la combinación de un control biológico con la ingeniería genética, sin embargo, esta tecnología se utiliza más para insectos que para bacterias <sup>(14)</sup>. Los bacteriófagos también son un método prometedor y se describieron inicialmente en 1900 al prevenir y tratar con éxito BP como *Salmonella*, *Shigella* y *Staphylococcus spp.* sin embargo, actualmente es más estudiado en *E. coli* O157-H7 por su capacidad de lisar cultivos a 4 y 37°C <sup>(109)</sup>.

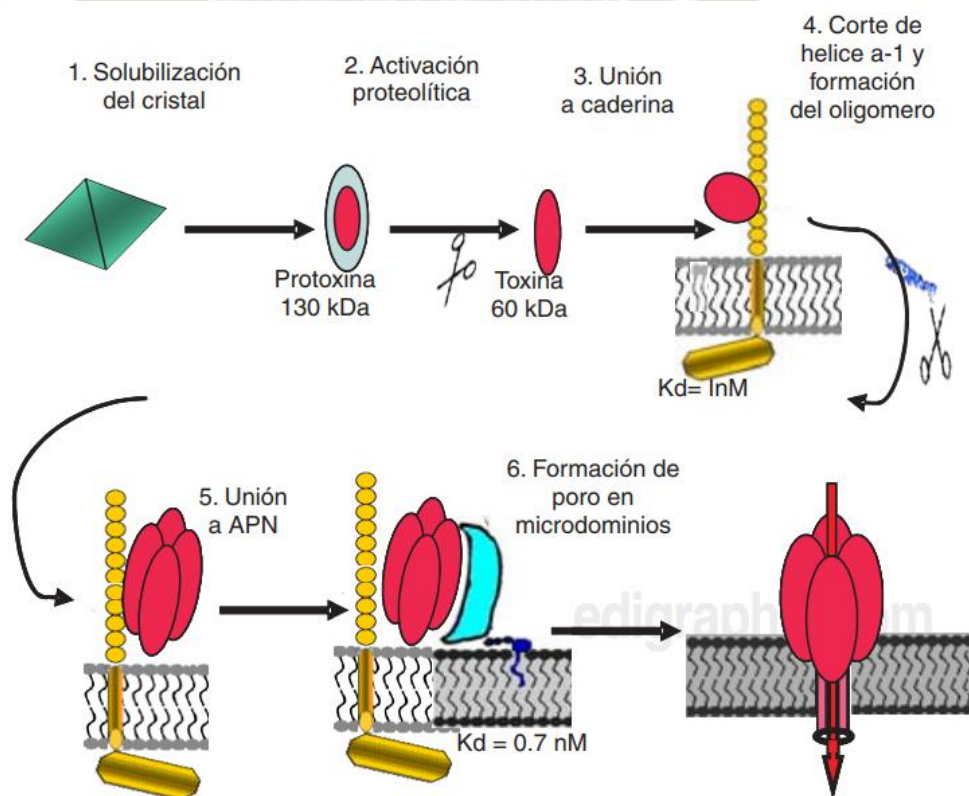


Figura 14. Mecanismo de acción de las toxinas *Cry* de *Bacillus thuringiensis* <sup>(108)</sup>.



El mecanismo de acción de las toxinas *Cry* es muy complejo, se necesitan varios pasos y sería imposible que esta toxina evolucionara para tener efecto en organismos mamíferos, en otros animales o en plantas. Para el caso de las toxinas *Cry* activas contra mosquitos, la bacteria *Bti* que sintetiza estas toxinas también sintetiza a las proteínas *Cyt*, estas interaccionan con la membrana de las células del intestino y se insertan formando un poro que termina por romper las células y posteriormente matar al insecto <sup>(108)</sup>.

A pesar de que se ha invertido gran cantidad de esfuerzos para el estudio y desarrollo de agentes de control biológico, lamentablemente su uso comercial y producción a gran escala aún es limitado por las tecnologías, en algunos casos, costosas <sup>(14)</sup>. Esto ha desencadenado la profundización de nuevos métodos biológicos a través de compuestos que no pretendan ser riesgosos para el ambiente o la salud humana además de ser económicas.

### **2.3 COMPUESTOS BIODEGRADABLES COMO ALTERNATIVAS NATURALES DE CONTROL**

En los últimos 10 años, los compuestos biodegradables han sido la fuente de diferentes productos aplicados para el empaque de alimentos o destinados a la agricultura, ya que su uso requiere de menos energía no renovable con respecto a otros compuestos <sup>(110)(111)</sup>. Existen muchos productos que pueden tener propiedades antimicrobianas en los que destacan el quitosano, las ceras y la extracción de aceites esenciales a partir de productos vegetales; todos estos han logrado prolongar la vida útil de los alimentos, reduciendo riesgos para la salud humana y pérdidas económicas a la agricultura debido a la presencia de BP <sup>(112)(113)</sup>.

#### **3.3.1 QUITOSANO**

La quitina es un compuesto biodegradable que ha logrado un mayor enfoque al extraerse de desechos orgánicos como los exoesqueletos de los crustáceos obteniendo un producto con propiedades antimicrobianas denominado quitosano <sup>(114)</sup>. El quitosano es un aminopolisacárido obtenido de la desacetilación parcial de la quitina por un fuerte tratamiento alcalino junto a altas temperaturas <sup>(115)(116)</sup>, durante este proceso se eliminan los grupos acetilo (Figura 14) y a la vez se produce una reacción de despolimerización, siendo el grado de desacetilación y el porcentaje molar las propiedades fisicoquímicas más importantes que diferencian a la quitina del quitosano además de que este último



presenta la característica de ser soluble en ácidos orgánicos <sup>(117) (118) (119) (120)</sup>, estimándolo como un biomaterial muy versátil y con aplicaciones promisorias <sup>(121)</sup>.

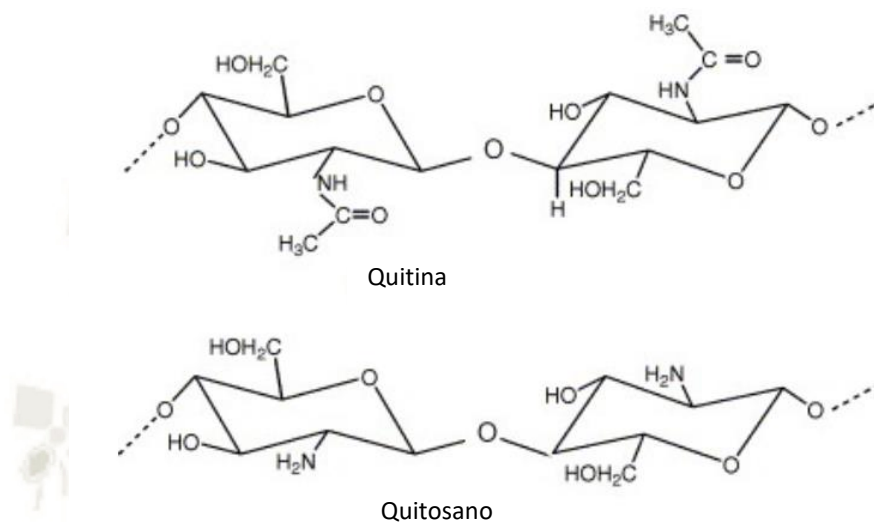


Figura 15. Estructuras químicas de quitina y quitosano <sup>(122)</sup>.

Las propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad y seguridad del quitosano han despertado el interés del campo biotecnológico, farmacéutico y de la biomedicina <sup>(123)</sup>, aunque su poder antimicrobiano ha tenido mayor impacto en la conservación de alimentos, así como la reducción del uso de conservantes químicos <sup>(124) (125)</sup>. Los efectos bacteriostáticos y bactericidas del quitosano involucran los grupos aminos cargados positivamente ( $-\text{NH}_3^+$ ) de este compuesto y los grupos carboxilato cargados negativamente ( $-\text{COO}^-$ ) de la superficie de las membranas bacterianas, las cuales al momento de unirse, alterarán la distribución de las cargas llevando al debilitamiento y/o ruptura de la membrana celular <sup>(126) (127)</sup> (Figura 15), esto se ha logrado confirmar por estudios de microscopía electrónica y microscopía de fuerza en donde se logra visualizar con gran facilidad este fenómeno <sup>(128) (129)</sup>.

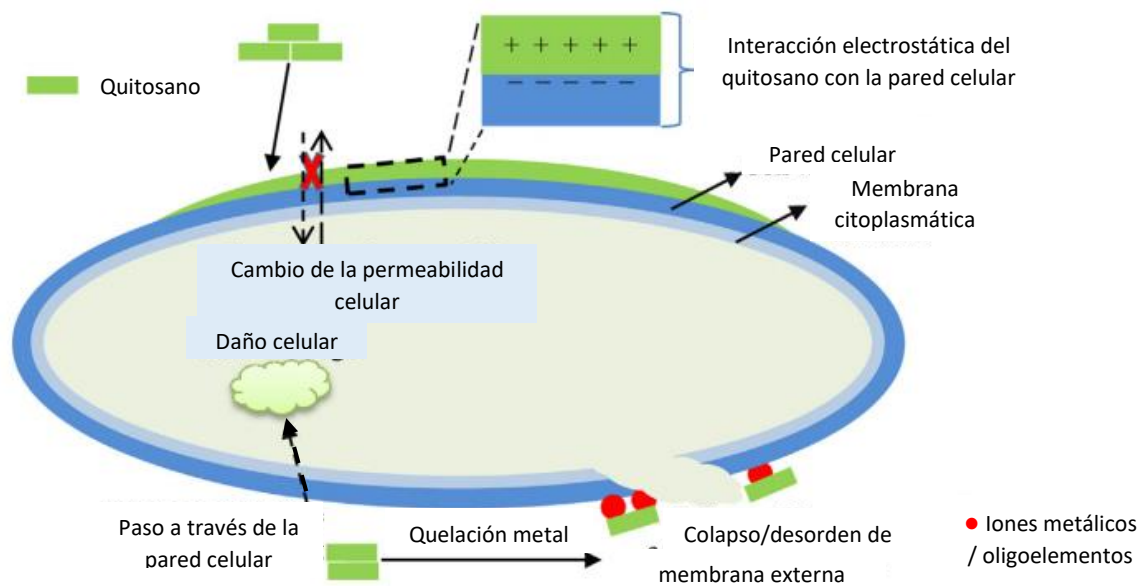


Figura 16. Representación esquemática de los efectos antimicrobianos del quitosano (130).



Figura 17. Representación esquemática del mecanismo de acción del quitosano sobre bacterias Gram Negativas y Gram Positivas (131).

Si bien este mecanismo es fuerte como para inhibir BP, en la Tabla 2 podemos observar que el sinergismo del quitosano con otros compuestos químicos y naturales puede potencializar su acción antimicrobiana o mantener las características organolépticas de los alimentos en donde serían aplicados. Para descartar el uso de compuestos químicos totalmente, las investigaciones hacen hincapié en la combinación del quitosano con compuestos naturales para obtener estos mismos efectos.

Tabla 8. Efectos del quitosano y otros compuestos naturales sobre BP de importancia en inocuidad alimentaria (Fuente propia)

Polímero	Aditivos	Bacteria patógena	Metodología	Efecto antimicrobiano del aditivo	Referencia
Quitosano	Almidón		Método de zona de inhibición	Influye más la naturaleza policatiónica del quitosano	Shen y col. (216)
	Aceite esencial de orégano		Método de zona de inhibición	Compuesto fenólico carvacrol y monoterpeno p-cimeno del orégano	Pelissari y col. (217)
	Lactoferrina	<i>E. coli</i>	Ensayo de difusión en agar y recuento celular	Actividad quelante como hierro de la lactoferrina, sin embargo, se necesita del sinergismo de otros componentes	Brown y col. (218)
	Lisozima		Cuantificación log UFC	Actúa sobre el peptidoglicano en las paredes celulares y provoca la lisis celular	Duan y col. (219)
	Ácidos orgánicos y EDTA		Cuantificación log UFC/mL	Interferencia del EDTA respecto a los polisacáridos de la membrana	Chung y col. (220)
	Aceite de orégano		Cuantificación log UFC/cm <sup>2</sup>	Concentración de compuestos volátiles	Sánchez y col. (221)
	Lactoferrina	<i>L. monocytogenes</i>	Ensayo de difusión en agar y recuento celular	Actividad quelante como hierro de la lactoferrina, sin embargo, se necesita del sinergismo con otros componentes	Brown y col. (218)
	Hidroxipropil		Porcentaje de reducción de las UFC	Influye más la naturaleza policatiónica del quitosano	Möller y col. (222)
	k-Carragenina, Extracto de mostaza más EDTA		Cuantificación log UFC/g	Alto contenido fenólico de la mostaza	Olaimat y Holley (223)
	Aceite de orégano	<i>Salmonella spp.</i>	Método de zona de inhibición	Compuesto fenólico carvacrol y monoterpeno p-cimeno del orégano	Pelissari y col. (217)



### 3.3.2 CERA DE ABEJA

La cera de abeja es ampliamente utilizada como un aditivo para mantener la calidad de un producto gracias a su alta hidrofobicidad y excelente resistencia a la humedad además de ser de gran interés en la industria alimentaria por no ser tóxico para el ser humano <sup>(132)</sup>; contiene ácidos libres, ésteres y otros componentes naturales que aportan propiedades emulsificantes, plasticidad y un olor agradable. Esto ayudará a mantener características organolépticas de los alimentos, aunque también se ha demostrado su propiedad antimicrobiana al estudiarse otros componentes como los propóleos, que están formados por cera de abeja, resinas y en su mayoría por flavonoides, estos poseen una acción directa sobre la membrana de algunas BP reduciendo su permeabilidad <sup>(133)</sup> <sup>(134)</sup>.

Se ha reportado su estudio junto con hidroxipropimetilcelulosa sobre mango, ciruelas, naranjas y mandarinas considerándose la proporción entre ambos como el factor con mayor repercusión en la calidad postcosecha de estos frutos <sup>(135)</sup> <sup>(136)</sup>. Estudios realizados por Tosne y col. <sup>(137)</sup> mencionan que un recubrimiento de almidón con cera de abeja al 1.5% permitió una conservación del fruto de *Bactris gasipaes* de 16 días con respecto a los 12 días del control además de reducir la pérdida de peso y firmeza, retrasando el desarrollo de la madurez y la tasa de respiración, manteniendo de esta manera las características físicas del fruto. Ramos-García y col. <sup>(18)</sup> evaluaron la actividad antimicrobiana de recubrimientos a base de quitosano con la adición de la cera de abeja 0.1% y aceite esencial de lima y tomillo al 0.1% permitiendo la inhibición completa de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

### 3.3.3 ÁCIDO OLEICO

El ácido oleico es un ácido graso mono insaturado encontrado de forma natural en muchas plantas y algunos productos de origen animal. Es considerado como una grasa natural saludable y el componente principal de muchos aceites vegetales, especialmente en el aceite de oliva <sup>(138)</sup>. Se sabe que la actividad antimicrobiana recae en los polifenoles además se ha podido observar actividad antimicrobiana por parte de los ácidos grasos y monoglicéridos (Figura 18) frente a un amplio rango de bacterias y levaduras <sup>(139)</sup> <sup>(140)</sup>, adicionando su notable actividad frente a patógenos del tracto intestinal. <sup>(141)</sup> Vargas y col. <sup>(142)</sup> concluyeron que recubrimientos a base de quitosano adicionado con ácido oleico al 2 y 4% incrementaban el poder antimicrobiano del quitosano además de tener mayor resistencia al vapor de agua y disminuir la tasa de respiración de fresas durante su

almacenamiento. En un estudio realizado por Aguirre-Loredo y *col.* <sup>(143)</sup> un recubrimiento de quitosano de 10 g/L con la adición de ácido oleico al 3 y 6 g/L fue eficaz al no afectar la transferencia de vapor de agua. Por otro lado, Janakat y *col.* <sup>(144)</sup> mostraron la potente actividad antimicrobiana del aceite de oliva a una concentración de 60  $\mu\text{L}/\text{mL}$  a 10°C al reducir en un 100% las poblaciones iniciales de *L. monocytogenes*, *E. coli* O157-H7 y *S. enteritidis* después de 7 días; obteniendo resultados similares con una concentración de aceite de oliva de 80  $\mu\text{L}/\text{mL}$  a 37°C en las mismas BP.

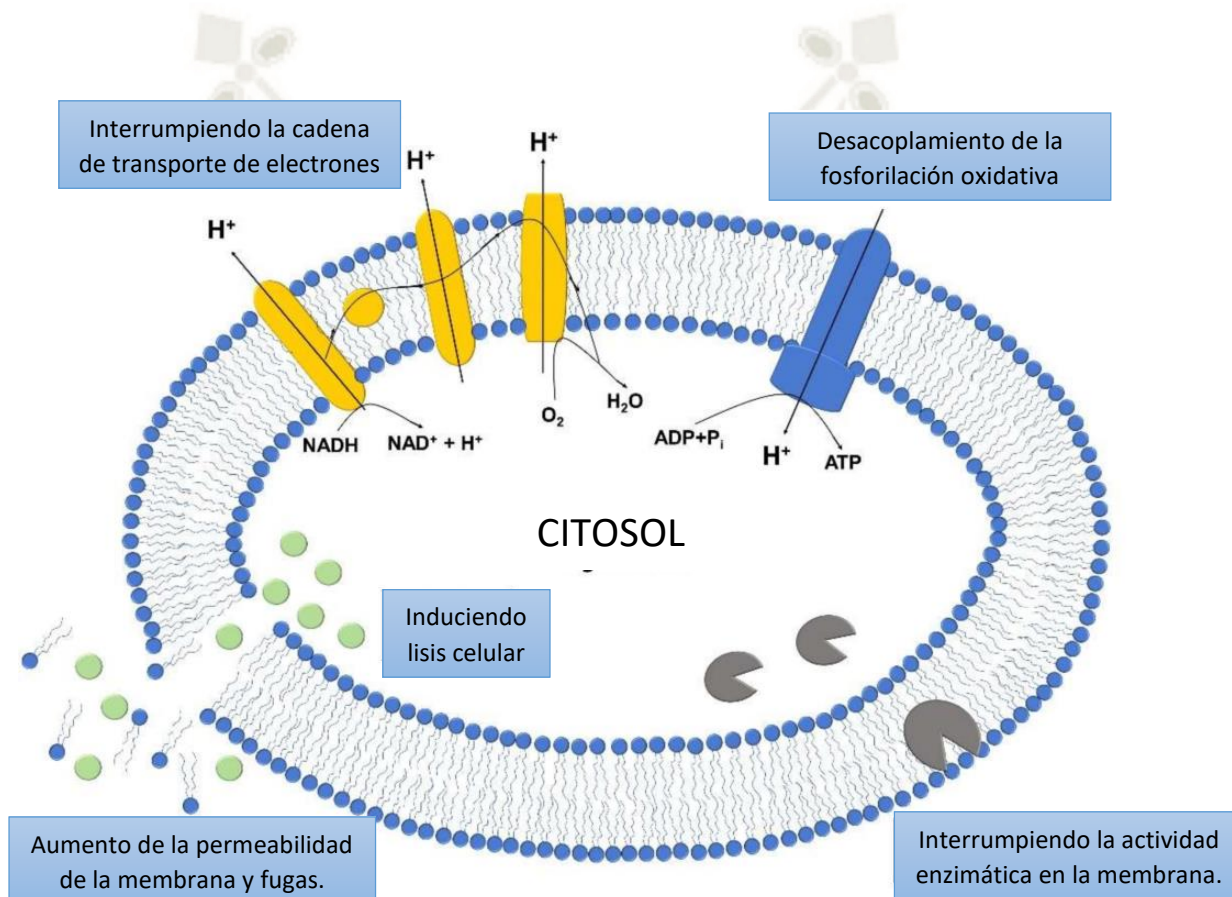


Figura 18. Representación esquemática de los mecanismos detrás de la actividad antibacteriana de los ácidos grasos y los monoglicéridos <sup>(145)</sup>.

### 3.3.4 ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son líquidos oleosos aromáticos provenientes de una mezcla de compuestos fenólicos, terpenoides, alcoholes, aldehídos y otros compuestos bioactivos importantes, que se han aplicado ampliamente para una variedad de propósitos durante miles de años <sup>(146)</sup>. Varios reportes han probado sus propiedades antimicrobianas, antifúngicas, insecticidas, antioxidantes y antiinflamatorias <sup>(147)</sup> <sup>(148)</sup> <sup>(149)</sup> (Figura 19) por lo que su aplicación a la conservación de cultivos y alimentos post cosecha no se hizo



esperar. Se han encontrado numerosas investigaciones del efecto antibacterial de los aceites esenciales, sin embargo, aquellos derivados de frutos cítricos han sido más estudiados por contar con más de 40 compuestos implicados en la actividad antibacteriana, encontrando la mayoría de ellos en las cáscaras propiciando una extracción de aceites económicamente viable <sup>(146)</sup> <sup>(150)</sup> (Tabla 9).

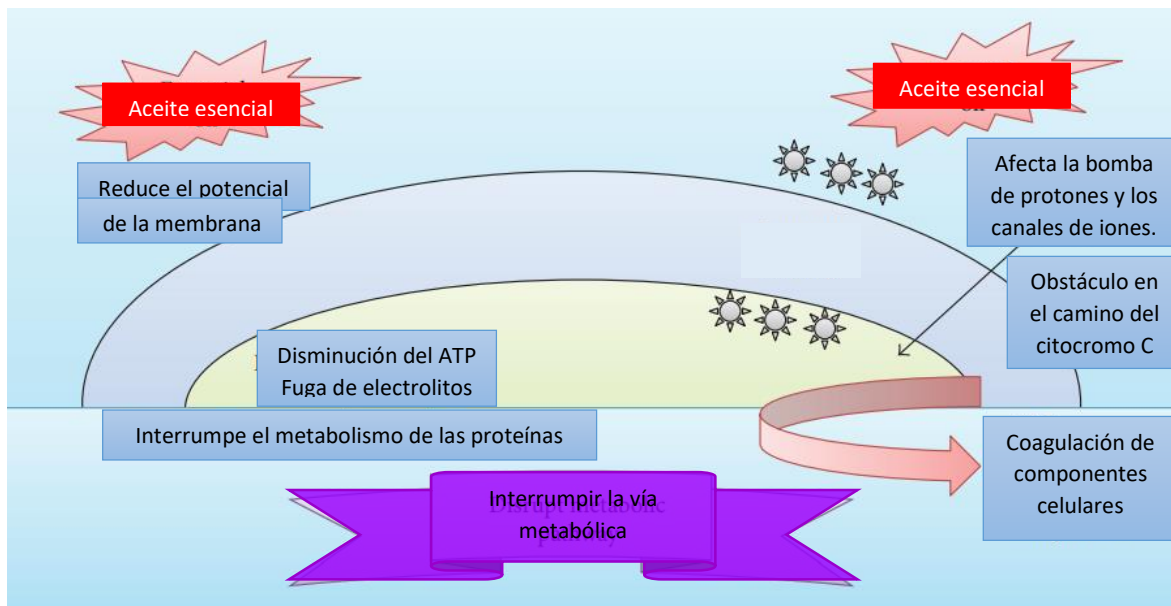


Figura 19. Mecanismo antimicrobiano de los aceites esenciales en microorganismos <sup>(155)</sup>.

