



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**CAPACIDAD CONSERVADORA Y SANITIZANTE DE UN
PRODUCTO DE ORIGEN NATURAL.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERA EN ALIMENTOS
P R E S E N T A :
GUICELA RAMIREZ BERNAL

ASESORES:

DRA. CLARA INES ALVAREZ MANRIQUE
I.A. MARIA DE LOURDES RAMIREZ RODRIGUEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. 2005



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Gisela Ramirez Beron

FECHA: 16-Agosto-2005

FIRMA: GB



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 P R E S E N T E

DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Capacidad conservadora y sanitizante de un producto de origen natural",

que presenta la pasante: Guicela Ramírez Bernal
 con número de cuenta: 09256445-7 para obtener el título de :
Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de Junio de 2005.

PRESIDENTE Dra. Clara Inés Álvarez Manrique *Clara Inés Álvarez M.*
 VOCAL MC. Carolina Moreno Ramos *Carolina Moreno*
 SECRETARIO IA. Guadalupe López Franco *López Franco y Gu.*
 PRIMER SUPLENTE MC. María Guadalupe Amaya León *M.D.*
 SEGUNDO SUPLENTE IA. Miriam Álvarez Velasco *M.A.V.*

AGRADEZCO

A dios por todo lo que me ha dado.

A la UNAM por brindarme una formación profesional.

A la Dra. Clara Inés Alvarez Manrique y a la I.A. Ma. de Lourdes Ramírez Rodríguez por la confianza, tiempo y conocimientos que me dedicaron para la realización de este trabajo.

A mis Padres y a Ma. Luisa Cervantes y Antonio Bernal por su educación, cariño y cuidados.

A la empresa PL Corporación por su confianza y atenciones.

Dedico este trabajo a todas las personas que de alguna manera hicieron posible que se realizara.

INDICE

	pag.
1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS	5
2.1 OBJETIVO GENERAL	5
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	5
3. ANTECEDENTES	6
3.1 INOCUIDAD ALIMENTARIA	6
3.2 MICROORGANISMOS PATÓGENOS	9
3.2.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	9
3.2.2 <i>Salmonella</i>	16
3.3 CONTAMINACIÓN	21
3.3.1 INSTALACIONES	22
3.3.2 PRODUCTOS LÁCTEOS	25
3.3.3 CARACTERISTICAS DE MATERIALES FRECUENTEMENTE USADOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	31
3.4 HIGIENE, LIMPIEZA Y SANITIZACIÓN	33
3.4.1 HIGIENE	33
3.4.2 LIMPIEZA Y SANITIZACIÓN	34
3.5 ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN NATURAL	39
3.6 RESISTENCIA MICROBIANA	51
3.6.1 RESISTENCIA AMBIENTAL	51
3.6.2 RESISTENCIA FRENTE A ANTIMICROBIANOS	53
3.6.3 RESISTENCIA CONFERIDA POR BIOFILMS	55
4. CUADRO METODOLOGICO	65
5. METODOLOGÍA	66
6. RESULTADOS	73
7. DISCUSIÓN	84
8. CONCLUSIONES	95
9. REFERENCIAS	96

INDICE DE TABLAS Y DIAGRAMAS

	pag.
Tabla 1. Brotes de ETA de origen Bacteriano en América según agente Etiológico	7
Tabla 2. Alimentos involucrados en brotes de ETA en México (1993-1997).	7
Tabla 3. Efecto inhibitorio del antimicrobiano en caldo.	68
Tabla 4. Preparación del inóculo de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella typhi</i> .	73
Tabla 5. Efecto inhibitorio de Citrol-k en caldo frente a <i>Listeria monocytogenes</i> con un tiempo de contacto de 24 hrs.	74
Tabla 6. Efecto inhibitorio de Citrol-k frente a <i>Listeria monocytogenes</i> con un tiempo de contacto de 7 días.	74
Tabla 7. Efecto inhibitorio de Citrol-k en caldo frente a <i>Salmonella typhi</i> con un tiempo de contacto de 24 hrs.	75
Tabla 8. Efecto inhibitorio de Citrol-k en caldo frente a <i>Salmonella typhi</i> con un tiempo de contacto de 7 días .	75
Tabla 9. Preparación del inóculo de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella typhi</i> .	77
Tabla 10. Inhibición de <i>L. monocytogenes</i> y/o <i>S. typhi</i> en acero inoxidable.	77
Tabla 11. Inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> y/o <i>Salmonella typhi</i> en plástico.	78
Tabla 12. Inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> y/o <i>Salmonella typhi</i> en madera.	78
Tabla 13. Preparación del inóculo de <i>L. monocytogenes</i> y/o <i>S. typhi</i> .	79
Tabla 14. Efecto bacteriostático de Citrol-k en queso panela frente a <i>Listeria monocytogenes</i> aplicado antes o después de cuajar.	80
Tabla 15. Efecto bacteriostático de Citrol-k en queso panela frente a <i>Salmonella typhi</i> aplicado antes o después de cuajar.	80
Tabla 16. Preparación del inóculo de <i>L. monocytogenes</i> y/o <i>S. typhi</i> .	81
Tabla 17. Efecto inhibitorio de Citrol-k frente a <i>Listeria monocytogenes</i> en leche con un tiempo de contacto de 24 y 48 horas.	82
Tabla 18. Efecto inhibitorio de Citrol-k frente a <i>Salmonella typhi</i> en leche con un tiempo de contacto de 24 y 48 horas.	82
Tabla 19. Inhibición de Mohos en superficies de queso Manchego.	83
Diagrama 1. Elaboración de Queso Panela	70
Diagrama 2. Elaboración de Queso Manchego	72

1. INTRODUCCIÓN

En la industria de alimentos la obtención de un producto de calidad es la consecuencia de múltiples factores interrelacionados como son calidad de las materias primas, proceso, instalaciones y equipo adecuados, además el grado de limpieza y sanitización de estos. En muchas ocasiones, la existencia de problemas o no conformidades en el producto final está relacionado directamente con una sanitización ineficaz debido generalmente a una mala elección del sanitizante o a su utilización inadecuada. La limpieza no consigue la eliminación completa de los microorganismos existentes, esta es la razón que justifica la necesidad de realizar una sanitización después de la limpieza para reducir al mínimo la carga microbiana. Dos de los factores que más a menudo contribuyen a la aparición de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos son: el uso de equipos contaminados y la falta de higiene en los manipuladores.

La aparición de *L. monocytogenes* como agente etiológico de una enfermedad transmitida por alimentos fue súbita, si bien sólo han sido registrados unos pocos brotes, la presencia de este patógeno ha despertado un interés universal, desde principios de la década de los 80's, este microorganismo ha sido objeto de estudio de varias investigaciones y artículos de revisión, además de sesiones de conferencias; el reconocer que la infección causada por esta bacteria puede tener serias consecuencias, que los alimentos pueden ser un vector importante de infección en el humano y saber que la refrigeración permite su crecimiento, ha hecho que los fabricantes de alimentos hagan un gran esfuerzo para excluir a este organismo de sus productos.

La Salmonelosis es una de las infecciones más frecuentes de origen alimentario registradas y probablemente la más conocida, los alimentos han sido identificados como vehículos para la transmisión del agente causal a los seres humanos y a los ambientes de elaboración de alimentos.

Estos patógenos, como varios microorganismos provenientes de alimentos, pueden unirse a las superficies y formar biofilms, difíciles de remover por limpieza normal, los cuales

protegen a los microorganismos, de agentes antimicrobianos y frecuentemente sirven como una fuente de recontaminación para alimentos procesados.

En la actualidad existe cierta preferencia por parte de los consumidores hacia los productos que cuentan con mayor vida de anaquel y que contengan conservadores naturales, lo que ha dado como resultado el interés en las investigaciones acerca de las propiedades antimicrobianas de compuestos obtenidos de fuentes naturales y la tendencia en la industria alimentaria a emplear dichos productos naturales, biodegradables, no tóxicos y eficientes frente a los microorganismos; dentro de ellos se encuentran los elaborados a base de cítricos que tienen amplio espectro antimicrobiano contra bacterias Gram (+), Gram (-), Mohos y Levaduras, esta actividad puede variar cuando se valoran *in vitro*, en el alimento como conservador ó en diferentes superficies como sanitizante, por esto es necesario comprobar si esos productos cumplen su objetivo.