En la Figura 19 podemos observar como los aceites esenciales desestabilizan la arquitectura celular, lo que lleva a la ruptura de la integridad de la membrana y al aumento de la permeabilidad, lo que interrumpe muchas actividades celulares incluida la producción de energía (acoplado a la membrana), el transporte de la membrana y otras funciones reguladoras metabólicas. La interrupción de la membrana celular por los aceites esenciales puede ayudar a varios procesos vitales, como los procesos de conversión de energía, el procesamiento de nutrientes, la síntesis de macromoléculas estructurales y la secreción del regulador del crecimiento <sup>(155)</sup>.

Settani y *col.* <sup>(151)</sup> evaluaron la actividad antibacterial de 23 especies de cítricos, y de los cuales sólo 2 extraídas del limón que diferían en la variedad, lograron zonas de inhibición entre 9mm y 15mm en las 42 cepas de *L. monocytogenes* que se trataron en su investigación. En 2006, Prabuseenivasan y *col.* <sup>(152)</sup> determinaron una zona de inhibición de 21.6 mm y 18.9 mm del aceite esencial de limón a concentraciones 1:1 y 1:5 respectivamente sobre *E. coli*, este resultado se confirma por Öntaş y *col.* <sup>(153)</sup> quienes



obtuvieron zonas de inhibición mayores a 15 mm utilizando aceite esencial de limón al 10% contra BP Gram Negativas. Todas estas investigaciones juntos con aquellas donde el aceite esencial de limón ha logrado mantener las características organolépticas y fisicoquímicas de alimentos frescos, como el jitomate <sup>(154)</sup>, han despertado grandes expectativas para buscar un producto donde se puedan englobar varios compuestos naturales aprovechando sus características antimicrobianas y propiciando el sinergismo entre ellos.

Tabla 9. Principales compuestos solubles en agua e insolubles en agua presentes en el aceite esencial de cítricos <sup>(156)</sup>.

<i>Componentes solubles en agua</i>	<i>Componentes insolubles en agua</i>	
Alcohol metílico	Alcanfor	Limoneno
	Octanal	Ocimeno
Alcohol etílico	1-Terpineno	b-pineno
	3-hexen-1-ol	Decanal
Sulfuro de hidrógeno	a-pinene	a-terpincol
	Ocimeno	Mirceno
Acetaldehído	Citronelal	Neral
	Carveol	Dodecanal
Ácido acético	Geranial	Nerolidol
	Carvone	Óxido de linalol
Furfural 1,4 – Ciclohexanediona	Citronelal	Geraniol
	Oxido linalool	Ácido cáprico
Acetona		Nerol

### 3. RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES

El avance de la tecnología ha permitido nuevas técnicas enfocadas a la conservación de frutas y hortalizas que les permitan mantener su inocuidad, preservar sus características originales y alargar su vida útil, ya que este último factor será vital para reducir en lo

máximo posibles pérdidas económicas <sup>(15)</sup> <sup>(16)</sup>, abriendo un campo satisfactoriamente para los recubrimientos comestibles (RC).

#### 4.1 DEFINICIÓN

Los RC son una matriz continua y delgada que se adhiere a la estructura del alimento, con una o varias capas finas del material elaborado, y que en algunos casos son biopolímeros naturales de alto peso molecular <sup>(17)</sup> <sup>(157)</sup>, pudiéndose aplicar por inmersión, pulverización o filtración <sup>(158)</sup>. La práctica del uso de los recubrimientos, tanto en frutas como hortalizas, es muy antigua y se desarrolló en un inicio para imitar las cubiertas naturales de los productos vegetales existiendo reportes que datan de los siglos XII y XIII, en los cuales China realizaba la inmersión de naranjas y limas en cera para retardar la pérdida de agua <sup>(15)</sup> <sup>(159)</sup>, esto se relaciona con la finalidad actual de los RC, ya que crean una atmosfera modificada que reduzca la velocidad de transpiración además de formar una barrera semipermeable a los gases y vapor de agua retrasando así el deterioro del producto y alargando su vida útil <sup>(160)</sup> (Figura 20). De esta manera, los RC han demostrado ser herramientas útiles para mejorar la calidad de los alimentos frescos, y al estar elaborados de compuestas GRAS, pueden ser ingeridos sin pensar en un efecto adverso <sup>(161)</sup> <sup>(160)</sup>.

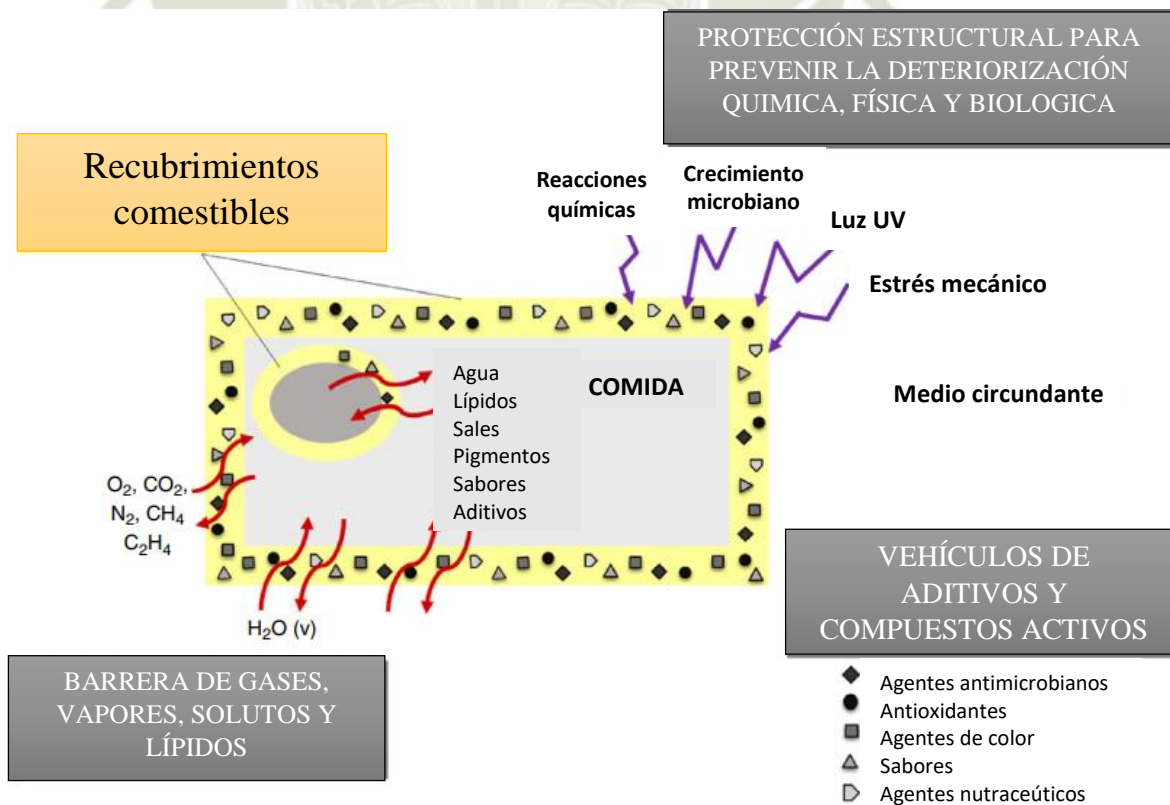


Figura 20. Principales funciones de los recubrimientos comestibles <sup>(162)</sup>.

## 4.2 TIPOS DE RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES

Los recubrimientos pueden estar elaborados a partir de compuestos naturales o de subproductos de industrias agroalimentarias; teniendo siempre una base que puede venir de fuentes renovables como proteínas, lípidos y polisacáridos las cuales cuentan con características propias que permiten el éxito en su uso <sup>(163)</sup> (Figura 21).

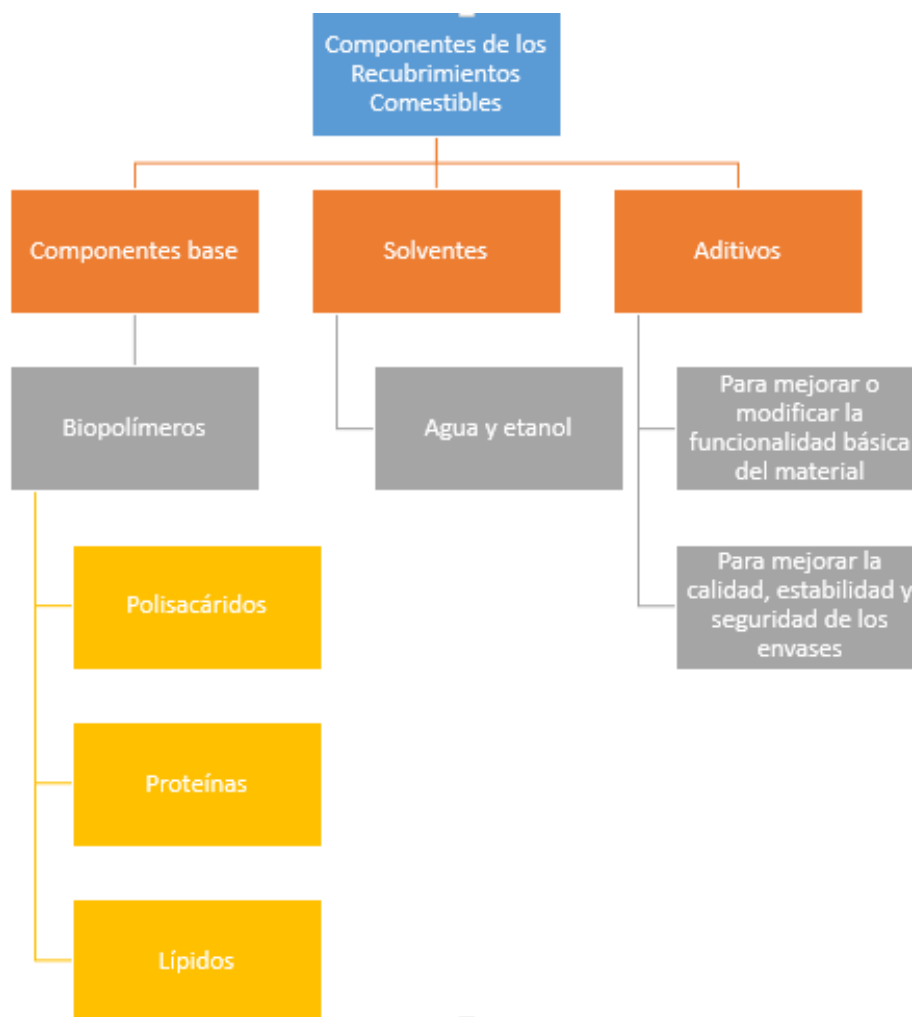


Figura 21. Composición de los recubrimientos comestibles <sup>(162)</sup>.

### 4.2.1 PROTEÍNAS

Los recubrimientos a base de proteínas más comunes son: gelatina, caseína, lactosuero, colágeno, zeína, gluten de trigo y proteína de soja, las cuales formaran redes macromoleculares que permitan la estabilización de la estructura de sus compuestos permitiendo tener una mejor propiedad de barrera ante los gases, sin embargo, es susceptible a la humedad por su naturaleza hidrofílica <sup>(164)</sup><sup>(165)</sup> (Tabla 10).



Tabla 10. Algunos recubrimientos a base de proteínas para diferentes productos alimenticios con funciones significativas <sup>(166)</sup>.

<i>Recubrimiento con aditivos</i>	<i>Producto alimenticio</i>	<i>Funciones significativas</i>
Recubrimientos de gluten y zeína con caseinato de potasio, caseína de cuajo, goma xantana, aditivos de algarrobo	Filetes de trucha	Atributos sensoriales y las cualidades bioquímicas físicos.
Recubrimientos de proteína de suero con orégano, aceites esenciales de clavo y aditivos de glicerol	Filetes de pechuga de pollo	Mejore la calidad y extienda la vida útil de la pechuga de pollo y minimice el efecto antimicrobiano
Recubrimientos de caseinato de sodio con sorbitol, aditivos de glicerol.	Cactus de baya	Contenidos fitoquímicos

#### 4.2.2 LÍPIDOS

Aquellos RC hechos de lípidos tienen como fuentes más usadas las ceras, aceites esenciales de vegetales y los ácidos grasos que poseen puntos de fusión altos, todos ellos tienen la ventaja de reducir la deshidratación de los productos presentando una escasa permeabilidad al agua, pero su limitación radica en la pobre resistencia mecánica en comparación con RC a base de polisacáridos <sup>(167)(17)</sup> (Tabla 11).

Tabla 11. Algunos recubrimientos a base de lípidos para diferentes productos alimenticios con funciones significativas <sup>(166)</sup>.

<i>Recubrimiento con aditivos</i>	<i>Producto alimenticio</i>	<i>Funciones significativas</i>
Recubrimientos de cera de candelilla con aceite mineral	Fruta de guayaba	Pérdida de peso de emisión de etileno, brillo, retención del color, firmeza
Cera de carnauba	Manzana	Incremento de la resistencia al vapor de agua y reducción de pérdida de peso
Revestimientos de cera de abeja con aditivos de glicerol	Salchicha seca	Reducción en la pérdida de peso
Recubrimiento a base de lípidos con ácido esteárico, (PGPR) y aditivos de mantequilla	Tabletas de caramelo	Propiedades de barrera contra la humedad

### 4.2.3 POLISACÁRIDOS

Este último es más utilizado para su aplicación en frutas gracias a su propiedad de adherencia y flexibilidad sobre la superficie de productos hortofrutícolas <sup>(168)</sup> <sup>(17)</sup>, destacando al quitosano como los polisacáridos más estudiados por su buena disponibilidad en la naturaleza. Los recubrimientos con quitosano son resistentes, duraderos y flexibles logrando adquirir propiedades mecánicas similares a los polímeros comerciales <sup>(169)</sup> además de resistir la formación de biopelículas de bacterias y levaduras, reduciendo en un 95 a 99.99% las poblaciones de células viables <sup>(170)</sup>. Estudios diversos han demostrado la capacidad de mezclar diversos compuestos naturales en un solo recubrimiento con el fin de lograr un sinergismo que potencialice las propiedades antimicrobianas o mantenga las propiedades organolépticas del producto, incrementando su eficacia como conservador <sup>(171)</sup> (Tabla 12).

Tabla 12. Algunos recubrimientos a base de polisacáridos para diferentes productos alimenticios con funciones significativas <sup>(166)</sup>.

<i>Recubrimiento con aditivos</i>	<i>Producto alimenticio</i>	<i>Funciones significativas</i>
K-carragenina o tapioca revestimientos de almidón con potasio, ácido ascórbico, ácido cítrico, glicerol	Calabaza fortificada	Color y actividades antimicrobianas
Recubrimientos de alginato, pectina y gellan con goma desacidada, metoxil pectina, sal de potasio esterificada, glicerol, aditivos de cloruro de calcio.	Melones recién cortados	El efecto en la vida útil del melón recién cortado
Polisacárido de goma de árbol de A. occidentale L. con sorbitol, Tween 80 aditivos	Manzanas	Mejora la permeabilidad al vapor de agua, la opacidad y las propiedades mecánicas
Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y recubrimientos de cera de abeja con ácido oleico, aditivos de glicerol	Tomates cherry	Pérdida de peso, color de la cáscara, firmeza de la fruta, tasa de respiración
Recubrimientos de goma xantana con aditivos de ácido cinámico	Pera recién cortada	Atributos de calidad (color, firmeza, pérdida de peso, pérdida de agua) de pera almacenada a 4C

### 4.3 BENEFICIOS DE SU APLICACIÓN

Han surgido varias investigaciones con respecto a los recubrimientos con el fin de generar mucho más conocimiento en base a este rubro. Con respecto a las propiedades organolépticas o fisicoquímicas del fruto, McHugh y Senesi <sup>(158)</sup> elaboraron un recubrimiento mezclando puré de manzana y varios componentes lipídicos como ácidos grasos, alcoholes grasos, cera de abeja y aceite vegetal obteniendo excelentes resultados con respecto a las propiedades de barrera al O<sub>2</sub>, pero deficientes con la humedad. Perdomo e Insuasti <sup>(172)</sup> probaron con propóleo y proteína de soja sobre fresas obteniendo una menor tasa de respiración además de conservar el color del fruto durante el período de evaluación. Un RC sobre guayabas con sábila logró una pérdida de 3.31% menos con respecto al control <sup>(173)</sup> y en aguacate se ha aplicado un recubrimiento con 2% de almidón de yuca, que al cabo de 6 días de almacenamiento mostro 10.1% menos de pérdida <sup>(174)</sup>.

Ponce y col. <sup>(175)</sup> evaluaron un RC con quitosano y romero al 1% sobre la superficie de calabazas (*Cucurbita moschata Dutch*) ante el crecimiento de *L. monocytogenes*, presentándose un efecto inhibitorio limitado al no mostrar diferencias significativas. Otra investigación apuntó a formar un recubrimiento a base de carboximetilcelulosa junto con aceite esencial de orégano a 5000ppm con el fin de ser aplicado en papaya, logrando una mayor tasa de respiración del 15.5%, además de una pérdida de firmeza del 5.23% comparado con el 14% del control, y aunque no se consiguió reducir el peso de pérdida del producto ni la erradicación por completo de *Salmonella spp.*, si se disminuyó la carga microbiana y se retardó el crecimiento exponencial <sup>(176)</sup>.

Todas las investigaciones mencionadas proponen a los recubrimientos como metodología prometedora al mostrar resultados óptimos para la industria alimentaria, sin embargo, se debe continuar evaluando el sinergismo de compuestos naturales que tengan como respuesta la erradicación completa de BP, que hasta el día de hoy causan estragos mundiales por el continuo reporte de enfermedades, hospitalizaciones y/o muertes.



## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. MATERIALES

##### 1.1 INSUMOS

- Aceite esencial de limón
- Ácido acético
- Agua destilada
- Cera de abeja
- Cloro
- Etanol 70%
- Glicerol
- Quitosano

##### 1.2 MATERIALES DE LABORATORIO

- Asa de kolle
- Espátula
- Gradillas
- Micropipetas de 0.5-2  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$  y 100-1000  $\mu\text{L}$
- Pastillas de agitación
- Picetas
- Pipetas de 1mL y 5mL

- Puntas estériles blancas, amarillas y azules
- Tubos de centrifuga de plástico con tapa rosca 15mL
- Tubos eppendorf 1.5mL y 0.6mL

### 1.3 MATERIAL DE VIDRIO

- Beakers 100, 250 y 500 mL
- Matraces 100, 250 y 500 mL
- Perlas de vidrio
- Placas Petri 100 x 15 mm
- Probetas de 100mL
- Tubos de ensayo de vidrio 13 x 100 mm

### 1.4 MATERIAL BIOLÓGICO

- *Escherichia coli* DH5 $\alpha$
- *Escherichia coli* O157-H7
- *Listeria monocytogenes*
- *Salmonella enteritidis*
- *Shigella flexneri*

### 1.5 MEDIOS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO

- Agar Nutritivo
- Caldo Nutritivo

### 1.6 EQUIPOS DE LABORATORIO

- Autoclave Felisa FE-389
- Balanza analítica Velab VE-300
- Espectrofotómetro Hach
- Estufa Faithful WHL-125B
- Gabinete de Seguridad CrumaBio-1
- Hot Plate Cole-Parmer
- Incubadora a 37°C Felisa FE-133AD
- Refrigerador Samsung RTA3ENPP1/XEM

## 1.7 OTROS MATERIALES

- Agrofilm
- Fósforo
- Marcador indeleble
- Recipiente de plástico 500mL
- Programa estadístico MiniTab

## 2. METODOLOGIA

Esta investigación se realizó en las instalaciones de la Facultad de Nutrición de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y el Laboratorio de Diagnóstico y Servicio a la Agricultura de la Universidad Politécnica del Estado de Morelos, Cuernavaca, México.

### 2.1 DETERMINACIÓN DE LA DILUCIÓN IDEAL BACTERIANA

#### 2.1.1 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

##### 2.1.1.1 AGAR NUTRITIVO

Se pesó 96.4g de agar nutritivo que fueron depositados en 4 matraces de 1000mL y 1 matraz de 400mL, luego se agregó 900mL de agua destilada en los matraces más grandes y 180mL en más pequeño, a continuación, se llevaron a una parrilla de agitación con temperatura, y cuando el agar se disolvió por completo el medio se esterilizó en la autoclave a 121°C y 15 psi. Para el llenado de placas, primero se limpió la superficie de la campana de flujo laminar con alcohol al 70% y luego se dejó unos 15 minutos con luz UV, una vez que el medio se estabilizó a una temperatura de 40°C se distribuyó aproximadamente 20mL de en cada placa, luego de su completa solidificación se guardaron en un gabinete a 25°C.

##### 2.1.1.2 CALDO NUTRITIVO

Se pesó 1.2g de caldo nutritivo y se disolvieron en 150mL de agua destilada, con ayuda de una micropipeta de 5mL, se agregó 3mL por cada tubo sin cerrarse con la tapa



completamente. La esterilización del medio se realizó como se menciona anteriormente, y al finalizar este proceso, los tubos se cerraron por completo y se guardaron a 25°C.

### **2.1.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS**

Se utilizó 4 BP responsables de enfermedades de transmisión alimentaria: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella flexneri*; una de ellas con dos cepas: *E. coli* O157-H7 y *E. coli* DH5 $\alpha$ ; donadas por el Laboratorio de Diagnóstico y Servicio a la Agricultura de la Universidad Politécnica del Estado de Morelos. La patogenicidad de la cepa O157-H7 fue demostrada por el personal Laboratorio de Diagnóstico y Servicio a la Agricultura mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real tras detectar la toxina Shiga.

### **2.1.3 ACTIVACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS**

Se retiró de un congelador que oscilaba entre los -17 y -20°C las dos cepas de *E. coli* preservadas con glicerol al 50% y se llevó a una temperatura de 25°C durante 5 minutos para permitir su estabilización. Se limpió la superficie de la mesa con etanol al 70% y se prendió el mechero para establecer una atmósfera más estéril, después se inoculó 200  $\mu$ L de cada cepa en dos tubos diferentes de caldo nutritivo los cuales se dejaron durante 24 horas (overnight) a 37°C en la incubadora. Las bacterias restantes se retiraron de un refrigerador con una temperatura entre 1 y 3°C preservadas en caldo nutritivo, se repitió el mismo procedimiento de estabilización, activación e incubación cambiando sólo la utilización de un asa de Kolle en vez de una micropipeta.

### **2.1.4 METODOLOGÍA DE DILUCIONES SERIADAS**

Se llevó un tubo de caldo nutritivo al equipo de densidad óptica para mantener la absorbancia en 0.00, luego se agregó entre 800  $\mu$ L y 1.2 mL del tubo con *E. coli* DH5 $\alpha$  activada y una vez que la densidad óptica se estabilizó a 0.100 $\pm$ 0.002 a 600 nm se procedió con la metodología de diluciones seriadas. Se rotuló 18 tubos eppendorf, 4 series y 6 por cada una, en la escala de 10<sup>-1</sup> y 10<sup>-6</sup> luego se agregó a cada uno 135  $\mu$ L de caldo nutritivo y se tomó 15  $\mu$ L del inóculo que se estableció a 0.100 $\pm$ 0.002 a 600nm, se cerró el tubo, se homogenizó y luego se retiró 15  $\mu$ L del tubo de 10<sup>-1</sup> y se agregó al tubo 2 o de

$10^{-2}$  y así sucesivamente hasta llegar a la dilución de  $10^{-6}$ . Se repitió el mismo procedimiento para todas las series, y una vez preparadas las diluciones se tomó 100  $\mu\text{L}$  de las últimas diluciones ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ) y se agregaron a placas petri con agar nutritivo previamente rotuladas, para finalizar se agregó aproximadamente 10 perlas de vidrio las cuales permitieron la distribución homogénea del inóculo sobre la placa y se dejó durante 1 hora y media (Figura 22). Una vez que las placas secaron, se retiró las perlas de vidrio y se dejaron en un vaso de precipitados con cloro para inactivarlas, luego se cerró las placas y se dejó en incubación por 24 horas. Una vez terminado el tiempo de incubación, se procedió a contar las UFC formadas en cada placa, por cada serie y cada repetición, con el fin de determinar la o las diluciones ideales a trabajar.

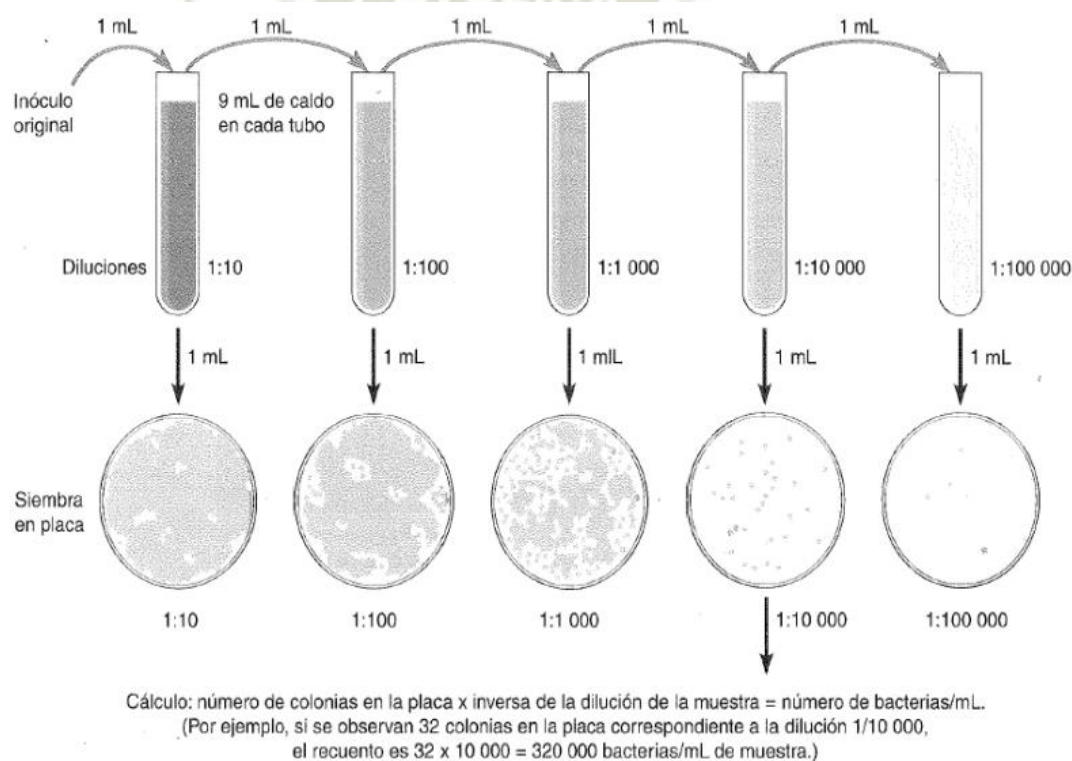


Figura 22. Recuento en placa y diluciones seriadas <sup>(86)</sup>.

## 2.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS RECUBRIMIENTOS A BASE DE QUITOSANO CON LA ADICIÓN DE COMPUESTOS NATURALES:

### 2.2.1 PREPARACIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS

Los componentes de los recubrimientos fueron donados por la Facultad de Nutrición de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, México. Cada formulación se efectuó teniendo en cuenta las concentraciones establecidas en la Tabla 13. Para la

primera formulación se pesó 2g de quitosano y se agregó a un vaso de precipitados que contenía 197mL de ácido acético, la solución fue llevada a la parrilla de agitación con revoluciones constantes; después se agregó 0.6mL de glicerol y se controló la temperatura del vaso hasta que llegó a los 70°C, momento donde se agregó 0.2g de cera de abeja, se mantuvo constante esta temperatura con el fin de que la cera de abeja no se desnaturalice. Tras la completa disolución del quitosano, se agregó 0.2 mL del aceite esencial de limón y por último se llevó la solución a un instrumento con mayor potencial de homogenización durante 2 minutos. Para la formulación 2, se agregó 2g de quitosano en un vaso de precipitados con 195.2mL de ácido acético, este se llevó a la parrilla de agitación con revoluciones constantes y se adicionó 2mL de ácido oleico y 0.6mL de glicerol, tras la completa disolución del quitosano, la solución se llevó a un instrumento con mayor potencial de homogenización durante 2 minutos y por último se agregó 0.2mL del aceite esencial de limón <sup>(18) (154)</sup>.

Tabla 13. Formulaciones preparadas para la evaluación de las bacterias patógenas de inocuidad alimentaria

	Formulación 1	Formulación 2
Quitosano	1%	1%
Cera de abeja	0.10%	-
Glicerol	0.30%	0.30%
Ácido oleico	-	1%
Aceite esencial de limón	0.10%	0.10%
Ácido acético	98.50%	97.60%

### 2.2.2 DISTRIBUCIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS

Por cada bacteria se utilizó 36 placas de agar, de las cuales 16 placas se destinaron para los recubrimientos y las restantes para los controles. Primero se esterilizó la campana de flujo laminar con las especificaciones dichas anteriormente, luego se tomó 1 mL de la formulación 1 y se esparció por todo el medio nutritivo sin dejar algún espacio libre, a continuación, se depositó el exceso de recubrimiento en un vaso de precipitados y se dejó secar las placas abiertas durante 3 horas aproximadamente, una vez secas, las placas se guardaron a 25°C. Este procedimiento se realizó de igual manera para la formulación 2.








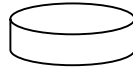

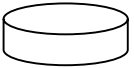
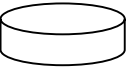
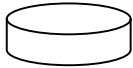










Figura 23. Distribución de los recubrimientos sobre las placas de Agar Nutritivo

### 2.2.3 EVALUACIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS

Se estabilizó la densidad óptica de la bacteria *E. coli* DH5 $\alpha$  y se realizó la metodología de diluciones seriadas, como se mencionó anteriormente, usando como control positivo 100  $\mu$ L de cada una de las diluciones ideales en placas sin recubrimiento y se adicionó dos tubos eppendorf que contenían caldo nutritivo para el control negativo. Luego se agregó 100  $\mu$ L de las diluciones ideales en las placas siguiendo el patrón de la Figura 24, se dejaron incubar y tras 24 horas, se procedió a contar las UFC formadas en cada placa y por cada serie para evaluar el efecto del recubrimiento con respecto a los controles, y así sucesivamente con cada una de las BP de esta investigación <sup>(18)</sup>.

Figura 24. Patrón del proceso de evaluación de los recubrimientos a base de quitosano sobre cada una de las BP de importancia en inocuidad alimentaria

	Dilución ideal 1		Dilución ideal 2		Control negativo
	Formulación 1 o 2	Control positivo	Formulación 1 o 2	Control positivo	
Serie 1					
Serie 2					
Serie 3					
Serie 4					

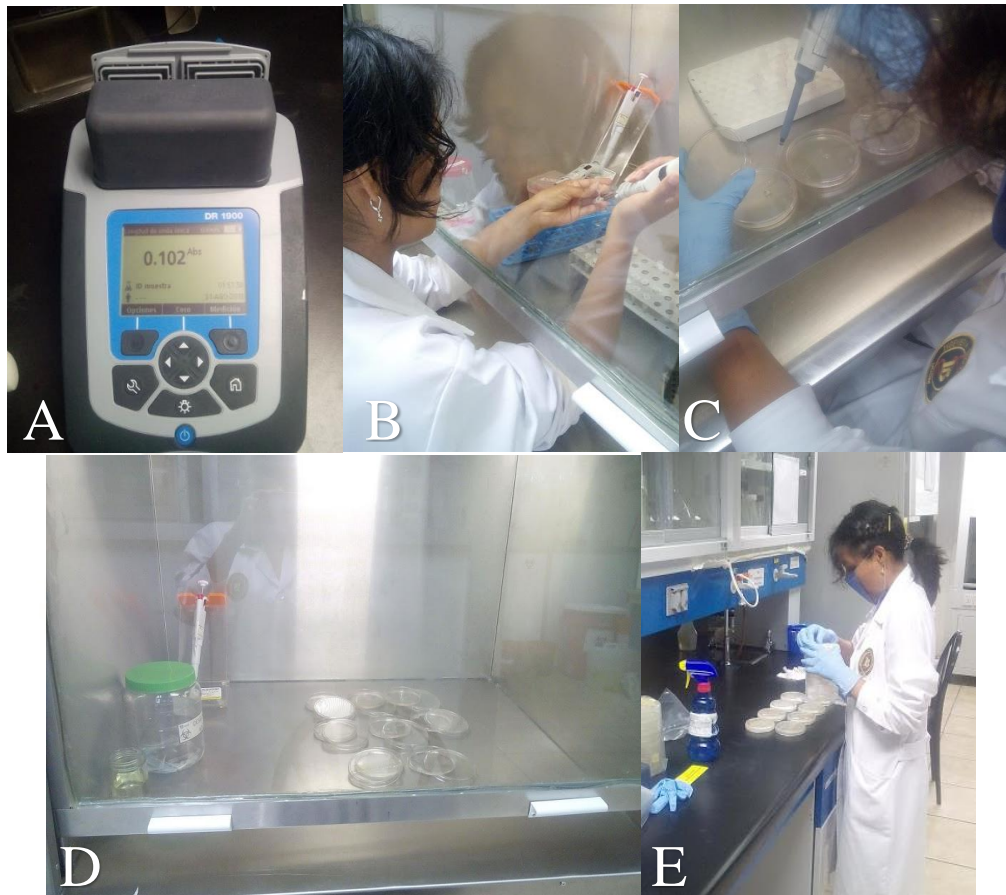


Figura 25. Proceso experimental para la evaluación de los recubrimientos  
A. Lectura de la densidad óptica B. Método de las diluciones seriadas C. Inoculación de la bacteria en placa con recubrimientos D. Proceso de secado de la inoculación E. Lectura a las 24 y 48 horas de las placas inoculadas

### 2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDIANTE EL PROGRAMA MINITAB

Para evaluar el efecto *in vitro* de los recubrimientos por bacteria y dilución se destinó 18 placas por BP y luego se ingresó los datos al programa MiniTab donde se realizó el análisis estadístico por ANOVA y la prueba de rango múltiple de Fisher (0.05) con el fin de observar diferencias significativas.



## CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 3. RESULTADOS

##### *3.1 DETERMINACIÓN DE LA DILUCIÓN IDEAL BACTERIANA*

En la Tabla 14 se muestran las UFC obtenidas de *E. coli* DH5 $\alpha$  después de 24 horas de incubación, observándose una media de 312 UFC en la dilución de  $10^{-4}$ , mientras que en la dilución de  $10^{-5}$  se observó el desarrollo de 38 UFC, a diferencia de la dilución  $10^{-6}$ , donde se observó claramente el factor 1:10 descrito en la metodología, al reportarse el desarrollo de sólo 5 UFC, esto acompañado de lo que se observó de manera cualitativa en las placas (Figura 26).



Tabla 14. UFC de *E. coli* DH5 $\alpha$  obtenidas por metodología de diluciones seriadas

	Dilución bacteriana		
	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
UFC	312	38.3	5
Desviación estándar	3.74	3.77	0.82
Coefficiente de variación	1.20%	9.84%	16.33%

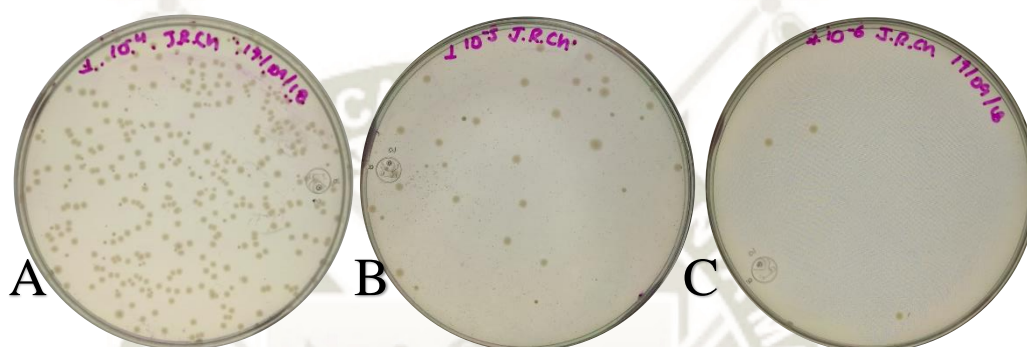


Figura 26. Placas con medio nutritivo después de 24 horas de incubación en la dilución de A. 10<sup>-4</sup> B. 10<sup>-5</sup> C. 10<sup>-6</sup>

### 3.2 EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO DE LOS RECUBRIMIENTOS A BASE DE QUITOSANO CON LA ADICIÓN DE COMPUESTOS NATURALES.

#### 3.2.1 *Escherichia coli* O157-H7

Los recubrimientos F1 (quitosano 1% + cera de abeja 0.1% + aceite esencial de limón 0.1%) y F2 (quitosano 1% + ácido oleico 1% + aceite esencial de limón 0.1%) no mostraron diferencias significativas sobre el crecimiento de *E. coli* O157-H7 a una dilución de 10<sup>-4</sup> (137.33 y 221.33 UFC, respectivamente), con respecto al control positivo (299.33 UFC); sin embargo, en la dilución 10<sup>-5</sup> la F2 mostró diferencia significativa a las 24 horas de incubación (11.67 UFC) al compararla con la F1 y el control (21.33 y 34 UFC, respectivamente) (Tabla 15).

Tabla 15. Comparaciones en parejas mediante Tukey con una confianza del 95% para *E. coli* O157-H7

Recubrimientos	10 <sup>-4</sup>		10 <sup>-5</sup>	
	24hrs	48hrs	24hrs	48hrs
F1	137.33±50.90a	191.33±96.6a	11.67±6.66a	27.67±3.21a
F2	221.33±106.04a	272.67±47.34a	21.33±4.73b	28.00±5.57a
Control (+)	299.33±6.79a	300.00±0.00a	34.00±4.77b	34.17±4.51a

<sup>a</sup> Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) determinadas por las múltiples pruebas de Fisher

### 3.2.2 *Escherichia coli* DH5a

Para *E. coli* DH5a los recubrimientos F1 y F2 inhibieron por completo el desarrollo de la bacteria (0.00 UFC) en las diluciones de 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-5</sup> a las 24 horas de incubación, ambas formulaciones fueron estadísticamente diferentes al control positivo (289 UFC y 46.67 UFC respectivamente) (Tabla 16).

Tabla 16. Comparaciones en parejas mediante Tukey con una confianza del 95% para *E. coli* DH5a

Recubrimientos	10 <sup>-4</sup>		10 <sup>-5</sup>	
	24hrs	48hrs	24hrs	48hrs
F1	0.00±0.00a	40.67±70.44a	0.00±0.00a	9.00±15.59a
F2	0.00±0.00a	3.67±6.35a	0.00±0.00a	0.33±0.58a
Control (+)	289.00±17.84b	289.00±17.84b	46.67±3.55b	48.83±2.93b

<sup>a</sup> Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) determinadas por las múltiples pruebas de Fisher

### 3.2.3 *Listeria monocytogenes*

Para el caso de *L. monocytogenes*, ambos recubrimientos establecen diferencias significativas a ambas diluciones y tiempos de incubación, pero, cabe destacar que la F1 tuvo una mayor inhibición sobre el crecimiento bacteriano al observarse una reducción total de las UFC (Tabla 17).

Tabla 17. Comparaciones en parejas mediante Tukey con una confianza del 95% para *L. monocytogenes*

Recubrimientos	10 <sup>-4</sup>		10 <sup>-5</sup>	
	24hrs	48hrs	24hrs	48hrs
F1	0.00±0.00a	0.00±0.00a	0.00±0.00a	0.00±0.00a
F2	0.00±0.00a	54.00±59.63a	0.00±0.00a	4.33±7.51a
Control (+)	300.00±0.00b	300.00±0.00b	105.67±12.29b	109.00±11.17b

<sup>a</sup> Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (P ¼ 0.05) determinadas por las múltiples pruebas de Fisher

### 3.2.4 *Salmonella. enteritidis*

En *S. enteritidis*, la F2 fue el recubrimiento que obtuvo mayor efecto inhibitorio en la dilución 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-5</sup> durante 24 horas de incubación, al presentarse una inhibición total a diferencia del control positivo (300 y 87.33 UFC, respectivamente) (Tabla 18); sin embargo, la dilución 10<sup>-5</sup> mostró diferencias significativas con la F1, al cuantificarse un crecimiento bacteriano de 29.67 y 50.33 UFC a las 24 y 48 horas de incubación respectivamente con respecto al control positivo (87.33 y 91.17 UFC, respectivamente).

Tabla 18. Comparaciones en parejas mediante Tukey con una confianza del 95% para *S. enteritidis*

Recubrimientos	10 <sup>-4</sup>		10 <sup>-5</sup>	
	24hrs	48hrs	24hrs	48hrs
F1	300.00±0.00b	300.00±0.00b	29.67±11.85b	50.33±9.61b
F2	0.00±0.00a	32.00±31.58a	0.00±0.00a	3.33±3.51a
Control (+)	300.00±0.00b	300.00±0.00b	87.33±9.25c	91.17±8.58c

<sup>a</sup> Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (P ¼ 0.05) determinadas por las múltiples pruebas de Fisher

### 3.2.5 *Shigella flexneri*

Para el caso de *S. flexneri*, la F2 establece diferencias significativas en su crecimiento bacteriano al mostrar valores de 0.00 UFC en todas las variables estudiadas a diferencia de sus controles positivos. A una dilución de 10<sup>-4</sup>, la F1 no mostró diferencias significativas al contabilizarse medias iguales comparadas con el control positivo (300 UFC en ambos tiempos de incubación) y de la misma manera en la dilución 10<sup>-5</sup> al contabilizarse UFC cercanas al control (Tabla 19).