En este trabajo se evaluó experimentalmente la actividad antimicrobiana de Citrol-k, un producto comercial derivado de cítricos elaborado por la empresa PL Corporación; dicha evaluación se llevó a cabo al aplicarlo como sanitizante en superficies empleadas en la industria láctea, como conservador en Queso Panela y en superficies de Queso Manchego.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la actividad sanitizante y conservadora de un antimicrobiano comercial derivado de cítricos.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

OBJETIVO PARTICULAR 1:

Estudiar *in vitro* el comportamiento de Citrol-k frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhi*.

OBJETIVO PARTICULAR 2:

Determinar la actividad bactericida de Citrol-k frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhi* en acero inoxidable, plástico y madera.

OBJETIVO PARTICULAR 3:

Evaluar la efectividad de Citrol-k como conservador en queso panela y leche frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhi*.

OBJETIVO PARTICULAR 4:

Establecer la capacidad conservadora de Citrol-k frente a Mohos, aplicado superficialmente a queso manchego.

3. ANTECEDENTES

3.1 INOCUIDAD ALIMENTARIA

La inocuidad es la ausencia de agentes nocivos a la salud o a la integridad de las personas, estos pueden ser físicos, químicos, ó biológicos, se dice que existe inocuidad alimentaria, cuando se garantiza que un alimento no causa daño, mientras que se le consume en las condiciones pre-establecidas. La ciencia de la inocuidad de los alimentos surge del interés por prevenir las ETAs de Etiología (origen) microbiana; ETA es el síndrome originado por la ingestión de alimentos o agua que contengan agentes etiológicos en cantidades tales que afecten la salud del consumidor a nivel individual o grupos de población; la Inocuidad de los alimentos es un problema que impacta al comercio internacional ⁽³⁸⁾.

De acuerdo a estudios realizados por la OPS (Organización Panamericana de la Salud) y la OMS (Organización Mundial de la Salud), los agentes que causaron los brotes en América en el periodo de 1995-1999 son:

- Bacterias 52.7%
- Toxinas marinas 30.7%
- Virus 6.6%
- Químicos 5.0%
- Parásitos 3.80%
- Toxinas vegetales 1.2%

De los brotes causados por bacterias en América, el agente etiológico más frecuente es *Salmonella* (Tabla 1). En México, los alimentos que más frecuentemente están involucrados con brotes de ETA son el Agua, los alimentos mixtos y los Lácteos (Tabla 2) ⁽³⁸⁾. En 2003 fueron reportados al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 106,160 casos de fiebre tifoidea, paratifoidea y otras Salmonelosis, siendo 108,750 los casos reportados para 2004 ⁽⁵¹⁾.

Tabla 1. Brotes de ETA de origen Bacteriano en América según agente Etiológico 1995-1999 ⁽³⁸⁾.

Agente Etiológico	%
<i>Salmonella</i>	34.10
<i>S. aureus</i>	33.50
<i>E. coli</i>	9.85
<i>Cl. perfringens</i>	8.70
<i>Shigella</i>	5.10
<i>Vibrio cholerae</i>	3.50
<i>B. cereus</i>	1.85
<i>Cl. botulinum</i>	0.50
Otras	2.90

Tabla 2. Alimentos involucrados en brotes de ETA en México (1993-1997) ⁽³⁸⁾.

Allmentos	Brotos	Casos
Agua	57	1343
Mixtos	30	2451
Lácteos	28	898
Carne de aves	27	937
Hongos	14	89
Carne roja	14	876
Frutas y Vegetales	11	268
Pescado	10	445
Postres	7	174
Huevo y Mayonesa	3	285
Panadería	2	11

COSTOS SOCIALES DE LAS ETAs

1. Costos para familias individuales
 - Gastos médicos
 - Pérdidas por ingresos
2. Costos para la Industria
 - Producción animal
 - Control de patógenos
 - Brotes y retiros del mercado
3. Costos para el Gobierno
 - Vigilancia epidemiológica
 - Investigación
 - Brotes ⁽³⁸⁾.