Tabla 19. Comparaciones en parejas mediante Tukey con una confianza del 95% para *S. flexneri*

Recubrimientos	10 <sup>-4</sup>		10 <sup>-5</sup>	
	24hrs	48hrs	24hrs	48hrs
F1	300.00±0.00b	300.00±0.00b	57.00±24.25b	65.67±18.15b
F2	0.00±0.00a	0.00±0.00a	0.00±0.00a	0.00±0.00a
Control (+)	300.00±0.00b	300.00±0.00b	81.33±18.09b	82.83±18.5b

<sup>a</sup> Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (P  $\geq$  0.05) determinadas por las múltiples pruebas de Fisher

### 3.3 EVALUACIÓN DE AMBAS FORMULACIONES A TRAVÉS DEL PROGRAMA MINITAB

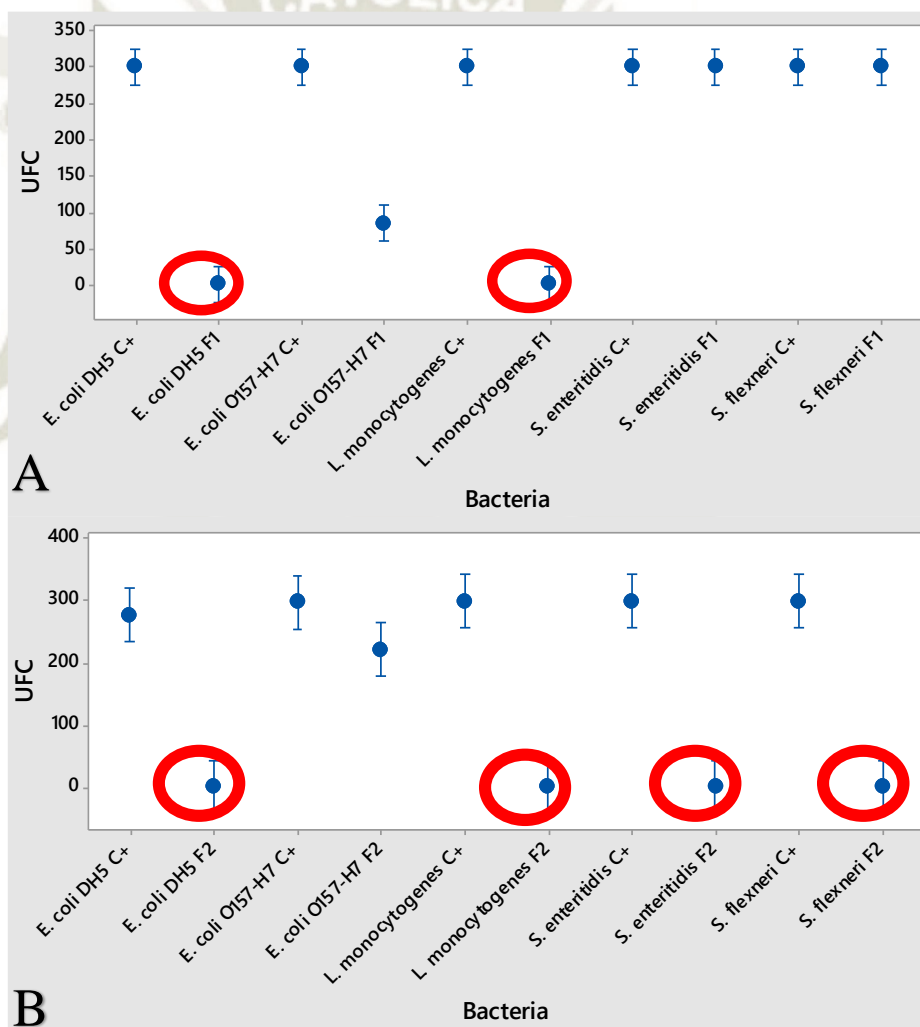


Figura 27. Diferencias significativas de todas las BP a 10<sup>-4</sup> por 24 horas de incubación mediante Tukey (IC 95%)

A. F1    B. F2    ○ BP con UFC = 0

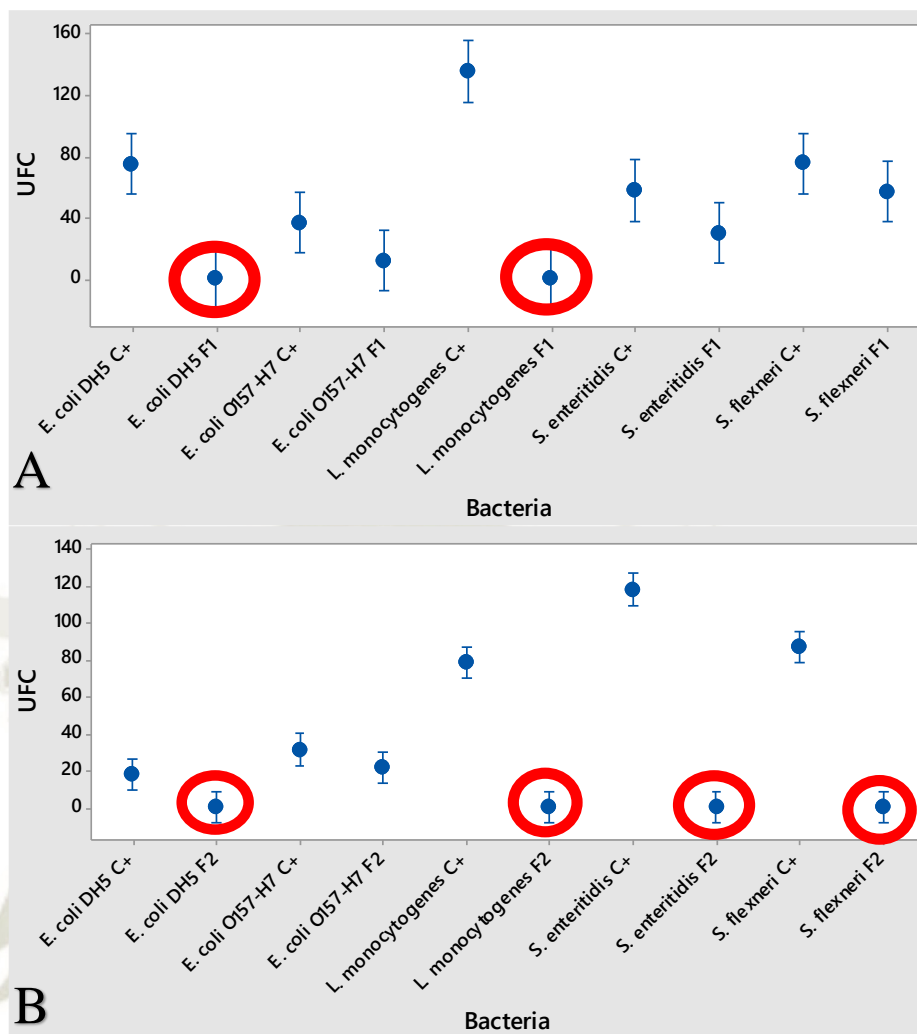


Figura 28. Diferencias significativas de todas las BP a  $10^{-5}$  por 24 horas de incubación mediante Tukey (IC 95%)

A. F1    B. F2       BP con UFC = 0

#### 4. DISCUSIONES

Todos los valores reportados en esta investigación mostraron coeficientes de variación menores al 20%, estableciendo que los datos presentados son confiables <sup>(177)</sup>. Se ha reportado que la dilución ideal bacteriana es  $10^{-5}$  al estar dentro del rango permitido <sup>(178)</sup> <sup>(18)</sup>. En esta investigación, además de la dilución  $10^{-5}$  se incluyó la dilución de  $10^{-4}$ , ya que, el género *Shigella spp.* necesita una dosis mínima de 10 a 100 células para causar una infección, sugiriendo este valor para observar el efecto de inhibición en una dilución menor. <sup>(74)</sup>

Con respecto a la evaluación *in vitro* de los recubrimientos, la F1 mostró mayor efecto sobre *E. coli* O157-H7 y *L. monocytogenes* al observarse diferencias significativas en

algunos de los parámetros establecidos. Con la primera BP mencionada, sólo se observa inhibición a las 24 horas a  $10^{-5}$  indicando un poder bacteriostático al retrasar el crecimiento bacteriano. Podemos atribuir este efecto a la cera de abeja, la cual es el elemento que difiere en las formulaciones y que puede contener de 67 a 75% de ésteres saturados y lo restante de ácidos grasos, hidrocarburos, alcoholes y ácidos<sup>(179) (180) (181)</sup>; aunque existe poca evidencia que evalúa este componente sobre la inhibición de esta BP, se ha reportado la evaluación antimicrobiana de otros compuestos constituidos por cera de abeja como el propóleo<sup>(18) (182)</sup>, el cual contiene fenoles que inhiben los ácidos nucleicos y degradan la membrana plasmática de las Gram Negativas, siendo este su mecanismo de acción<sup>(182)</sup>. Gil y col.<sup>(183)</sup> observaron un efecto bacteriostático parcial con esta cepa usando una concentración mínima de 0.4% de propóleo en comparación con el 0.1% de cera de abeja utilizado en nuestra investigación. Sagdic y col.<sup>(184)</sup> reportaron actividad antimicrobiana significativa en concentraciones de 2 y 5% de propóleo, lo que difiere de la investigación de Erkmen y Ozcan<sup>(185)</sup>, quienes observaron ineficacia en concentraciones de 0.02 a 2.5% (v/v); lo que sugiere que el efecto inhibitorio de este compuesto no sólo dependerá de la concentración; involucrará además su composición química (variable y compleja) que depende del lugar de origen<sup>(133)</sup>.

Para el caso de *L. monocytogenes*, la F1 resulta ser efectiva a ambos tiempos de incubación y diluciones bacterianas al no reportarse UFC en placa, lo que sugiere que las bacterias Gram Positivas tienden a ser más susceptible a la cera de abeja confirmando lo reportado por Velazquez y col.<sup>(186)</sup> quienes observaron mayor inhibición en este grupo al obtener lecturas de 0.00 de esta BP en un espectrofotómetro tras ser expuesta a 400  $\mu\text{g/mL}$  de éster fenético del ácido cafeico, un constituyente del propóleo extraído de Ures, Sonora a través de la metodología de microdilución por 48 horas; lo que difiere de lo reportado por Choi y col.<sup>(187)</sup> al relacionar el efecto antimicrobiano con la presencia de flavonoides gracias al sinergismo con los fenoles.

Por otro lado, la F2 mostró mayor efecto sobre *L. monocytogenes*, *S. enteritidis* y *S. flexneri* al observarse diferencias significativas en algunos de los parámetros establecidos. En el caso de *L. monocytogenes*, se observó una inhibición completa sólo por 24 horas sugiriendo un efecto bacteriostático al registrarse UFC a las 48 horas de incubación. Este efecto es atribuido al ácido oleico que se encuentra en mayor proporción en el aceite de oliva. Godínez-Oviedo y col.<sup>(188)</sup> evaluaron aceite de oliva ozonizada sobre la inhibición de esta BP, reportando que una concentración bacteriana de  $10^3$  UFC/mL presentaba un



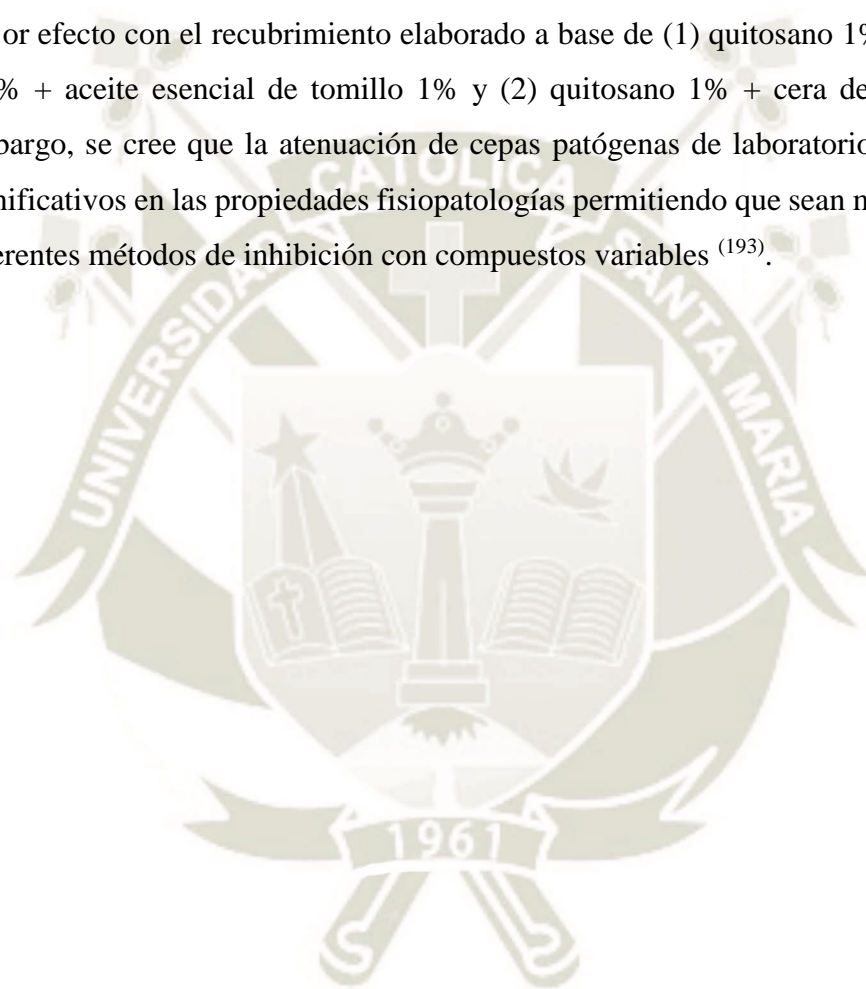
mayor diámetro del halo de inhibición (34mm); relacionando su poder antimicrobiano con el índice de peróxido, mientras que otras investigaciones han atribuido el mecanismo de acción a la presencia de ácido elenólico, que forma parte de la estructura de ciertos compuestos fenólicos del aceite de oliva <sup>(189)</sup>.

Para el caso de *S. enteritidis*, en la F1 se observó una diferencia significativa parcial a una dilución de  $10^{-5}$  a ambos tiempos de incubación pudiéndose dar un efecto bacteriostático al retrasar el crecimiento de la bacteria si se compara con las UFC del control; esto se relaciona con lo establecido por Fratini y col. <sup>(191)</sup>, quienes atribuyen los efectos de inhibición al sinergismo con productos naturales como la cera de abeja o el aceite de oliva. En la evaluación con la F2 establece mayor diferencia significativa durante 24 horas en ambas diluciones con respecto a la evaluación a 48 horas, pudiendo darse no sólo un efecto bacteriostático si no también bactericida. Este efecto de inhibición se muestra en Medina y col. <sup>(139)</sup>, quienes lograron una actividad antibacteriana más fuerte con extractos acuosos de aceite de oliva virgen tras cinco minutos de exposición contra *S. enteritidis*, al reducir log de una concentración inicial de  $10^6$  UFC/mL. Karaosmanoglu y col. <sup>(190)</sup>, por su parte, compararon la actividad antibacteriana del aceite de oliva extra virgen (AOEV) con respecto a otros aceites refinados, reportando que el primero inhibía por completo el crecimiento bacteriano partiendo de una concentración de  $5 \times 10^3$  UFC/mL después de una hora con respecto a los otros aceites donde no se observó una reducción de logaritmo; atribuyendo el efecto bactericida del AOEV a la alta concentración de compuestos fenólicos estudiados en la misma investigación (ácido cinámico, ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico, luteolina, ácido sirínico, tirosol, ácido vanílico y vainillina).

Para *S. flexneri*, la F2 es la única que establece una diferencia significativa continua durante el tiempo de incubación y diluciones establecidas, aunque no se ha encontrado investigaciones con respecto a esta BP, se ha logrado evaluar la actividad antimicrobiana de diferentes extractos fenólicos de aceite de oliva virgen en *S. sonnei* obteniéndose resultados negativos al no encontrar diferencias significativas con respecto al control <sup>(192)</sup>.

La única bacteria susceptible a F1 y F2 en ambas diluciones a 24 horas es *E. coli* DH5 $\alpha$ , ya que se observó una diferencia significativa bastante alta en las placas con recubrimiento con respecto a sus controles; si bien en el segundo tiempo de incubación todavía se observa diferencia significativa solo es sugerido el poder bacteriostático al

reportarse el crecimiento de UFC. El efecto bactericida o bacteriostático de cada formulación radica en los componentes que varían, en el caso de la F1 el mecanismo de acción será el mismo de *E. coli* O157-H7 donde los ésteres juegan un papel importante al ser uno de los componentes en mayor proporción, por su lado, la F2 presenta su actividad antimicrobiana por el ácido oleico y la presencia de fenoles en su composición. Resultados reportados por Ramos-García y col. <sup>(18)</sup> muestran el efecto inhibitorio completo bajo la misma metodología y con la misma cepa hasta las 48 horas obteniendo mejor efecto con el recubrimiento elaborado a base de (1) quitosano 1% + cera de abeja 0.1% + aceite esencial de tomillo 1% y (2) quitosano 1% + cera de abeja 0.1%; sin embargo, se cree que la atenuación de cepas patógenas de laboratorio provoca efectos significativos en las propiedades fisiopatológicas permitiendo que sean más susceptibles a diferentes métodos de inhibición con compuestos variables <sup>(193)</sup>.



## CONCLUSIONES

1. Las diluciones escogidas para desarrollar la evaluación de los recubrimientos fueron adecuadas al poder realizar el conteo de las UFC de manera exitosa además de poder observarse claramente el efecto inhibitorio o de disminución de las colonias en aquellas bacterias donde los recubrimientos tuvieron éxito.
2. Se observó diferencias significativas con la aplicación del F2 sobre *E. coli* O157-H7 a una dilución de  $10^{-5}$  y 24 horas de incubación. Para la *E. coli* DH5 $\alpha$  y *L. monocytogenes* se observó diferencias significativas con ambas formulaciones a ambas diluciones y tiempos de incubación. Con respecto a *S. enteritidis*, se observó diferencias significativas con la F1 a una dilución de  $10^{-5}$  y ambos tiempos de incubación y en la F2 con ambas diluciones y con ambos tiempos de incubación. Por último, *S. flexneri* sólo demostró diferencias significativas con la F2 en todos los parámetros observados.
3. La F1 tuvo un efecto bactericida total sobre *L. monocytogenes*, un efecto bacteriostático sobre *E. coli* DH5 $\alpha$  a ambas diluciones bacterianas y tiempos de incubación, *E. coli* O157-H7 y *S. enteritidis* (ambos tiempos de incubación); demostrando que la cera de abeja si tiene un efecto determinante para el éxito del recubrimiento. La F2 presenta un efecto bacteriostático sobre *S. enteritidis* y *E. coli* DH5 $\alpha$  y un efecto bactericida total sobre *S. flexneri*, confirmando lo descrito por otros autores en donde el ácido oleico presenta una buena actividad antibacteriana.



## RECOMENDACIONES

1. La adición de la cera de abeja con quitosano (F1) para evaluar la inhibición bacteriana de *L. monocytogens* así como el sinergismo entre el quitosano y el ácido oleico (F2) sobre la inhibición del crecimiento bacteriano de *S. enteritidis* y *S. flexneri* permite continuar investigaciones sobre la aplicación de recubrimientos especialmente con estas cepas al reportarse poco artículos. También es importante continuar la evaluación de los recubrimientos utilizados en esta investigación *in vivo* con el fin de observar la actividad antimicrobiana y los cambios sobre las propiedades fisicoquímicas de los productos frescos.
2. Se sugiere poder evaluar en ambos recubrimientos ciertos parámetros de firmeza así como la permeabilidad al vapor, con el fin de poder confirmar que las formulaciones no sólo cumplen con el poder antimicrobiano si no también con la finalidad como tal del RC, de poder prolongar la vida post-cosecha del producto y mantener las propiedades sensoriales del mismo.
3. En el caso de que los recubrimientos sean empleados en frutas y/o verduras que permanezcan bastante tiempo en medios de transporte hasta llegar a su destino final, sería bueno evaluar a más tiempos de incubación las bacterias. Además, de otros parámetros extremos como temperaturas, presión atmosférica para certificar si el recubrimiento aguanta otros valores que difieren de los de temperatura ambiente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Peña, J. Fernández, E.** Riesgos microbianos en la producción de alimentos frescos en áreas urbanas y periurbanas de América Latina. *Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.* 2012. Primera edición. México
2. **Park, J. McFarlane, I. Phipps, R. Ceddia, G.** The role of transgenic crops in sustainable development. *Plant Biotechnology Journal*. 2011. 9: 2 – 21
3. **OMS.** Inocuidad de los alimentos. 2017. *Disponible en:* <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Último acceso: 15 Septiembre 2018
4. **FAO.** Cumbre Mundial sobre la Alimentación 1996. Declaración de Roma sobre la seguridad alimentaria mundial. Roma. 1996
5. **Balbi, L.** Seguridad Alimentaria Mundial. División de Comercios y Mercados: FAO. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural Marino. 2009. *Disponible en:* [https://www.miteco.gob.es/ministerio/pags/exposiciones/Alimentacion\\_Mundial/www/liliana\\_balbi/intervencion\\_liliana\\_balbi.pdf](https://www.miteco.gob.es/ministerio/pags/exposiciones/Alimentacion_Mundial/www/liliana_balbi/intervencion_liliana_balbi.pdf)
6. **Appendini, K. García, R. De la Tejera, B.** Seguridad Alimentaria y “calidad” de los alimentos: ¿una estrategia campesina? *Revista Europea de Estudios Latinoamericanos y del Caribe*. 2003. 75: 65 – 83
7. **Soto, Z. Lavalle, L. Alvarado, E.** Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. *Salud Uninorte Barranquilla*. 2016. 32 (1): 105 – 122
8. **Martínez-Galán, P. Martín-Gallardo, E. Velamazán-Martínez, D.** Listeriosis y gestación. Revisión de la evidencia actual científica. *Revista Matronas*. 2016. 2 (4): 36 -46

9. **Kirk, M. Veitch, M. Hall, G.** Gastroenteritis and Food-Borne Disease in Elderly People Living in Long-Term Care. *Clinical Infectious Diseases*. 2010. 50 (3): 397 – 404
10. **Lynch, M. Tauxe, R. Hedberg, C.** The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: Risks and opportunities. *Epidemiology & Infection*. 2009. 137: 307 – 315
11. **Callejón, R. Rodríguez-Naranjo, I. Ubeda, C. Hornedo-Ortega, R. García-Parrilla, C. Troncoso, A.** Reported Foodborne Outbreaks Due to Fresh Produce in the United States and European Union: Trends and Causes. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2015. 12 (1): 32 – 38
12. **Alegbeleye, O. Singleton, I. Sant’Ana, A.** Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food Microbiology*. 2018. 73: 177 – 208
13. **Achicanoy, H.** Estrategias integradas para el control de enfermedades en las plantas. *Revista de la Facultad de Ingeniería Agronómica*. 2001. 54 (1-2): 1251 – 1273.
14. **Serrano, L. Galindo, E.** Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Revista CIENCIA*. 2007. 77 – 87
15. **Rodríguez, N.** Efecto del quitosano como revestimiento comestible en yacón (*Smallanthus sonchifollus*) mínimamente procesado para aumentar su vida útil. *Universidad Nacional de Cajamarca: Facultad de Ciencias Agrarias*. 2017. Tesis profesional. Perú
16. **Costa, F. Stella, S. Van de Weg, W. Guerra, W. Cecchinell, M. Dallavia, J. Sansavini, D.** Role of the genes Md-ACO1 and Md- ACS1 in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh). *Euphytica*. 2005. 141 (1): 181 – 190



17. **Ramos-García, M. Bautista-Baños, S. Barrera-Necha, L. Bozquez-Molina, E. Alía-Tejagal, I. Estrada-Carrillo, M.** Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2010. 28 (1): 44 – 57
  
18. **Ramos-García, M. Bozquez-Molina, E. Hernández-Romano, J. Zavala-Padilla, G. Terrés-Rojas, E. Alía-Tejagal, I. y col.** Use of chitosan-based edible coatings in combination with other natural compounds, to control *Rhizopus stolonifer* and *Escherichia coli* DH5a in fresh tomatoes. *Crop Protection*. 2012. 38: 1 – 6
  
19. **Codex Alimentarius Commission.** Codex Alimentarius. *Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias*. 1979. Segunda edición. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-a0369s.pdf>
  
20. **Sansawat, S. Muliyl, V.** Comparando los estándares reconocidos por la Iniciativa Mundial de Seguridad Alimentaria (GFSI). *Sociedad General de Vigilancia (SGS)*. 2011
  
21. **Avendaño, B. D. Schwentesius, R. Lugo, S.** La inocuidad alimentaria en la exportación de hortalizas mexicanas a Estados Unidos. *Comercia Exterior*. 2007. 57 (1)
  
22. **Castro, A.** Programa Nacional de Inocuidad de los Alimentos. *Ministerio de Salud Pública: Viceministerio de Higiene y Epidemiología*. 2001. Cuba
  
23. **FAO** Segunda Conferencia Internacional sobre Nutrición (CIN2). *Declaración de Roma sobre la nutrición*. 2014. Roma
  
24. **Engo, N. Fuxman, A. González, C. Negri, L. Polenta, G. Vaudagna, S.** Desarrollo de las exigencias sobre calidad e inocuidad de alimentos en el mundo, 2025. *Ministerio de Ciencia y Tecnología e Innovación Productiva*. 2015. Argentina. ISBN 978-987-1632-52-7

25. **Granados, R. Villaverde, C.** Microbiología I. *Ediciones Paraninfo, S.A.* 2003. Primera edición. Tercera reimpresión. España. Pág. 3
26. **Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter, P.** Biología molecular de la célula. *Editorial Garland Science.* 2002. Cuarta edición. New York. pp. 1485 – 1486
27. **Hernández, P.** Bacterias patógenas emergentes transmisibles por los alimentos. *Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos.* 2009. 147 - 179
28. **Pires, S. Vieira, A. Lo Fo Wong D.** Attributing human foodborne illness to food sources and water in Latin America and the Caribbean using data from outbreak investigations. *International Journal of Food Microbiology.* 2012. 152 (3): 129-138
29. **EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control).** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2015. 2016. 14 (12): 4634 – 4659
30. **FDA.** Importancia de la seguridad alimentaria para grupos en riesgo. *Food and Drug Administration.* 2018 Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/PeopleAtRisk/ucm353048.htm> Último acceso: 02 Noviembre 2018
31. **FDA.** Los 14 patógenos principales transmitidos por los alimentos de Seguridad Alimentaria para futuras mamás. 2018. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/resourcesforyou/healtheducators/ucm091976.htm> Último acceso: 24 Septiembre 2018
32. **Bacon, R. Sofos, J.** Characteristics of Biological Hazards in Foods. *Editor Food Safety Handbook.* New Jersey. 2003. 157 – 195

33. **Valdivia, I. P.** Obtención del Sideróforo de *Pseudomona fluorescens* para su Aplicación como Controlador Fitopatógeno del Hongo *Fusarium oxysporum* en Cultivos de *Solanum lycopersicum* (Tomate). *Universidad Católica de Santa María: Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas*. 2017. Tesis profesional. Perú
34. **Lund, B. M. O'Brien, S.** The Occurrence and Prevention of Foodborne Disease in Vulnerable People. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2011. 8 (9)
35. **Centers of Disease Control and Prevention** Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks — United States, 2009–2015. *Surveillance Summaries*. 2018. 67 (10)
36. **Bintsis, T.** Foodborne pathogens. *AIMS Microbiology*. 2017. 3 (3): 529 – 563.
37. **Croxen, M. Law, R. Scholz, R. Keeney, K. Wlodarska, M. Finlay, B.** Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013. 26 (4): 822 – 880
38. **Vidal, J.** Bacterias patógenas y el ser humano: la importancia de la virulencia bacteriana. *Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Tabasco. Diálogos*. 2003. 1665 – 3505
39. **Kaper, J. Nataro, J. Mobley, H.** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews. Microbiology*. 2004. 2: 123 – 140
40. **Chmielarczyk, A. Wójkowska-Mach, J. Romaniszyn, D. Adamski, P. Helwich, E. Lauterbach, y col.** Mode of delivery and other risk factors for *Escherichia coli* infections in very low birth weight infants. *BMC Pediatrics*. 2014. 14 (274).
41. **Rodríguez, G.** Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*. 2002. 44 (5): 464 – 475



42. **Rappelli, P. Folgosa, E. Solinas, M. L. Dacosta, J. L. Pisanu, C. Sidat, M. Melo, J. Cappuccinelli, P. Colombo, M. M.** Pathogenic enteric *Escherichia coli* in children with and without diarrhea in Maputo, Mozambique. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2005. 43: 67 – 72.
43. **Newell, D. La Ragione, R.** Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies? *Transboundary and Emerging Diseases*. 2018. 65: 49 – 71. Suplemento 1.
44. **Melton-Celsa, A.** Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure and Function. *Microbiology Spectrum*. 2014. 2 (2)
45. **Farfán, M. Torres, A.** Molecular Mechanisms That Mediate Colonization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains. *Infection and Immunity*. 2012. 80 (3): 903 – 913.
46. **Scallan, E. Griffin, P. Angulo, F. Tauxe, R. Hoekstra, R.** Foodborne Illness Acquired in the United States-Unspecified Agents. *Emerging Infectious Diseases*. 2011. 17(1): 16 – 22.
47. **Maya, D.** Estudio de alternativas de desinfección para el control de patógenos en el Río Bogotá. *Universidad de los Andes: Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental*. 2004. Colombia
48. **Kostylev, M. Otwell, A. Richardson, R. Suzuki, Y.** Cloning Should Be Simple: *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ -Mediated Assembly of Multiple DNA Fragments with Short End Homologies. *PLoS ONE*. 2015. 10 (9).
49. **Chlebicz, A. Slizwska, K.** Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2018. 15 (863).

50. **Eimerma, P.** Characterization of *Listeria monocytogenes* growth and colonization of the murine gallbladder. *Stanford University*. 2010. pp. 2
51. **Vivant, L. Garmyn, D. Piveteau, P.** *Listeria monocytogenes*, a down-to-earth pathogen. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2013. 3 (87).
52. **Haidar-Ahmad, N. Kissoyan, K. Fadlallah, S. El-Hajj, R. Saleh, M. Ghosn, N. Matar, G.** Genotypic and virulence characteristics of *Listeria monocytogenes* recovered from food items in Lebanon. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2016. 10 (7): 712 – 717.
53. **Castañeda-Ruelas, G. Eslava-Campos, C. Castro-del Campo, N. León-Félix, J. Chaidez-Quiroz, C.** Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica. *Salud Pública de México*. 2014. 56 (6): 654 – 659
54. **Cartwright, E. J. Jackson, K. A. Johnson, S. D. Graves, L. M. Silk, B. J. Mahon, B. E.** Listeriosis Outbreaks and Associated Food Vehicles, United States, 1998–2008. *Emerging Infectious Diseases*. 2013. 19 (1).
55. **Food Standards.** *Listeria: Food Safety and Recalls. Food Standards Australia*. 2017. Disponible en: <http://www.foodstandards.gov.au/consumer/safety/listeria/Pages/default.aspx>  
Último acceso: 14 Noviembre 2018
56. **Jurado, R. Arenas, C. Doblas, A. Rivero, A. Torre-Cisneros, J.** Fiebre tifoidea y otras infecciones por *salmonellas*. *Medicine*. 2010. 10 (52): 3497 – 3501.
57. **Barreto, M. Castillo-Ruiz, M. Retamal, P.** *Salmonella entérica*: una revisión de la trílogía agente, hospedero y ambiente, y su transcendencia en Chile. *Revista Chilena de Infectología*. 2016. 33(5): 547 – 557.

58. **Whiley, H. Ross, K.** *Salmonella* and Eggs: From Production to Plate. *International Journal of Environmental Research. Public Health*. 2015. 12: 2543 – 2556
59. **Bierschenk, D. Boucher, D. Schroder, K.** *Salmonella*-induced inflammasome activation in humans. *Molecular Immunology*. 2017. 86: 38 – 43
60. **Uzzau, S. Brown, D. Wallis, T. Rubino, S. Leori, G. Bernard, S. Casadesús, J. Platt, D. Olsen, J.** Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiology & Infection*. 2010. 125: 229 – 255.
61. **Crump, J. Mintz, E.** Global trends in typhoid and paratyphoid fever. *Clinical Infectious Diseases*. 2010. 50 (2): 241 – 246.
62. **Scientific Status Summary.** Bacteria Associated with Foodborne Diseases. *Institute of Food Technologists*. 2004.
63. **Anderson, T. Nguyen, T. Adams, J. Garrett, N. Bopp, C. Baker, J. McNeil, C. Torres, P. Ettestad, P. y col.** Multistate outbreak of human *Salmonella typhimurium* infections linked to olive poultry from agricultural feed stores and mail-order hatcheries, United States 2013. *One Health*. 2016. 2: 144 – 149.
64. **Parra, M. Durango, J. Máttar, S.** Microbiología, patogénesis, epidemiología clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *Journal MVZ Cordova*. 2002. 7 (2): 187 – 200
65. **Ruiz, S. Acedo, E. Díaz, M., Islas, M. González, G.** Efficacy of sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella ssp.* and *Listeria monocytogenes* populations on freshcut carrots. *Food Control*. 2007. 18: 1383 – 1390.
66. **Muvhali, M. Smith, A. M. Rakgantso, A. M. Keddy, K. H.** Investigation of *Salmonella enteritidis* outbreaks in South Africa using multi-locus variable-number tandem-repeats analysis, 2013-2015. *BMC Infectious Diseases*. 2017. 17 (661)



67. **EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control)** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*. 2015. 13 (22).
68. **Bintsis, T.** Microbial pollution and food safety. *AIMS Microbiology*. 2018. 4 (3): 377 – 396.
69. **CHP (Centre for Health Protection)** Review of Bacillary dysentery in Hong Kong, 2003 – 2012. *Scientific Committee on Enteric Infections and Foodborne Diseases*. 2012
70. **Ugbogu, O. Nwachukwu, N. Ogbuagu, U.** Isolation of *Salmonella* and *Shigella* species from house flies (*Musca domestica* L.) in Uturu, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. 2006. 5 (11): 1090 – 1091.
71. **Barry, E. Pasetti, M. Sztein, M. Fasano, A. Kotloff, K. Levine, M.** Progress and pitfalls in *Shigella* vaccine research. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2013. 10 (4): 245 – 255.
72. **Warren, B. Parish, M. Schneider, K.** Shigella as foodborne pathogen and current methods for detection in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2006. 46: 551 – 567.
73. **Montville, T. Matthews, K.** Food microbiology: An introduction. *ASM Press*. 2005. Washington D.C.
74. **Dekker, J. Frank, K.** *Salmonella, Shigella y Yersinia*. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2015. 35 (2): 225 – 246.
75. **Nygren, B. Schilling, K. Blanton, E. Silk, B. Cole, D. Mintz, E.** Foodborne outbreaks of shigellosis in the USA, 1998 – 2008. *Epidemiology & Infection*. 2013. 141 (2): 233 – 241.

76. **Gaynor, K. Park, S. Kanenaka, R. Colindres, R. Mintz, E. Ram, P. Kitsutani, P. Nakata, M. Wedel, y col.** International foodborne outbreak of *Shigella sonnei* infection in airline passengers. *Epidemiology & Infection*. 2009. 137: 335 – 341
77. **Yang, S-C. Hung, C-F. Aljuffali, I. Fang, J-Y.** The roles of the virulence factor IpaB in *Shigella spp.* in the escape from immune cells and invasion of epithelial cells. *Microbiological Research*. 2015. 181: 43 -51
78. **Jung, Y. Jang, H. Matthews, K.** Effect of the food production chain from farm practices to vegetable processing on outbreak incidence. *Microbial Biotechnol.* 2014. 7 (6): 517 – 527.
79. **EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control)** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*. 2017. 15 (12).
80. **CDC (Centers for Disease Control and Prevention).** List of Selected Multistate Foodborne Outbreak Investigations. 2014. Disponible en: <https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/> Último acceso: 15 Noviembre 2018
81. **Food Standards** Review of foodborne illness associated with selected ready-to-eat fresh produce. *Primary Production & Processing Requirements for Horticulture*. 2011. Australia.
82. **Olanya, O. Lakshman, D.** Potential of predatory bacteria as biocontrol agents for foodborne and plant pathogens. *Journal of Plant Pathology*. 2015. 97 (3): 405 – 417.
83. **Brooks, J. Sowers, E. Wells, J. Greene, K. Griffin, P. Hoekstra, R. Strockbine, N.** Non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections in the United States. *Journal of Infectious Disease*. 2005. 192: 1422 – 1429.

84. **Scharff, R.** Health-related Costs from Foodborne Illness in the United States. *The Produce Safety Project at Georgetown University*. 2010. Disponible en: <http://www.publichealth.lacounty.gov/eh/docs/ReportPublication/HlthRelatedCostsFromFoodborneIllnessUS.pdf> Último acceso: 26 Octubre 2018
85. **Francis, G. Gallone, A. Nychas, G. Sofos, J. Colelli, G. Amodio, M. Spano, G.** Factors affecting quality and safety of fresh-cut produce. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2012. 52: 595 – 610.
86. **Tortora, G. J. Funke, B. R. Case, C. L.** Introducción a la microbiología. *Editorial Médica Panamericana*. 2007. Novena edición. Argentina: Buenos Aires.
87. **Gepp, V.** Control químico. *Revista de Fitosanidad*. 2007. 11: 41 – 46
88. **Parish, M. Beuchat, L. Suslow, T. Harris, I. Garrett, E. Farber, J.** Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2003. 2: 161 – 173.
89. **Artés, F. Gómez, P. Artés-Hernández, F. Aguayo, E. Escalona, V.** Improved Strategies for Keeping Overall Quality of Fresh-cut Produce. *Universidad Técnica de Cartagena: Departamento de Ingeniería de Alimentos e Instituto de Biotecnología Vegetal*. 2007. España
90. **Rojas, C.** Evaluación de cuatro desinfectantes sobre *Listeria monocytogenes* aislada de productos cárnicos crudos de una planta de procesados de Bogotá. *Pontificia Universidad Javeriana: Facultad de Ciencias*. 2007. Colombia
91. **García-Robes, J. Medina-Rodríguez, L. Mercado-Ruiz, J. Báez-Sañudo, R.** Evaluación de desinfectantes para el control de microorganismo en frutas y verduras. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. 2017. 18 (1): 9 – 22
92. **Aguayo, E. Gómez, P. Artés, F.** Tratamientos químicos desinfectantes de hortalizas de IV gamma: ozono, agua electrolizada y ácido peracético. *Agrociencia Uruguay*. 2017. 27 (1): 7 – 14.



93. **Food and Drugs Administration of US.** Secondary direct food additives permitted in food for human consumption. *Federal Register*. 2008. 39: 17 – 26.
94. **Bataller-Venta, M. Santa Cruz-Broche, S. García-Pérez, M.** El ozono: una alternativa sustentable en el tratamiento poscosecha de frutas y hortalizas. *Revista CENIC: Ciencias Biológicas*. 2010. 41 (3): 155 – 164.
95. **Guzel-Seydim, Z. Greene, A. Seydim, A.** Use of ozone in the food industry. *LWT –Food Science and Technology*. 2004. 37 (4): 453 – 460
96. **OPS Organización Panamericana de la Salud** La desinfección del agua. 1999. Disponible en: OPS/HEP/99/32 Acceso: 5 Octubre 2018
97. **Rice, R. Graham, D.** U.S. FDA Regulatory Approval of Ozone as an Antimicrobial Agent – What Is Allowed and What Needs to Be Understood. *FDA*. 2001. Disponible en: [www.technozone.in/img/pdf/FDA-e.pdf](http://www.technozone.in/img/pdf/FDA-e.pdf) Último acceso: 20 Noviembre 2018
98. **Linley, E. Denyer, S. McDonnell, G. Simons, C. Maillard, J.** Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007. 67: 1589 – 1596.
99. **McDonnell, G.** Antisepsis, Disinfection and Sterilization: Types, Action and Resistance. *ASM Press*. 2007. Washington, DC.
100. **CDC (Centers for Disease Control and Prevention)** Peróxido de hidrógeno (>60% solución en agua). *Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo*. 2014. Disponible en: <https://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng0164.html> Último acceso: 18 Noviembre 2018
101. **Rodgers, S. Cash, J. Siddiq, M. Ryser, E.** A Comparison of Different Chemical Sanitizers for Inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in Solution and on Apples, Lettuce, Strawberries, and Cantaloupe. *Journal of Food Protection*. 2004. 67 (4): 721 – 731.

102. **Abadías, M. Alegre, I. Usall, J. Torres, R. Viñas, I.** Evaluation of alternative sanitizers to chlorine disinfection for reducing foodborne pathogens in fresh-cut apples. *Postharvest Biology and Technology*. 2011. 59: 289 – 292.
103. **Marjani, A. Golalipour, M. Gharravi, A.** The Effects of Subacute Exposure of Peracetic Acid on Lipid Peroxidation and Hepatic Enzymes in Wistar Rats. *Oman Medical Journal*. 2010. 25 (4): 256 – 260.
104. **UNICCOP (Centro Nacional de Cooperativas)** Manual para el Buen Uso y Manejo de Plaguicidas. *Proyecto UniSol: Agricultura Sustentable*. 2015.
105. **Calvo, J. Martínez-Martínez, L.** Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2009. 27 (1): 44 – 52.
106. **Bravo, A. Ibarra, J. Castro, M. Galindo, E. Patiño, M. Serrano, L. García, R. Pereyra, B. Alcázar, A. y col.** Los microorganismos en el control de insectos y patógenos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2006. 48 (2): 113 -120
107. **Del Puerto-Rodríguez, A. Suárez, S. Palacio, D.** Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 2015. 52 (3): 372 – 387.
108. **Ibarra, J. Del Rincón, M. Galindo, E. Patiño, M. Serrano, L. García, R. Carrillo, J. Pereyra, B. Alcázar, A. y col.** Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2006. 48 (2): 113 – 120.
109. **Bach, S. McAllister, T. Veira, D. Gannon, V. Holley, R.** Transmission and control of *Escherichia coli* O157-H7 – A review. *Canadian Journal of Animal Science*. 2002. 475 - 490
110. **Ponce, S. Guerrero, V.** Propiedades mecánicas de compuestos biodegradables elaborados a base de ácido poliláctico reforzados con fibras de abacá. *Revista Escuela Politécnica Nacional*. 2014. 33 (2)
111. **Aradilla, D. Oliver, R. Estrany, F.** Polímeros biodegradables: una alternativa de futuro a la sostenibilidad del medio ambiente. *Técnica Industrial*. 2012. 297: 76 – 80.

112. **Neira, G. Pinilla, A. Henao, J.** Arcilla bentonítica modificada con quitosano para materiales compuestos biodegradables. 2011. 78 (167): 59 – 65
113. **Oussalah, M. Caillet, S. Saucier, L. Lacroix, M.** Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 2007. 18: 414 – 420.
114. **García, M. Pérez, M. González, M. Burgos, A. Cortez, M. Bringas, L. Ezquerro, J.** Effects of fumonisin B1-containing feed on the muscle proteins and ice-storage life of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 2015. 24: 340 – 353.
115. **Mármol, Z. Gutiérrez, E. Páez, G. Ferrer, J. Rincón, Marisela.** Desacetilación termoalcalina de quitina de conchas de camarón. *Revista Multiciencias*. 2004. 4 (2): 91 – 95.
116. **Pérez, A. Rojas, J. Rodríguez, J. Arrieta, I. Arrieta, Y. Rodríguez, A.** Actividad antibacteriana de soluciones ácidas de quitosano obtenido de exoesqueleto de camarón. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2014. 16 (1): 104 – 110.
117. **Duta P. Duta J.** Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 2004. 63: 20 – 31.
118. **Kafetzopoulos, D. Martinou, A. Bouriotis, V.** Bioconversion of chitin to chitosan: Purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993. 90: 2564 – 2568.
119. **Tokuyasu, K. Mitsutomi, M. Yamaguchi, I. Hayashi, K. Mori, Y.** Recognition of chitoooligosaccharides and their N-acetyl groups by putative subsites of chitin deacetylase from a deuteromycete. *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biochemistry*. 2000. 39: 8837 – 8843.
120. **López, P.** Obtención de quitosano a partir de desechos de exoesqueletos de camarón tití (*Xiphopenaeus riveti*) para el desarrollo de películas poliméricas plastificadas



con glicerina. *Universidad de San Buenaventura: Programa de Ingeniería de Materiales*. 2014. Colombia

121. **Cheba, B.** Chitin and chitosan: Marine biopolymers with unique properties and versatile applications. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*. 2011. 6: 149 – 153.
122. **Gamage, A. Shahid, F.** Use of chitosan for the removal of metal ion contaminants and proteins from water. *Food Chemistry*. 2007. 104: 989 – 996.
123. **Younes, I. Rinaudo, M.** Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structures, properties and applications. *Marine Drugs*. 2015. 13: 1133 – 1174
124. **Alishahi, A. Aider, M.** Applications of chitosan in the seafood industry and aquaculture: A review. *Food Bioprocess Technology*. 2012. 5: 817 – 830
125. **Ramírez, M. Rodríguez, A. Alfonso, L. Peniche, C.** Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. *Biotecnología Aplicada*. 2010. 27 (4): 270 – 276
126. **Rabea, E. Badawy, M. Stevens, C. Smagghe, G. Steurbaut, W.** Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 2003. 4 (6): 1457– 1465
127. **Mendel, F. Vijay, J.** Review of Antimicrobial and Antioxidative Activities of Chitosans in Food. *Journal of Food Protection*. 2010. 73 (9): 1737 – 1761
128. **Helander, I. Nurmiäho, E. Ahvenainen, R. Rhoades, J. Roller, S.** Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 2001. 71 (2-3): 235 – 244
129. **Qi, L. Zu, Z. Jiang, X. Hu, C. Zou, X.** Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*. 2004. 339 (16): 2693 – 2700
130. **Hosseinnejad, M. Jafari, S. M.** Evaluation of Different Factors Affecting Antimicrobial Properties of Chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016. 85: 467 – 475.