En general, las especies de *Salmonella* son aún el agente causal más importante reportado por la OMS. El Servicio de Investigación Económica (ERS) del Departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA) es el encargado de estimar los costos de enfermedades provenientes de alimentos en este país. El estimado que realizaron en el 2001 de costos médicos, productividad perdida y muertes prematuras por enfermedad causada por 5 patógenos indica que *Salmonella* fue el causal de 1, 341,873 casos, 15,608 hospitalizaciones, 553 muertes, causando un costo de 2.4 billones de dólares; mientras que *L. monocytogenes* causó 2,493 casos, 2,298 hospitalizaciones y 499 muertes los cual produjo un costo de 2.3 billones de dólares ⁽¹¹⁾.

FACTORES QUE PROPICIAN BROTES DE ETA

- Temperatura de almacenamiento inapropiada 39%
- Pobre higiene personal 24%
- Cocimiento inadecuado 19%
- Equipo contaminado 11%
- Alimento de fuente insegura 7% ^(38,45).

Un estudio llevado a cabo por la OMS (1995) en Europa indicó que casi 25% de los brotes provenientes de alimentos podrían ser debidos a recontaminación, los factores más importantes que contribuyen a la presencia de patógenos en alimentos preparados fueron higiene insuficiente (3.6%), procesado o almacenamiento en lugares inadecuados (4.2%), equipo contaminado (5.7%) y contaminación por personal (9.2%)⁽⁴⁴⁾.

La incidencia de enfermedades provenientes de alimentos sigue siendo un gran problema, incluso en países desarrollados, se ha estimado que 6 a 81 millones de casos de enfermedades y más de 9000 muertes anualmente fueron atribuidas a patógenos provenientes de alimentos en Estados Unidos solamente, siendo *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* dos de los principales responsables. El impacto de esta última en la salud pública ha sido reconocido solo hasta las últimas dos décadas^(3,5,23); de acuerdo con los Centros de Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), cada año un promedio de 2500 personas son afectadas clínicamente por esta bacteria en ese país, de los cuales 500 mueren⁽²³⁾; basado en estimaciones la incidencia de muerte anual causada por Listeriosis es alrededor de 8 veces más grande que la causada por *E. coli* 0157:H7⁽³⁷⁾. Por otra parte la Salmonelosis afecta a 1.4 millones de estadounidenses cada año, y el 95% de los casos provienen de alimentos, además se cree que este microorganismo es responsable de aproximadamente 31% de las muertes asociadas con enfermedades provenientes de alimentos⁽⁴³⁾; en una escala global, por lo menos 16-20 millones de casos de fiebre tifoidea ocurren anualmente, dando como resultado alrededor de 600,000 muertes⁽³³⁾.

3.2 MICROORGANISMOS PATÓGENOS

3.2.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es un bacilo móvil a 20-25°C, corto, Gram (+), mide 0.5-2 µm de longitud y 0.4-5 µm de diámetro, no esporulado y que antiguamente fue clasificado como "*Listerella*"; es un parásito intestinal y el agente etiológico de la Listeriosis, de las especies de *Listerias* es el patógeno de interés en los humanos ya que solo este microorganismo ha estado implicado en toxiinfecciones alimentarias. Está representada por 13 serovariedades pero 95% de los aislados humanos son principalmente 4b y ocasionalmente 1/2a y 1/2b, la mayor parte de las epidemias humanas y un gran porcentaje de casos esporádicos han sido

causados por serotipo 4b por una razón aún no comprendida, esta es responsable de 33-50% de Listeriosis humana en todo el mundo^(11,17,28,29,40,52).

Es un microorganismo anaerobio facultativo, su crecimiento resulta poco afectado por la atmósfera gaseosa, en condiciones aeróbicas, microaerofilicas y anaeróbicas, se han observado tiempos de generación parecidos, sin que existan indicios de que las elevadas concentraciones de CO₂ ejerzan un efecto inhibitor ^(11,17,28).