131. **Sahariah, P., & Másson, M.** Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship. *Biomacromolecules*. 2017. 18 (11): 3846-3868 .
132. **López, D. Cuatin, L. Andrade, J. Osorio, O.** Evaluación de un recubrimiento comestible a base de proteínas de lactosuero y cera de abeja sobre la calidad fisicoquímica de uchuva (*Physalis peruviana L.*). *Agroindustria y Ciencia de los Alimentos*. 2016. 65 (4): 326 – 333
133. **Manrique, A. Santana, W.** Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de abejas son aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona sp.* De Brasil y Venezuela. *Zootecnia Tropical*. 2008. 26 (2): 157 – 166
134. **Velasquez, B. Montenegro, S.** Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de propóleos obtenidos de abejas *Apis mellifera*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 2017. 8 (1)
135. **Navarro, M.** Efecto De La Composición De Recubrimientos Comestibles A Base De Hidroxipropilmetilcelulosa Y Cera De Abeja En La Calidad De Ciruelas, Naranjas Y Mandarinas. *Universidad Politécnica de Valencia: Departamento de Tecnología de Alimentos*. 2007. Tesis doctoral. España
136. **Navarro, M. Massa, A. Pérez, M.** Effect of beeswax content on hydroxypropyl methylcellulose-based edible film properties and postharvest quality of coated plums. *LWT – Food Science and Technology*. 2011. 44: 2328 – 2334
137. **Tosne, Z. L. Mosquera, S. A. Villada, H. S.** Efecto de Recubrimiento de Almidón de Yuca y Cera de Abejas sobre el Chontaduro. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2014. 12 (2): 30 – 39.
138. **Kazadi, M. Bokota, M. Mpiana, P.** Potential New Sources of Oleic Acids from Wild Plants from Kivu, D.R. Congo. *Journal of Physical and Chemical Sciences*. 2014. 1 (2)
139. **Medina, E. Romero, C. Brenes, M. De Castro, A.** Antimicrobial Activity of Olive Oil, Vinegar and Various Beverages against Foodborne Pathogens. *Journal of Food Protection*. 2007. 70 (5): 1194 – 1199

140. **Bergsson, G. Amfinnsson, J. Steingrímsson, O. Thomar, H.** In vitro killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001. 45: 3209 – 3212
141. **Battinelli, L. Danielle, C. Caristiani, M. Bisignano, G. Saija, A. Mazzanti, G.** In vitro antifungal and anti-elastase activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea L. fruit*. *Phytomedicine*. 2006. 13: 558 – 563
142. **Vargas, M. Albors, A. Chiralt, A. Gonzáles-Martínez, C.** Quality of cold-stores strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*. 2006. 41 (2): 164 – 171
143. **Aguirre-Loredo, R. Rodríguez-Hernández, A. Chavarría-Hernández, N.** Physical properties of emulsified films based on chitosan and oleic acid. *CyTA - Journal of Food*. 2014. 12 (4): 305 – 312.
144. **Janakat, S. Al-Nabulsi, A. Allehdan, S. Olaimat, A. Holley, R.** Antimicrobial activity of amurca (*olive oil less*) extract against selected foodborne pathogens. *Food Science and Technology*. 2015. 35 (2): 259 – 265
145. **Yoon, B.K., Jackman, J.A., Valle-González, E.R., & Cho, N.** Antibacterial Free Fatty Acids and Monoglycerides: Biological Activities, Experimental Testing, and Therapeutic Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018
146. **Patra, J. K. Baek, K. H.** Antibacterial Activity and Action Mechanism of the Essential Oil from *Enteromorpha linza L.* against Foodborne Pathogenic Bacteria. *Molecules*. 2016. 21 (338).
147. **Klein, G. Ruben, C. Upmann, M.** Antimicrobial activity of essential oil components against potential food spoilage microorganisms. *Current Microbiology*. 2013. 37: 200 – 208.
148. **Diao, W. Hu, Q. Zhang, H. Xu, J.** Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare Mill.*). *Food Control*. 2014. 35: 109 – 116.



149. **Bajpai, V. Sharma, A. Baek, K.** Antibacterial mechanism of action of *Texus cuspidata* stem essential oil against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Safety*. 2013. 33: 348 – 359.
150. **Orue, N. García, S. Feng, P. Heredia, N.** Decontamination of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* O157:H7 from Leafy Green Vegetables Using Edible Plant Extracts. *Journal of Food Science*. 2013. 78 (2): 290 – 296.
151. **Settanni, L. Palazzolo, E. Guarrasi, V. Aleo, A. Mammina, C. Moschetti, G. Germanà, M.** Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily. *Food Control*. 2012. 26: 326 – 330.
152. **Prabuseenivasan, S. Jayakumar, M. Ignacimuthu, S.** In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2006. 6 (39).
153. **Öntaş, C. Baba, E. Kaplaner, E. Küçükaydin, S. Öztürk, M. Ercan, M.** Antibacterial Activity of *Citrus limon* Peel Essential Oil and *Argania spinosa* Oil Against Fish Pathogenic Bacteria. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*. 2016. 22(5): 741 – 749.
154. **Bautista-Baños, S. González-Soto, R. Ramos-García, M. L.** Propiedades Físicas de Películas de Quitosano Adicionadas con Aceite Esencial De Limón y su Impacto en la Vida de Anaquel del Jitomate (*Licopersicon Esculentum L.*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2018. 17 (1): 1 – 11.
155. **Swamy, M. K. Akhtar, M. S. Sinniah, U. R.** Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2016.
156. **Mahato, N. Sharma, K. Koteswararao, R. Sinha, M. Baral, E. Cho, M. H.** Citrus essential oils: Extraction, authentication and application in food preservation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017. 59 (4): 611 – 625.

157. Escobar, A. Márquez, C. Restrepo, C. Cano, J. Patiño, J. Application of heat treatment, edible coating and chemical dip as postharvest treatments for the conservation of fresh-cut vegetables. *Acta Agronómica*. 2014. 63 (1): 1 – 10.
158. McHugh, T. Senesi, E. Apple Wraps: A Novel Method to Improve the Quality and Extend the Shelf Life of Fresh-cut Apples. *Food Engineering and Physical Properties*. 2000. 65 (3).
159. Bósquez, E. Elaboración de recubrimientos comestibles formulados con goma de mezquite y cera de candelilla para reducir la cinética de deterioro fresco del limón persa (*Citrus latifolia Tanaka*). *Universidad Autónoma Metropolitana*. 2003. Tesis doctoral. México D.F.
160. Vázquez-Briones, M. Guerrero-Beltrán, J. Recubrimientos de frutas con biopelículas. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 2013. 7(2): 5 – 14.
161. Ancos, B. González-Peña, D. Colina-Coca, C. Sánchez-Moreno, C. Uso de Películas/Recubrimientos Comestibles en los Productos de IV y V Gama. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. 2015. 16 (1): 8 – 17.
162. Salgado, P. R. Ortiz, C. M. Musso, Y. S. Giorgio, L. D. Mauri, A. N. Edible films and coatings containing bioactives. *Current Opinion in Food Science*. 2015. 5: 86 – 92.
163. Vázquez-Briones, M. Guerrero-Beltrán, J. Algunas investigaciones recientes en recubrimientos comestibles aplicados en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos*. 2014. 8 (2): 5 – 12.
164. Pérez-Gago, M. Krochta, J. (2002) Drying temperature effect on water vapour permeability and mechanical properties of whey protein-lipid emulsion films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002. 49: 2308 – 2312.
165. Gómez-Estaca, J. Montero, P. Effect of functional edible films and high pressure processing en microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine. *Food Chemistry*. 2012. 105: 511 – 520.
166. Hassan, B. Shahid, S. A. Hussain, A. I. Zia, K. M. Akhtar, N. *Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. 109: 1098 – 1107.

167. **Fernández, M. Echeverría, N. Mosquera, A. Paz, P.** Estado actual del uso de recubrimientos comestibles en frutas y hortalizas. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2017. 15(2): 134–141.
168. **Quintero, C. J. Falguera, V. Muñoz, H. A.** Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola. *Revista Tumbanga*. 2010. 1 (5): 93 – 118.
169. **Mármol, Z. Páez, G. Rincón, M. Araujo, K. Aiello, C. Chandler, C. Gutiérrez, E.** Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU*. 2011. Número 1: 53 – 58.
170. **Carlson, R. Taffs, R. Davison, W. Stewart, P.** (2008) Anti-biofilm properties of chitosan-coated surfaces. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*. 2008. 19 (8): 1035 – 1046
171. **Pascall, M. Lin, S. J.** The application of edible polymeric films and coatings in the food industry. *Food, Processing and Technology*. 2013. 4 (2): 1 – 2.
172. **Perdomo, P. Insuasti, A.** Efecto de recubrimiento a base de propóleo y proteína de soya sobre la calidad de la fresa (*Fragaria x ananass Duch*). *Universidad de Cuca: Facultad de Ciencias*. 2015. Tesis profesional. Colombia
173. **Achipiz, S. Castillo, A. Mosquera, S. Hoyos, J. Navia, D.** Efecto de recubrimiento a base de almidón de yuca sobre la maduración de la guayaba (*Psidium gujava*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2013. 11. Edición especial 2: 92 – 100.
174. **Pineda, L. Solis D. Mosquera, S. Hoyos, J.** Efecto de la aplicación de un recubrimiento de almidón hidrolizado de yuca (*Manihot sculenta Crantz*) sobre la maduración del aguacate (*Persea americana Miller*) variedad Hass. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2014. 12 (2): 30 – 39.
175. **Ponce, A. Roura, S. Del Valle, C. Moreira, M.** Actividades antimicrobianas y antioxidantes de recubrimientos comestibles enriquecidos con extractos naturales de plantas: estudios in vitro e in vivo. *Biología y Tecnología Poscosecha*. 2008. 49 (2): 294 – 300.



176. **Pontigo-Suárez, A. Trejo-Márquez, M. Lira-Vargas, A.** Desarrollo de un Recubrimiento con Efecto Antifúngico y Antibacterial a Base de Aceite Esencial de Orégano para Conservación de Papaya ‘Maradol’. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. 2015. 16 (1): 58 – 63.
177. **Gordón-Mendoza, R Camargo-Buitrago, I.** Selección de estadísticos para la estimación de la precisión experimental en ensayos de maíz. *Agronomía Mesoamericana*. 2015. 26 (1): 55 – 63.
178. **Camacho, A. Giles, A. Ortegón, M. Palao, M. Serrano, B. Velázquez, O.** Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. *Universidad Nacional Autónoma de Mexico: Facultad de Química*. 2009. Segunda Edición
179. **Matteini, M. Moles, A.** La química en la restauración: Los materiales del arte pictórico. *Editorial Nardini*. 2001. Primera edición. pp. 246
180. **Münstedt, K., and Bogdanov, S.** Bee products and their potential use in modern medicine. *Journal ApiProduct and ApiMedical Science*. 2009. 1: 57–63.
181. **Trillo, A.** Adulteración de la cera de abeja. Problemática en su industrialización y comercialización. *Universidad Politécnica de Valencia: Grado en Ingeniería Agroalimentaria y Medio Rural*. 2017. Valencia
182. **Vargas-Sánchez, R. D. Torrecano-Urrutia, G. R. Mendoza-Wilson, A. M. Vallejo-Galland, B. Acedo-Félix, E. Sánchez-Escalante, J. J. y col.** Mecanismos Involucrados en la Actividad Antioxidante y Antibacteriana Del Propóleos. *Revista de Ciencias Biológicas y la Salud*. 2014. 16 (1): 32 – 37.
183. **Gil, M. Perelli, A. Alvarado, R. Arias, Y. Blumenthal, E.** Actividad bacteriostática y bactericida de la tintura de propóleos sobre bacterias enteropatógenas. *Salud*. 2012. 16 (3): 21 – 25.
184. **Sagdic, O. Silici, S. Yetim, H.** Fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in apple juice treated with propolis extract. *Annals of Microbiology*. 2007. 57: 345 - 348.
185. **Erkmen, O. Ozcan, M.** Antimicrobial effects of Turkish propolis, pollen, and laurel on spoilage and pathogenic food-related microorganisms. *Journal of Medicinal Food*. 2008. 11 (3): 587- 592

186. **Velazquez, C. Navarro, M. Acosta, A. Angulo, A. Dominguez, Z. Robles, R. Robles-Zepeda, R. y col.** Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology*. 2007. 103: 1747 – 1756.
187. **Choi, Y. Noh, D. Cho, S. Suh, H. Kim, K. Kim, J.** Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT – Food Science and Technology*. 2006. 39: 756 – 761.
188. **Godínez-Oviedo, A. Zamora-Rodríguez, Z. Martínez-Júarez, V. Fleitas-González, E. Hernández-Rosado, A. Peña-Jiménez, F.** Evaluación del efecto antibacterial del aceite de oliva ozonizado contra *Listeria monocytogenes*. *Abanico Veterinario*. 2017. 7 (1): 36 – 43.
189. **Sánchez-Rodríguez, E. Mesa, M.** Compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen. *Nutrición Clínica en Medicina*. 2018. 12 (2): 80 – 94
190. **Karaosmanoglu, H. Soyer, F. Ozen, B. Tokatli, F.** Antimicrobial and Antioxidant Activities of Turkish Extra Virgen Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010. 58: 8238 – 8245.
191. **Fratini, F. Cilia, G. Turchi, B. Felicioli, A.** Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2016. 9 (9): 839 – 843
192. **Dağdelen, A.** Identifying Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Phenolic Extracts and Mineral Contents of Virgin Olive Oils (*Olea europaea L. cv. Edincik Su*) from Different Regions in Turkey. *Journal of Chemistry*. 2016. 11 pages
193. **Newell, D. Manning, G. Goldberg, M. Morgan, D. Wassenaar, T.** The effect of virulence factors on dose response of foodborne pathogens. In *Gurtler, J. Doyle, M. Kornacki, J. (Eds.) Foodborne pathogens. Food Microbiology and Food Safety*. 2017. Springer International Publishing AG
194. **Scott, R. Thilmony, R. Harden, L. Zhou, Y. Brandl, M.** *Escherichia coli* O157-H7 Converts Plant-Derived Choline to Glycine Betaine for Osmoprotection During Pre- And Post-Harvest Colonization of Injured Lettuce Leaves. *Frontiers in Microbiology*. 2017. 8.

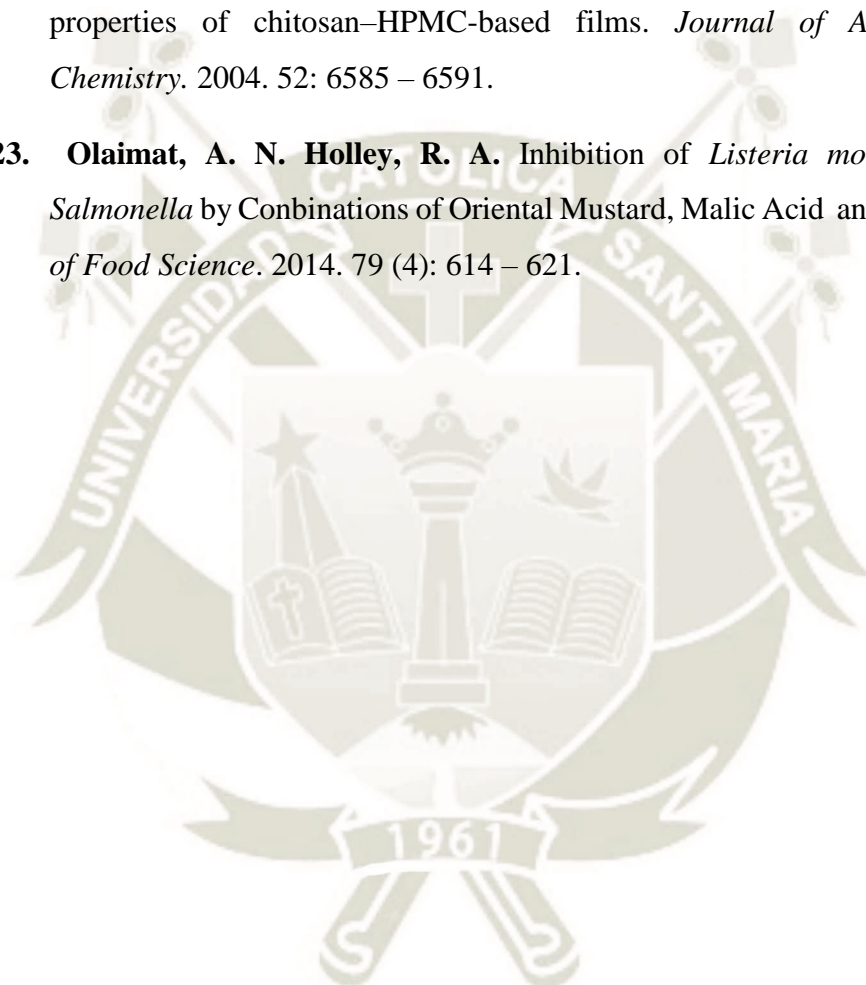
195. Söderström, A. Österberg, P. Lindqvist, A. Jönsson, B. Lindberg, A. Blide, S. Welinder-Olsson, C. Löfdahl, S. y col. A large *Escherichia coli* O157 outbreak in Sweden associated with locally produced lettuce. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2008. 5 (3): 339 – 349.
196. Kozak, G. MacDonald, D. Landry, L. Farber, J. Foodborne outbreaks in Canada linked to produce: 2001 through 2009. *Journal Food and Protection*. 2013. 76 (1): 173 – 183.
197. Frank, C. Faber, M. Askar, M. Bernard, H. Fruth, A. Gilsdorf, A. Hohle, M. Karch, H. Krause, G. Prager, R. Spode, A. y col. Large and ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome, Germany, May 2011. *Eurosurveillance*. 2011. 16 (21).
198. Kupferschmidt, K. As *E. coli* outbreak recedes, new questions come to the fore. *Science*. 2011. 333 (6038): 27.
199. Alegre, I. Abadias, M. Anguera, M. Oliveira, M. Viñas, I. Factors affecting growth of foodborne pathogens on minimally processed apples. *Food Microbiology*. 2010. 27: 70–76.
200. Maki, D. Don't eat the spinach — controlling foodborne infectious disease. *The New England Journal of Medicine*. 2006. 355: 1952 – 1955.
201. Angelo, K. Conrad, A. Saupe, A. Dragoo, H. West, N. Sorenson, A. Barnes, A. Doyle, M. Beal, J. Jackson, K. y col. (2017) Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infections linked to whole apples used in commercially produced, prepackaged caramel apples: United States, 2014–2015. *Epidemiology & Infection*: 2017. 145 (5): 848 – 856
202. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Commercially Produced, Prepackaged Caramel Apples. 2015. Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/caramel-apples-12-14/index.html> Último acceso: 15 Noviembre 2018
203. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado, 2011.



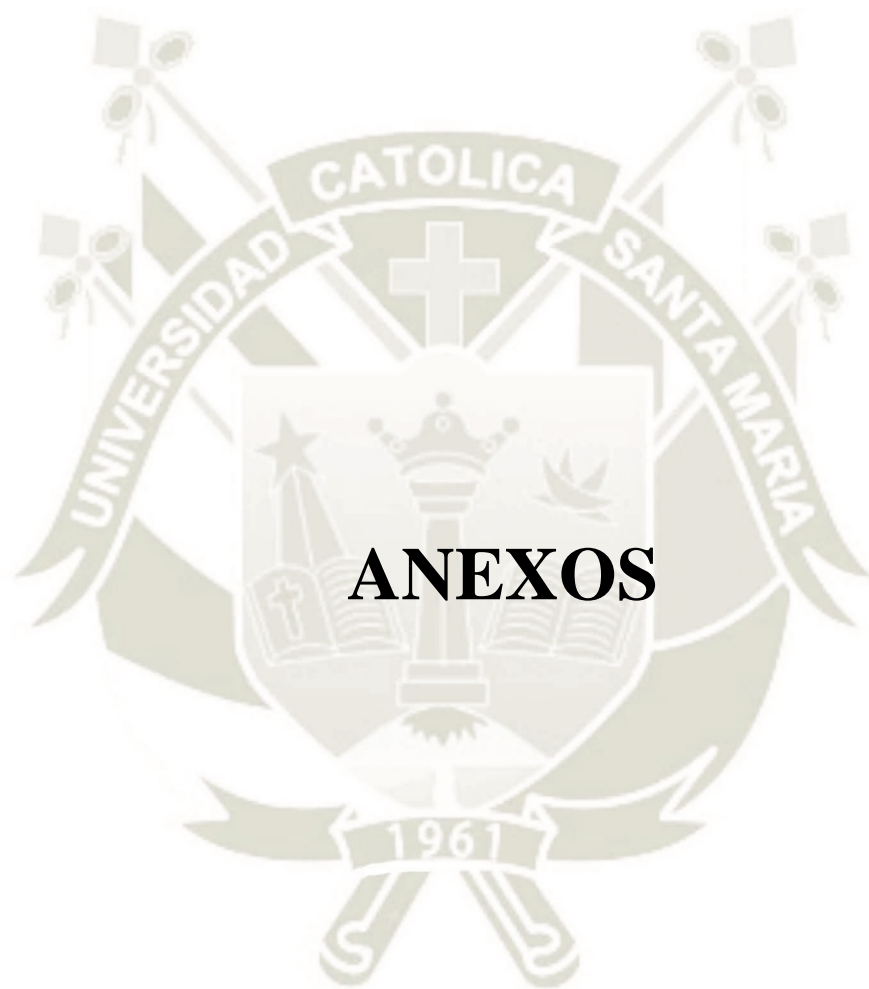
2012. Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html> Último acceso: 15 Noviembre 2018
204. **Jeyaletchumi, P. Tunung, R. Selina, P. Chai, L. Radu, S. Farinazleen, M. Cheah, Y. Mitsuaki, N. Yoshitsugu, N. Kumar, M.** Assessment of *Listeria monocytogenes* in salad vegetables through kitchen simulation study. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*. 2012. 40: 55 – 62.
205. **Gómez, M. Solís, L. Heredia, N. García, S. Moreno, G. Tovar, O. Isunza, G.** Analysis of microbial contamination levels of fruits and vegetables at retail in Monterrey, Mexico. *The Journal of Food, Agriculture and Environment*. 2012. 10: 152 – 156.
206. **Shrivastava, S.** Listeria Outbreak—Bacteria Found in Romaine Lettuce: FDA. 2011. Disponible en: <https://www.ibtimes.com/listeria-outbreak-bacteria-found-romaine-lettuce-fda-320544> Último acceso: 15 Noviembre 2018
207. **Ponniah, J. Robin, T. Paie, M. Radu, S. Ghazali, F. Kqueen, C. Nishibuchi, M. Nakaguchi, Y. Malakar, P.** *Listeria monocytogenes* in raw salad vegetables sold at retail level in Malaysia. *Food Control*. 2010. 21: 774 – 778.
208. **Aureli, P. Fiorucci, G. Caroli, D. Marchiaro, G. Novara, o. Leone, L. Salmaso, S.** An Outbreak of Febrile Gastroenteritis Associated with Corn Contaminated by *Listeria monocytogenes*. *The New England Journal of Medicine*. 2000. 342 (17): 1236 – 1241.
209. **Warriner, K. Namvar, A.** The tricks learnt by human enteric pathogens from phytopathogens to persist within the plant environment. *Current Opinion in Biotechnology*. 2010. 21 (2): 131 – 136
210. **Maki, D.** Coming to Grips with Foodborne Infection – Peanut, Butter, Peppers and Nationwide *Salmonella* Outbreaks. *The New England Journal of Medicine*. 2009. 360: 949 – 953.
211. **Penteado, A. Eblen, B. Miller, A.** Evidence of salmonella internalization into fresh mangos during simulated postharvest insect disinfestation procedures. *Journal Food Protection*. 2004. 67: 181 – 184.