El intervalo de temperatura en el cual crece es de particular interés para los procesos de alimentos, ya que tiene características comunes de bacterias psicrotrofas y mesófilas, bajo condiciones de laboratorio, originalmente fue reportado que crece a temperaturas entre 3 y 45 °C con crecimiento óptimo entre 30 y 37°C, sin embargo, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology dio la temperatura mínima de crecimiento como 1°C; pero las distintas cepas varían mucho en el intervalo de temperaturas a las que se desarrollan, el límite inferior de crecimiento en los alimentos estériles que tienen un pH neutro y un elevado contenido de nutrientes, es una temperatura de aproximadamente 0°C, en la cual, el crecimiento es muy lento; es posible que en el almacenamiento en congelación (-18 °C y -198 °C) durante 1 mes mueran pocas *Listerias*; es casi única en su habilidad de sobrevivir y crecer a temperaturas tan bajas, desafortunadamente dicha característica posee problemas muy significativos para la industria de alimentos en general y los negocios de lácteos en particular ya que la refrigeración es el arma simple más importante en el grupo de tecnologías usadas para combatir la proliferación de microorganismos alterantes y microorganismos que causan enfermedades. Este microorganismo es claramente más tolerante al calor que otros patógenos provenientes de alimentos no formadores de esporas, entre las bacterias vegetativas Gram (+), es un microorganismo vigoroso en términos de su capacidad para resistir el calentamiento de poca intensidad y para crecer en las condiciones ambientales que normalmente se encuentran en una amplia gama de alimentos; a no ser que se hallen presentes cifras iniciales muy elevadas (10⁵-10⁸ ufc/ml) no debería resistir el tratamiento comercial de la pasteurización normal de la leche (72 °C durante 15 segundos), la termorresistencia no resulta afectada por su situación intracelular ^(11,28,29,47,50).

La humedad requerida para el crecimiento de los microorganismos puede ser mejor expresada en términos de actividad de agua, el cual es definido como la relación de la presión del vapor de agua de un substrato alimenticio con la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura. Como la mayoría de las especies bacterianas, *L. monocytogenes* crece óptimamente a una $a_w \sim 0.97$, sin embargo, comparada con muchos otros patógenos, tiene la habilidad de multiplicarse a valores de a_w tan bajos como 0.90; aunque no parece crecer a una $a_w < 0.90$, puede sobrevivir por períodos largos a valores más bajos. De acuerdo con el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, puede crecer en caldo nutritivo suplementado con 10% (w/v) de NaCl, crece y sobrevive en substratos con 10% y 20-30% de NaCl respectivamente, estudios a T° ambiente demostraron que puede persistir por lo menos 150 días en sal pura, la supervivencia en la presencia de sal, varía con la temperatura de almacenamiento y puede ser incrementada dramáticamente por la disminución de la temperatura de incubación^(11,47).

De acuerdo con el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, *L. monocytogenes* puede crecer solo en valores de pH de 5.6 a 9.6, con un crecimiento óptimo en pH neutral ó ligeramente alcalino⁽⁴⁷⁾; si bien crecen mejor en este rango, el pH mínimo que permite su crecimiento y supervivencia aún no es determinado y ha sido objeto de un gran número de estudios. En general el pH mínimo de crecimiento de una bacteria es función de la temperatura de incubación, de la composición general de nutrientes del substrato de crecimiento, de la actividad de agua, y de la presencia y cantidad de NaCl y de otras sales o de otros Inhibidores^(11,28). Brotes de Listeriosis vinculados a consumo de productos lácteos fermentados han reabierto la emisión de un pH mínimo requerido para su crecimiento el cual ha sido revisado posteriormente, diversas investigaciones han mostrado que puede proliferar en medios de laboratorio ajustados a valores de pH más bajos, así el pH mínimo en el cual esta y muchas otras *Listerias spp.* pueden crecer bien es muy inferior al pH 5, a condición de que esos organismos son incubados a temperaturas cercanas a la óptima y se les permitió tiempo suficiente; su crecimiento en alimentos ácidos ó acidificados confirma lo encontrado en medios de laboratorio. La supervivencia de este microorganismo en alimentos ácidos también varía con el pH y temperatura de almacenamiento, un desarrollo de la acidez apropiado es crítico para la seguridad y calidad de los alimentos fermentados⁽⁴⁷⁾.