212. Sivapalasingam, S. Barrett, A. Kimura, A. Van Duyne, S. De Witt, W. Ying, M. Frisch, A. Phan, Q. Gould, E. Shillam, P. y col. A multistate outbreak of *Salmonella enterica* Serotype Newport infection linked to mango consumption: impact of water-dip disinfection technology. *Clinical Infectious Diseases*. 2003. 37 (12): 1585 – 1590.
213. Campbell, J. Mohle-Boetani, J. Reporter, R. Abbott, S. Farrer, J. Mandrell, R. Werner, S. An outbreak of *Salmonella* serotype Thompson associated with fresh cilantro. *Journal Infection Diseases*. 2001. 183 (6): 984 – 987.
214. Mei-Soon, J. Manning, L. Paul-Davies, W. Baines, R. Fresh produce-associated outbreaks: a call for HACCP on farms? *British Food Journal*. 2012. 114 (4): 553 – 597.
215. Naimi, T. Wicklund, J. Olsen, S. Krause, G. Wells, J. Bartkus, J. Boxrud, D Sullivan M, Kassenborg, H. Besser, J. Mintz, E. Osterholm, M. Hedberg, C. Concurrent outbreaks of *Shigella sonnei* and enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with parsley: implications for surveillance and control of foodborne illness. *Journal Food Protection*. 2003. 66: 535 – 541.
216. Shen, X. L. Wu. J. M. Chen, Y. Zhao, G. Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. *Food Hydrocolloids*. 2010. 24: 285 – 290.
217. Pelissari, F. M. Grossmann, M. V. E. Yamashita, F. Pined, E. A. G. Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch–chitosan films incorporated with oregano essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009. 57: 7499 – 7504.
218. Brown, C. A. Wang, B. Oh. J. H. Antimicrobial activity of lactoferrin against foodborne pathogenic bacteria incorporated into edible chitosan film. *Journal of Food Protection*. 2008. 71: 319 – 324.
219. Duan, J. Park, S. I. Daeschel, M. A. Zhao, Y. Antimicrobial chitosan–lysozyme (CL) films and coatings for enhancing microbial safety of mozzarella cheese. *Journal of Food Science*. 2007. 72: 355 – 362.

220. **Chung, Y-C. Chen, C-Y.** Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technology*. 2008. 99: 2806 – 2814.
221. **Sánchez-González, L. González-Martínez, C. Chiralt, A. Cháfer, M.** Physical and antimicrobial properties of chitosan–tea tree essential oil composite films. *Journal of Food Engineering*. 2010. 98: 443 – 452.
222. **Möller, H. Grelier, S. Pardon, P. Coma, V.** Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan–HPMC-based films. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 2004. 52: 6585 – 6591.
223. **Olaimat, A. N. Holley, R. A.** Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by Combinations of Oriental Mustard, Malic Acid and EDTA. *Journal of Food Science*. 2014. 79 (4): 614 – 621.







## ANEXO 1

## MEDIOS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICOS

## 1. AGAR NUTRITIVO

**Fundamento**

Medio de cultivo nutritivo no selectivo, en el cual la pluripeptona y el extracto de carne constituyen la fuente de carbono, nitrógeno y aportan nutrientes para el desarrollo bacteriano. El agregado de cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante.

Puede ser suplementado con sangre ovina desfibrinada estéril para favorecer el crecimiento de microorganismos exigentes en sus requerimientos nutricionales y permite una clara visualización de las reacciones de hemólisis.

**Composición**

Agar Nutritivo	
Composición	Cantidades (g/L)
<b>Pluripeptona</b>	5.0
<b>Extracto de carne</b>	3.0
<b>Cloruro de sodio</b>	8.0
<b>Agar</b>	15.0
pH final $7.3 \pm 0.2$	

**Instrucciones**

Suspender 31 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 o 2 minutos hasta su disolución total. Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}$  durante 15 minutos.

## 2. CALDO NUTRITIVO

### Fundamento

Medio de cultivo nutritivo no selectivo, contiene pluripectona (una mezcla de partes iguales de peptona de carne y de caseína) y extracto de carne constituyen la fuente de carbono y nitrógeno necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano.

Puede ser utilizado además, como preenriquecimiento cuando se analizan ciertos alimentos y productos lácteos para *Salmonella spp.* En los alimentos secos o procesados, las salmonelas pueden sufrir lesiones subletales y estar presentes en números bajos por eso la presencia de otras bacterias y componentes de muestras alimentarias pueden dificultar el crecimiento y recuperación de esta bacteria. El preenriquecimiento en un medio no selectivo como el caso nutritivo permite la reparación de daños celulares, diluye sustancias tóxicas o inhibitoras y proporciona una ventaja nutricional sobre otras bacterias.

### Composición

Caldo Nutritivo	
Composición	Cantidades (g/L)
<b>Pluripectona</b>	5.0
<b>Extracto de carne</b>	3.0
pH final $6.9 \pm 0.2$	

### Instrucciones

Suspender 8 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Reposar 5 minutos y calentar con agitación frecuente, llevando a ebullición para disolución total. Distribuir en tubos o recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 118 – 121°C durante 15 minutos.



ANEXO 2

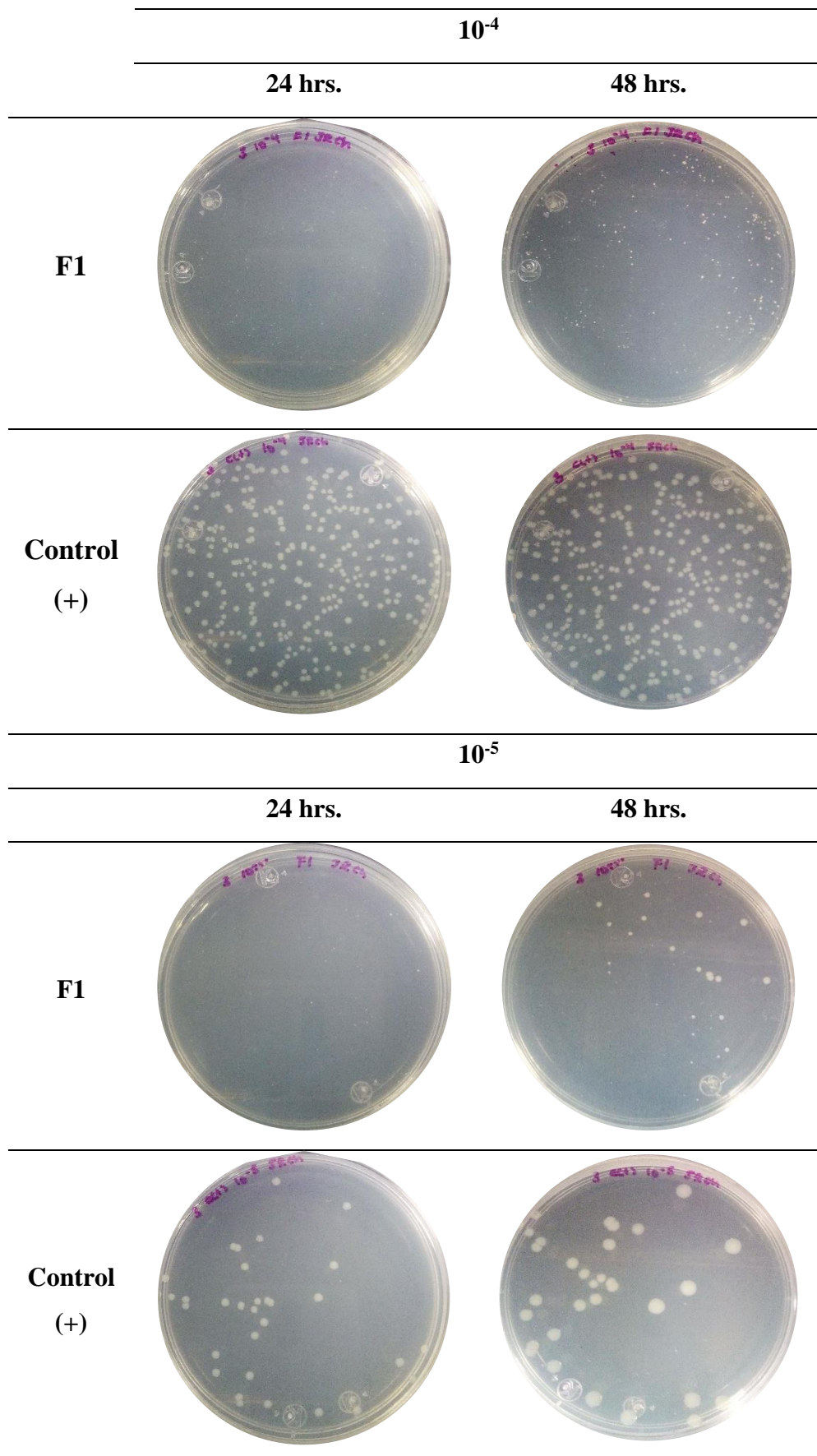


Figura 29. Evaluación del recubrimiento F1 sobre *E. coli* O157-H7 a ambos tiempos de incubación

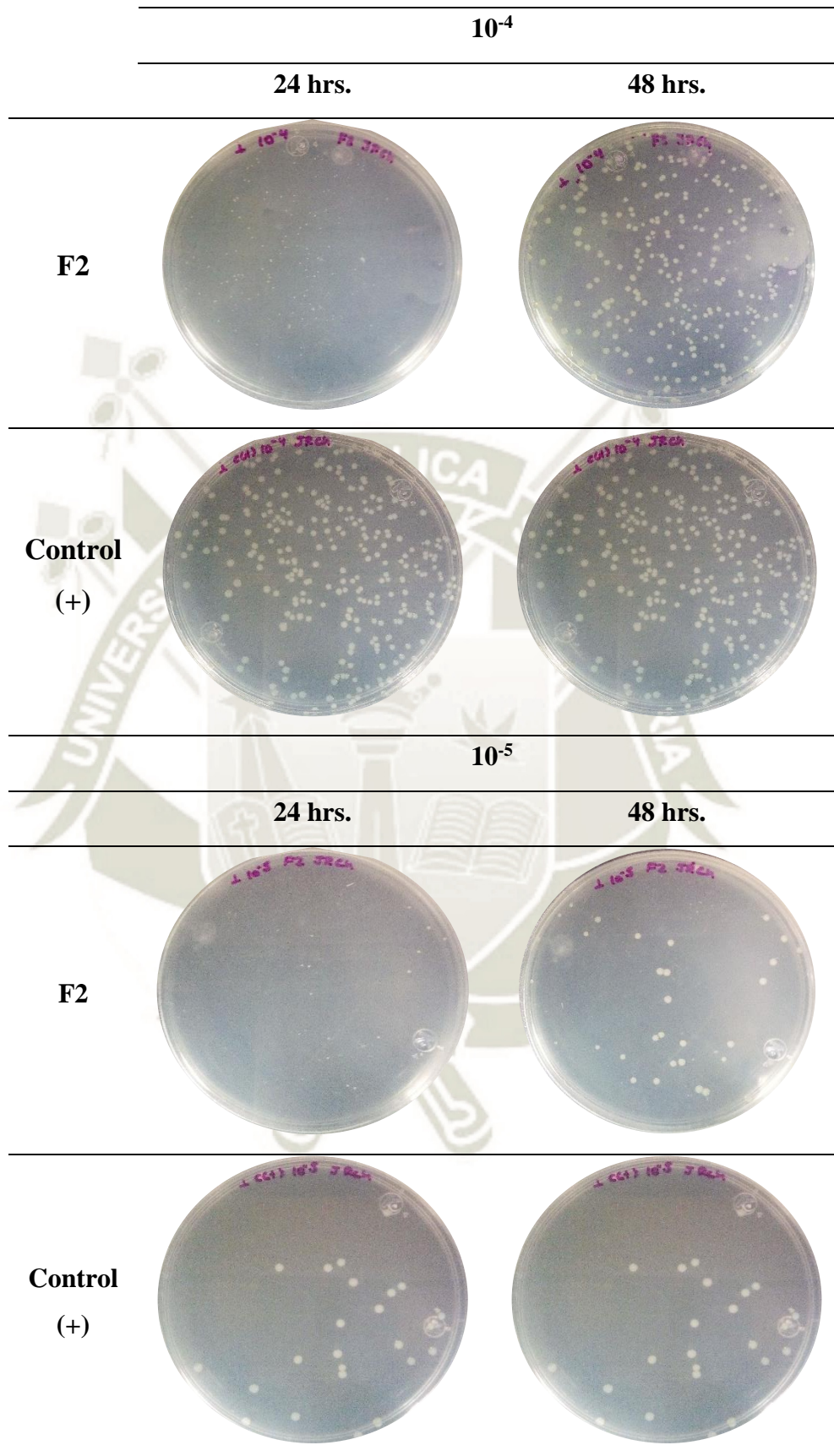


Figura 30. Evaluación del recubrimiento F2 sobre *E. coli* O157-H7 a ambos tiempos de incubación



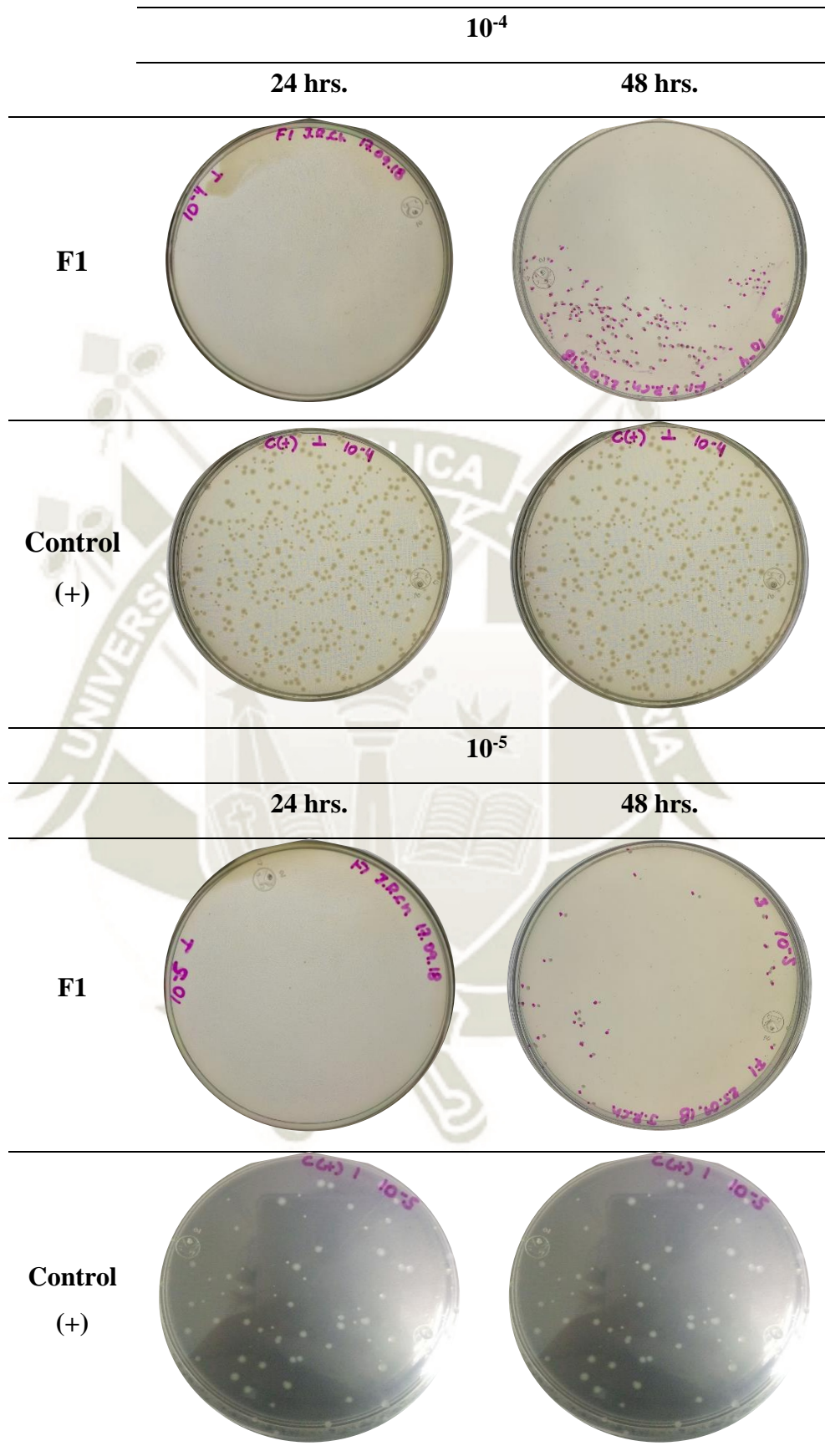


Figura 31. Evaluación del recubrimiento F1 sobre *E. coli* DH5 $\alpha$  a ambos tiempos de incubación



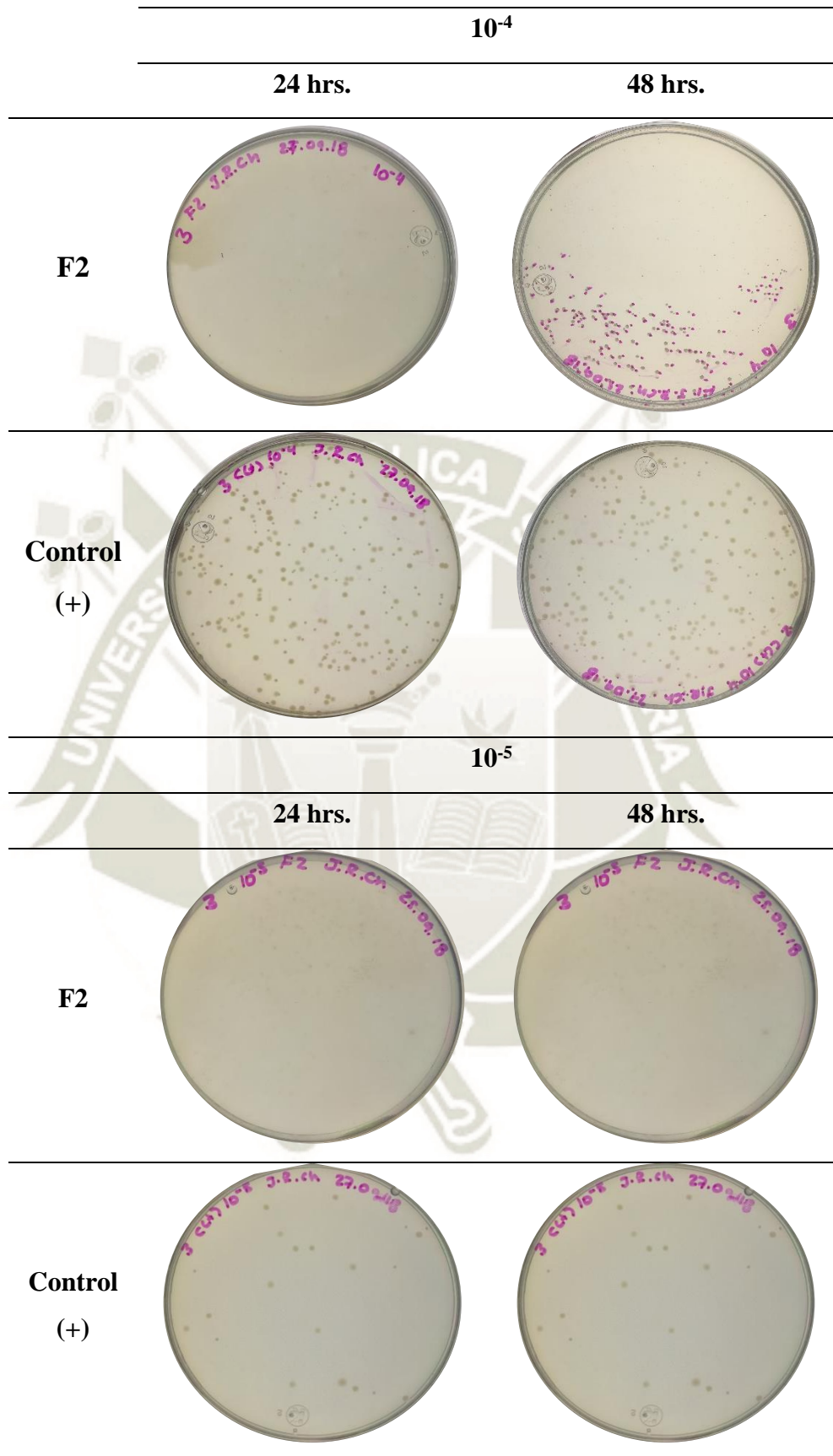


Figura 32. Evaluación del recubrimiento F2 sobre *E. coli* DH5 $\alpha$  a ambos tiempos de incubación