L. monocytogenes presenta una resistencia a la radiación gamma del mismo orden que otras bacterias Gram (+), variando los valores D desde 0.34 - 0.5 kGy en el caldo y hasta 2 kGy en el helado a -78 °C; y es menos resistente a las radiaciones ultravioleta comparada con otros microorganismos Gram (+), las células desecadas son 2.5 - 4 veces más resistentes que las células húmedas⁽²⁸⁾.

Las Listerias son capaces de multiplicarse en medios simples y no tienen especiales exigencias nutritivas⁽²⁸⁾. Crecen bien en muchos medios ordinarios tales como el caldo con infusión de cerebro y corazón, el caldo con soja y tripticasa, y el caldo con triptosa, a diferencia de la mayoría de las bacterias Gram (+), crecen en agar de Mc Conkey⁽²⁹⁾.

Es un organismo muy resistente, siendo capaz de sobrevivir más de 21 años en medios de laboratorio refrigerados tan bien como 10 días en agua de grifo incubada a 22 °C y 6, 3 y 1 día en agua destilada almacenada a 22, 30 y 40 °C, respectivamente; además es también relativamente resistente al secado. Estas observaciones han conducido a preguntas concernientes a su habilidad para sobrevivir en varios tipos de materiales comunes a las instalaciones de procesamiento de alimentos, según diversos estudios, sobrevive 24 horas en cristal, hierro, aluminio y acero inoxidable, 48 horas en papel y plástico, 7 días en porcelana, 6 en madera y 20 a 30 días en azulejo⁽⁴⁷⁾. Está muy extendida por el medio ambiente, por tanto puede aislarse de: tierra, residuos de desechos, aguas residuales, materia vegetal, particularmente aquella que sufre descomposición, piensos, el ensilado descompuesto sostiene el desarrollo de altos números, ha sido citado como fuente de infección en numerosos casos de listeriosis en animales de granja y podría ser el origen de contaminación capaz de diseminarse a lo largo de la cadena alimentaria; de los animales domesticados, favorece el ganado vacuno, ovejas y cabras^(17,28,47,50), los animales pueden tenerla en sus intestinos sin estar enfermos, debido a esto, se puede propagar hacia la carne y los productos lácteos⁽²⁰⁾.

En general, es de esperar encontrarlas donde existen bacterias acidolácticas, *Brochothrix*, y algunas *Corineformes*; se sabe que se encuentra en algunos productos lácteos, de igual modo que en estos también se encuentran otras bacterias que producen ácido láctico⁽²⁹⁾; aproximadamente 2-6% de la población es considerada como portadora

asintomática fecal del organismo, y animales libres y domésticos también pueden ser portadores⁽¹¹⁾. Diversos estudios han reportado que 2-16% de vacas sanas portan este organismo en el tracto gastro-intestinal y excretan el organismo dentro del ambiente de la granja, este patógeno, raramente causa enfermedad en los animales, sin embargo, una vez infectado, el índice de fatalidad es alto, además, después de una listeriosis evidente, una vaca podría continuar despidiendo el patógeno por varios meses o años⁽²³⁾. Aunque existen otros modos de transmisión, los alimentos han sido claramente identificados como una fuente primaria de infección, la alta prevalencia en alimentos en general, junto con el alto índice de mortalidad, sugiere que ésta represente un peligro importante para la salud humana⁽⁴⁰⁾.

La listeriosis tiene síntomas parecidos a la gripe, pero no siempre, en la población sana, el consumo de alimentos contaminados usualmente causa enfermedad gastrointestinal con náuseas, vómito y diarrea, si la infección se propaga hacia el sistema nervioso, pueden ocurrir síntomas como dolores de cabeza, tortícolis, confusión, pérdida de equilibrio, convulsiones; la infección causada más frecuentemente reconocida es la meningitis, algo que también se ha señalado ocasionalmente en adultos aparentemente normales posiblemente por la ingestión de gran cantidad de microorganismos. Las mujeres embarazadas infectadas pueden experimentar sólo una leve enfermedad parecida a la gripe, dicha enfermedad puede ser transmitida de la madre al feto a través de la placenta, esto puede provocar un aborto, que el feto nazca muerto, o graves problemas de salud para el recién nacido. La bacteremia por este patógeno también puede conducir a peritonitis, hepatitis, puede causar lesiones focales que incluyen endooftalmítis, artritis séptica, osteomielítis, pericardítis, endocardítis, conjuntivítis, infecciones en la piel, abscesos y linfadenítis^(2,15,17, 20,28).

A la mayoría de las personas no les da listeriosis, ciertos grupos de población son más sensibles, entre ellos los recién nacidos, niños, mujeres gestantes, ancianos, las personas con el sistema Inmunológico débil (inmunodeprimidos) causados por tratamientos contra el cáncer, SIDA, diabetes, enfermedades del riñón, trasplante de órganos, etc., tienen riesgo de enfermarse gravemente al comer alimentos que contengan esta bacteria^(17, 23,29).

Se ha indicado que el aumento brusco de los casos de Listeriosis transmitida por alimentos puede ser debido a la existencia de infecciones simultáneas producidas por algún otro microorganismo patógeno, como por ejemplo *Salmonella enteritidis*, la incidencia de los aislamientos humanos de este último microorganismo es paralela a los hallazgos de *L. monocytogenes* en las personas; se ha señalado asimismo que la infección a partir del tracto gastrointestinal es favorecida por las toxinas de *E. coli* y posiblemente por el uso de antiácidos que neutralizan la acidez del estómago que, si no fuese neutralizada, inhibiría o destruiría las Listerias⁽²⁹⁾.

La infección generalmente se produce a través del intestino, existen pruebas de que todas las cepas virulentas de esta especie producen una sustancia específica que es responsable de la hemólisis- β en los eritrocitos y de la destrucción de las células fagocitarias que las engloban, la sustancia en cuestión ha sido denominada Listeriolisina O (LLO), la cual tiene un peso molecular de 60,000, está formada por 504 aminoácidos, se produce principalmente durante la fase exponencial, lográndose en cantidades máximas después de 8 a 10 horas de crecimiento y es el factor de virulencia más importante; el gen que codifica la producción de LLO es cromosómico y ha sido denominado *hlyA*, se ha comprobado que purificada, es activada por compuestos que contienen radicales SH, tal como la cisteína, inhibida por cantidades insignificantes de colesterol y es activada a pH de 5.5 pero no a pH 7.0^(28,29).

El periodo de incubación para Listeriosis depende de la susceptibilidad del individuo y de la dosis ingerida, pero se ha documentado que oscila de 24 horas a 13 semanas; los periodos de incubación extremadamente largos contribuyen a la dificultad para determinar la fuente de infección^(11,17,20,28,29). La mortalidad es muy alta en los niños (50%) y al menos del 25% en otros grupos⁽¹⁷⁾.

Existe falta de información con respecto a la dosis infecciosa mínima, se considera altamente dependiente del huésped y la cepa, generalmente se cree que es relativamente elevada (>100 células viables)⁽²⁸⁾, parece ser que menos de 100 ufc/g no es de importancia para adultos sanos, sin embargo es sabido que este nivel causará enfermedad en personas susceptibles. Las poblaciones en alimentos responsables de brotes o casos aislados son a

menudo más de 100 ufc/g^(11,17). No hay datos disponibles de dosis experimentales en humanos, por lo cual, la dosis mínima infectiva para este es desconocida, sin embargo existen análisis acompañando investigaciones epidemiológicas los cuales han indicado que alimentos implicados en casos esporádicos y brotes de listeriosis, han sido del tipo que apoya su crecimiento y por lo tanto han tenido niveles elevados del patógeno⁽⁴⁰⁾.

Los alimentos que no apoyan su crecimiento es poco probable que sean una fuente de listeriosis, mientras que aquellos que mantienen el crecimiento a altos niveles, deberían ser el objetivo de los esfuerzos en el manejo de riesgo; es necesario tener niveles más bajos en el punto de entrada para no exceder los niveles de este microorganismo en el punto de consumo, para establecer tales niveles, son necesarios conocimientos de vida de anaquel y comportamiento del patógeno en el alimento durante su almacenamiento y distribución⁽⁴⁰⁾.