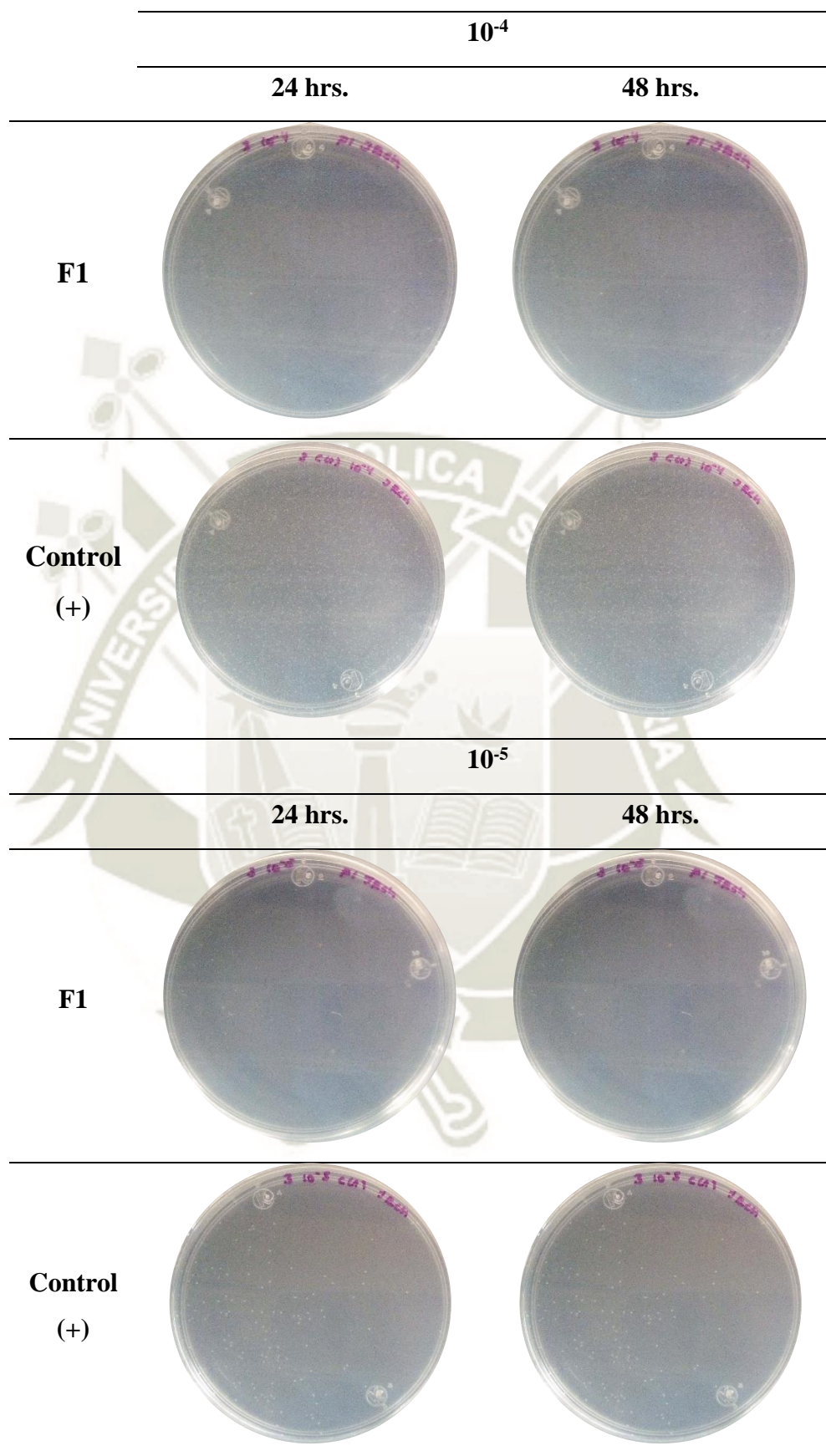


Figura 33. Evaluación del recubrimiento F1 sobre *L. monocytogenes* a ambos tiempos de incubación



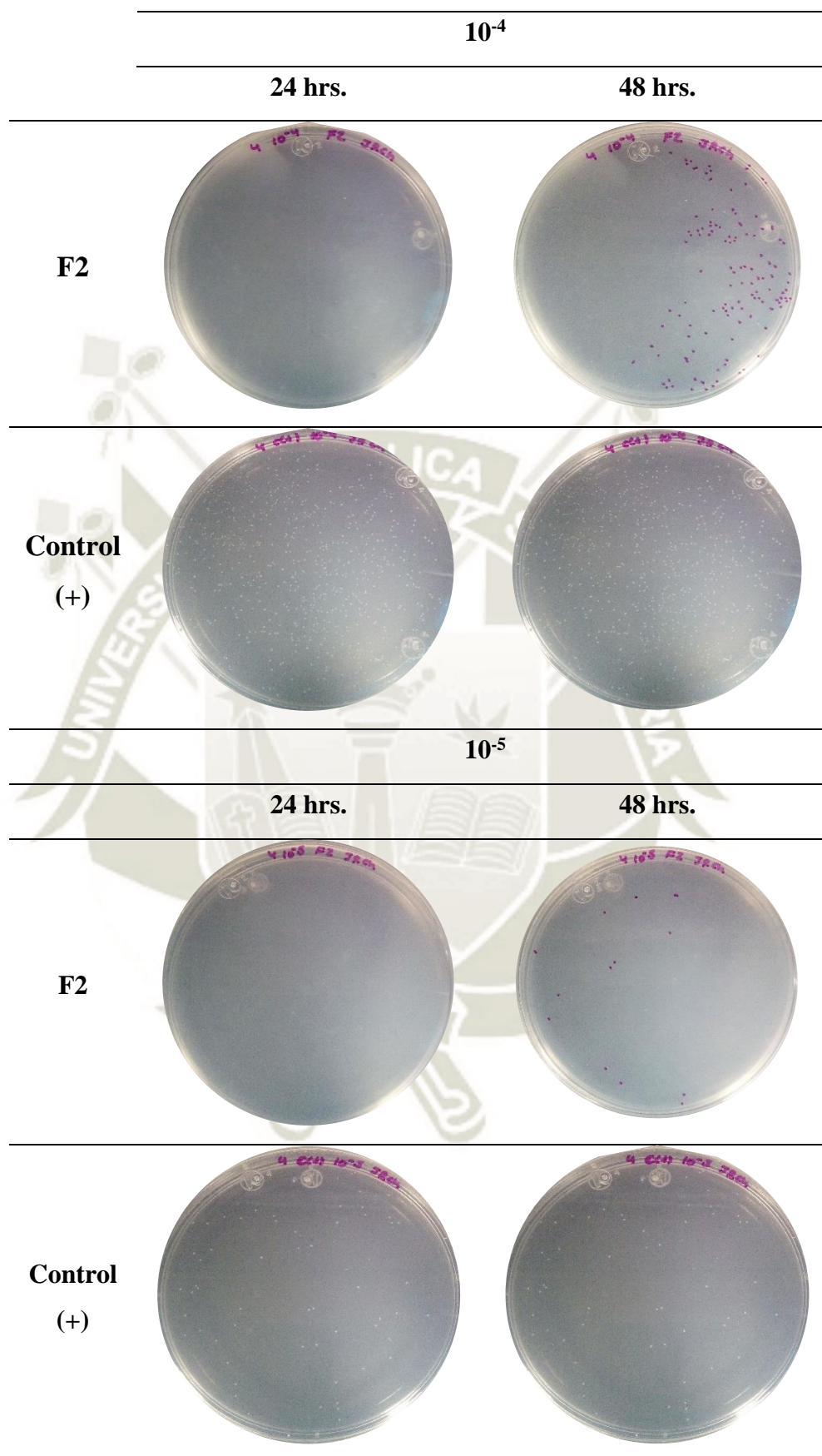


Figura 34. Evaluación del recubrimiento F2 sobre *L. monocytogenes* a ambos tiempos de incubación



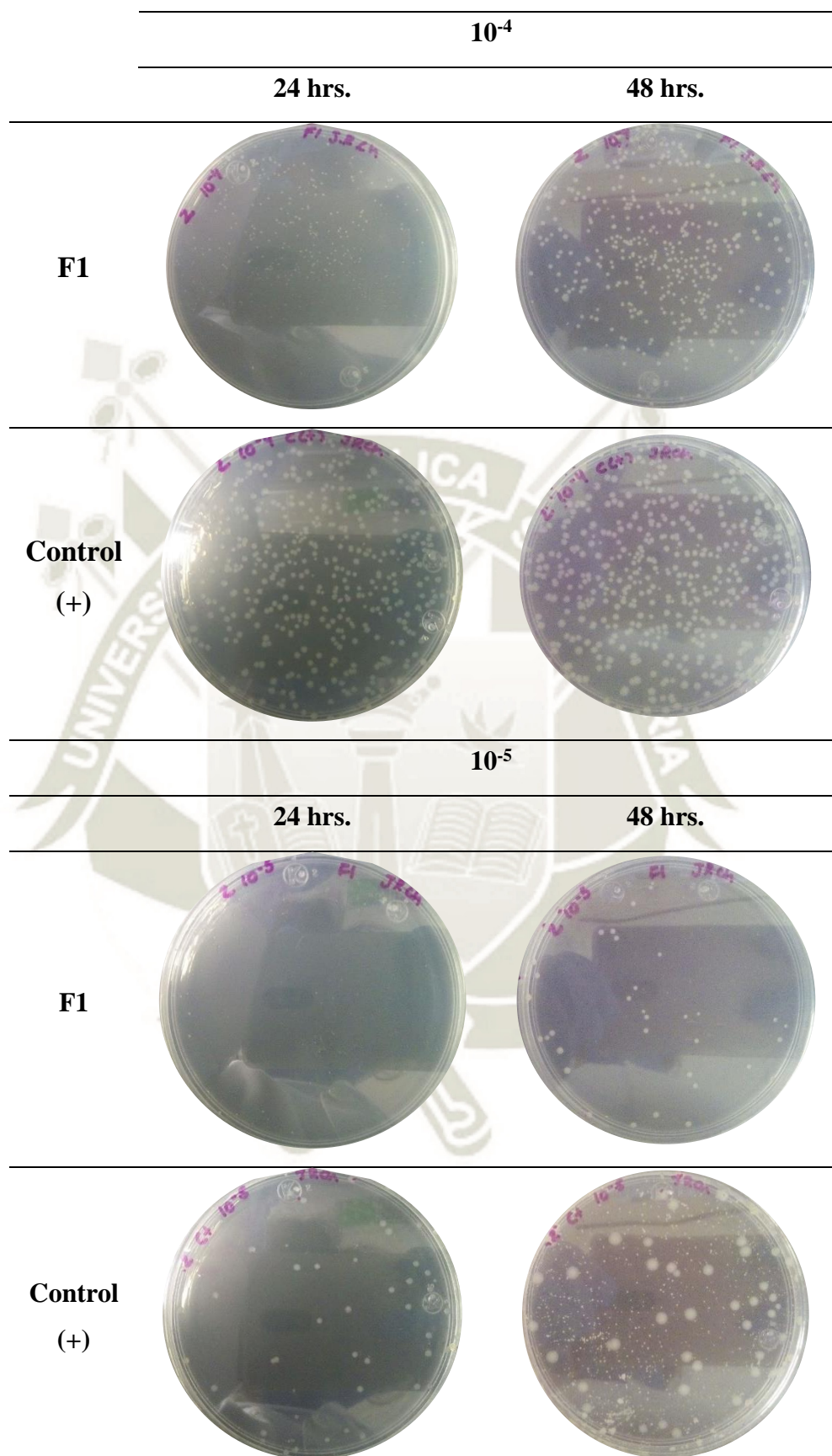


Figura 35. Evaluación del recubrimiento F1 sobre *S. enteritidis* a ambos tiempos de incubación

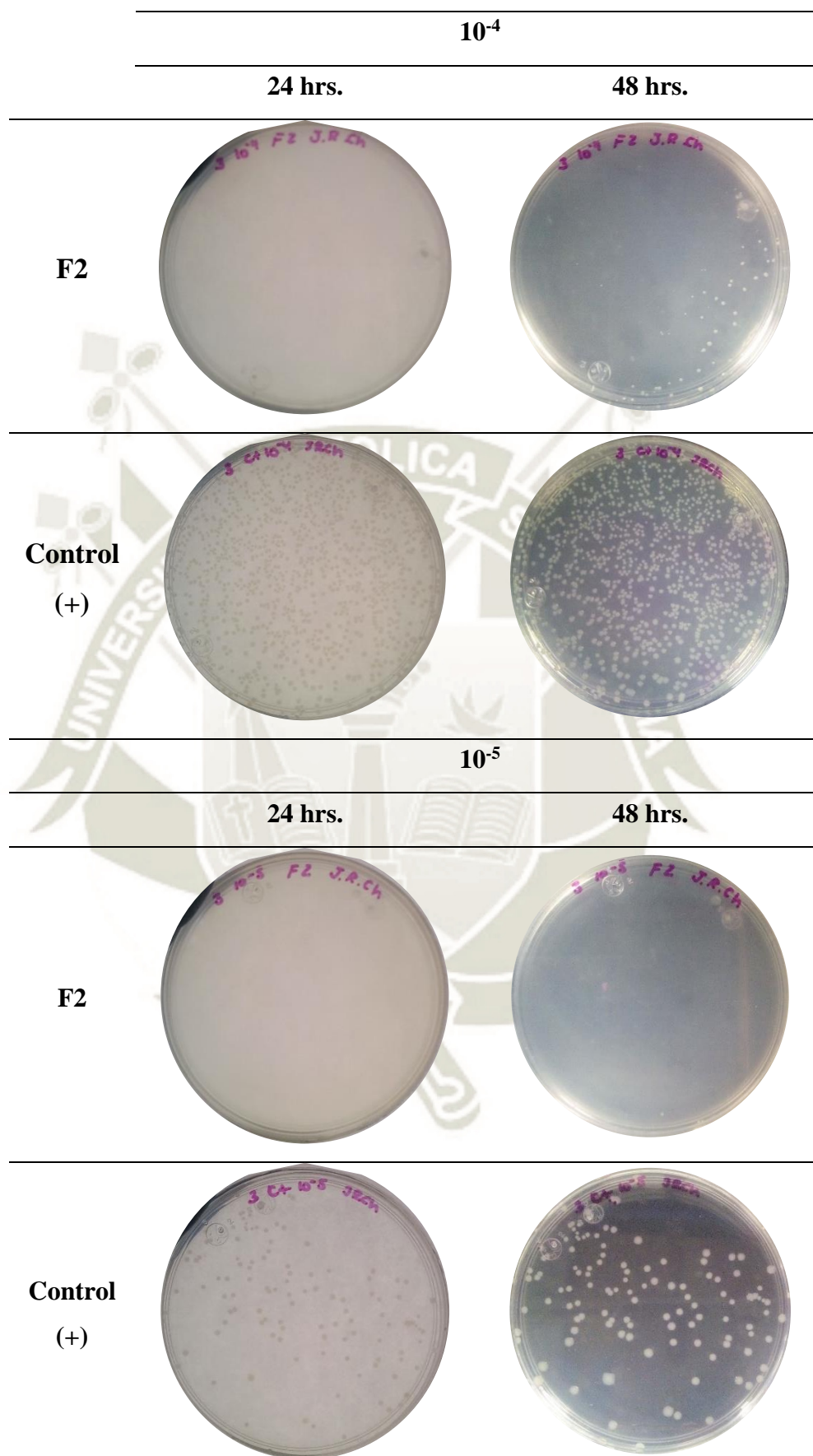


Figura 36. Evaluación del recubrimiento F2 sobre *S. enteritidis* a ambos tiempos de incubación



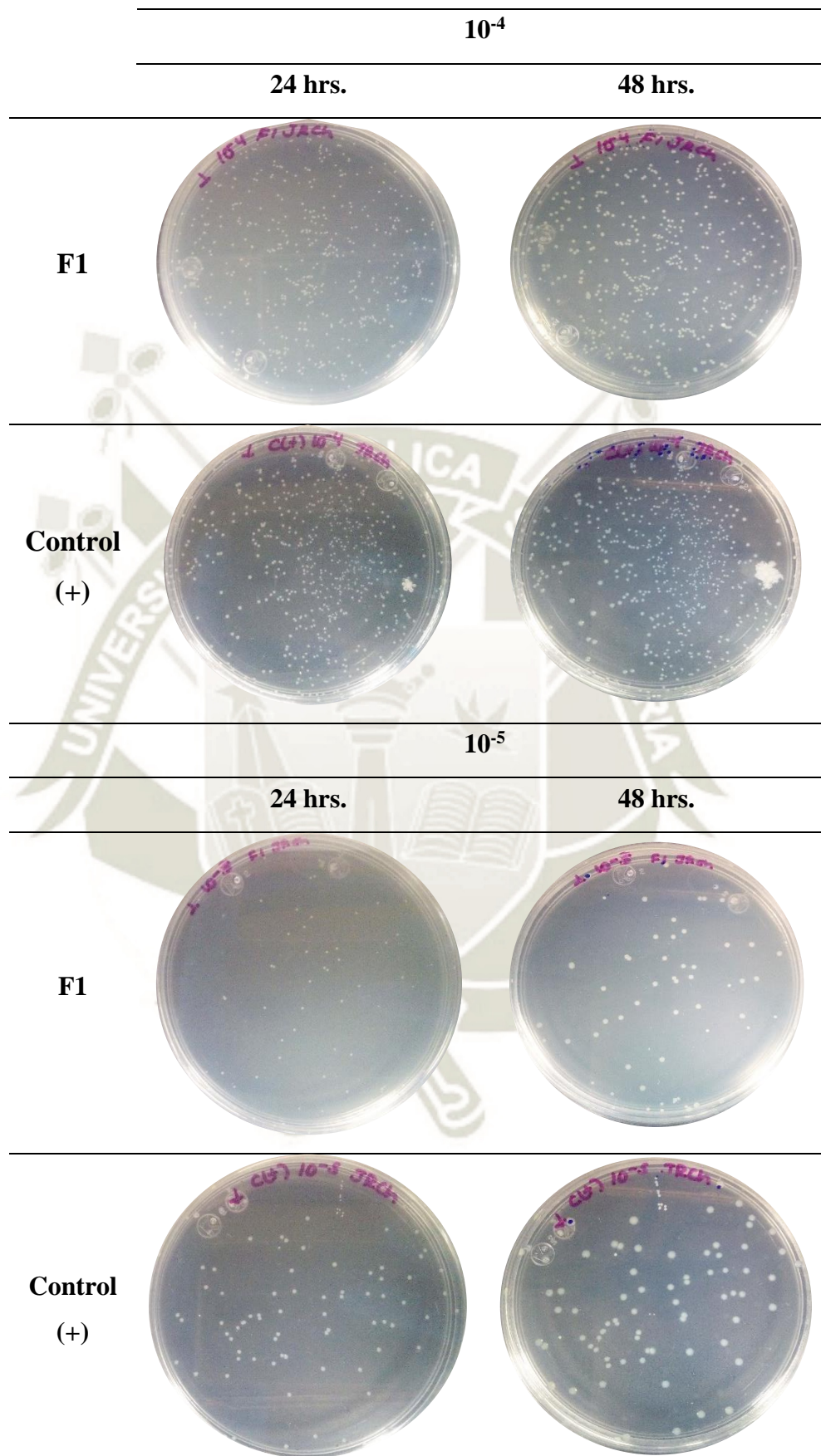


Figura 37. Evaluación del recubrimiento F1 sobre *S. flexneri* a ambos tiempos de incubación



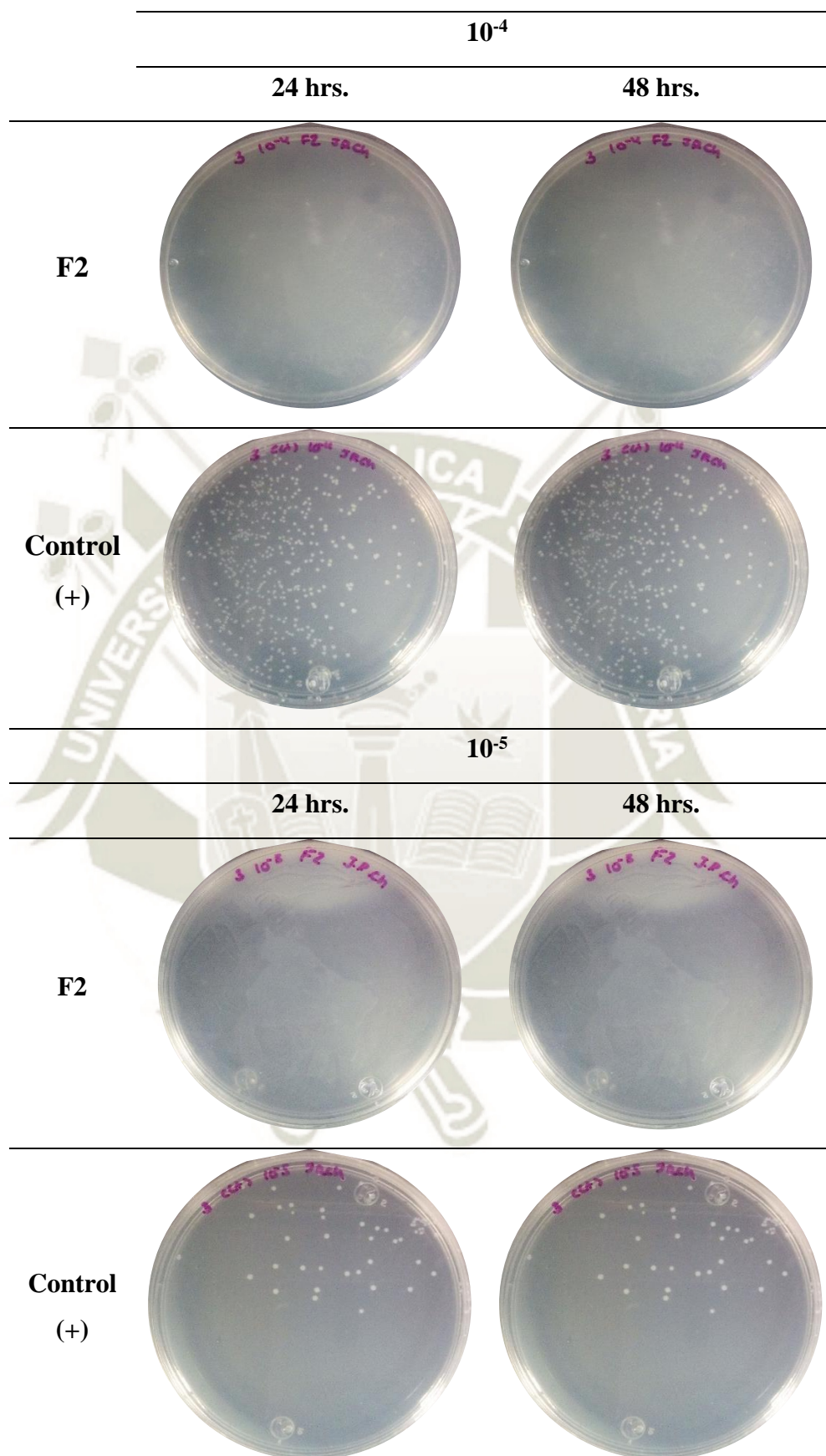


Figura 38. Evaluación del recubrimiento F2 sobre *S. flexneri* a ambos tiempos de incubación

ANEXO 3

Tabla 20. Composición del recubrimiento F1



Quitosano	1%	
Cera de abeja	0.10%	
Glicerol	0.30%	
Ácido oleico	-	
Aceite esencial de limón	0.10%	
Ácido acético	98.50%	

Tabla 21. Composición del recubrimiento F2

Quitosano	1%	
Cera de abeja	-	
Glicerol	0.30%	
Ácido oleico	1%	
Aceite esencial de limón	0.10%	
Ácido acético	97.60%	