En diversos países, se han establecido los criterios o recomendaciones para la tolerancia en alimentos listos para consumo, por ejemplo, USA e Italia requieren ausencia en 25 g de alimento (cero tolerancia) mientras que otros países europeos (Alemania, Países bajos, Holanda, Francia) tienen una tolerancia abajo de 100 ufc/g en el punto de consumo, finalmente algunos países como Canadá y Dinamarca tienen una tolerancia por debajo de 100 ufc/g para algunos alimentos y una tolerancia cero para otros, especialmente aquellos en los cuales se apoya el crecimiento y con extendida vida de anaquel. Varios países han concluido que la ausencia completa en ciertos alimentos listos para consumir es un requerimiento irrealista e inalcanzable, que limita el comercio sin tener un impacto positivo en la salud pública y consecuentemente podría quitar recursos de otras medidas potencialmente más efectivas contra este organismo; por consiguiente, hay la necesidad de un criterio microbiológico internacional para esta bacteria en alimentos. Con esto en mente, en Alemania se organizó un Codex drafting group el 15 y 16 de Febrero en 1999 donde fue proyectado un documento en criterio microbiológico para este patógeno⁽⁴⁰⁾.

Existen por lo menos cuatro principales campos de interés en *Listeria monocytogenes*:

- El rol en microbiología médica (causa severas enfermedades al hombre y a los animales y es difícil de tratar)

- El rol en microbiología de alimentos (es un patógeno proveniente de alimentos y es encontrado en varios productos alimenticios)
- El rol en biología celular (es un parásito intracelular facultativo que tiene una intensa intercomunicación e interacciones con las células huésped)
- El rol en inmunología (conocimientos básicos en inmunidad celular han sido adquiridos a través de modelos de Listeriosis)⁽²⁵⁾.

3.2.2 *Salmonella*

Salmonella es un género de la familia Enterobacteriaceae de la cual los representantes se caracterizan como bacterias Gram (-); es de forma bacilar (1-2 μm), no esporulada y las formas móviles poseen flagelos peritricos^(28,29). Este género contiene unas 2000 cepas distintas (denominadas serovares o serotipos) de acuerdo con sus antígenos O y H⁽¹⁷⁾; con fines epidemiológicos, se pueden clasificar en tres grupos uno de los cuales son las que infectan solamente a las personas, estas incluyen a *S. typhi*, *S. paratyphi* A y C, agentes de la fiebre tifoidea y paratifoidea respectivamente, siendo éstas las más graves de todas las enfermedades producidas por estas bacterias⁽²⁹⁾.

Cepas típicas provenientes de alimentos son *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. newport*, *S. montevideo*, *S. dublin*, *S. meuchem*, *S. manhattan*, *S. havana*, *S. oranienburg* y *S. saint paul*⁽⁵⁰⁾; *S. typhimurium* es invariablemente la serovariedad de origen alimentario que se encuentra con mayor frecuencia en todo el mundo⁽²⁹⁾, por otra parte *S. typhi* es un patógeno restringido a humanos, transmitido por la vía fecal-oral y no se conoce animal alguno que sea reservorio para este patógeno^(11,33).

Tiene la habilidad de crecer aeróbica y anaeróbicamente, su temperatura óptima de crecimiento, como la de la mayoría de las bacterias causantes de toxiinfecciones alimentarias está próxima a los 38°C, aunque algunas cepas pueden crecer entre 5.5 y 45°C, su ritmo de crecimiento se reduce sustancialmente a temperaturas <15 °C, y es inhibido a temperaturas <7 °C; aunque la congelación puede resultar perjudicial, no garantiza su destrucción en los alimentos, ya que han sido detectadas en productos que permanecieron almacenados en congelación durante años. Varios autores han indicado que la temperatura

máxima de crecimiento es 49.5 °C, *S. typhi* es capaz de crecer a 45 °C; con respecto a su eliminación por el calor, todas son destruidas fácilmente a las temperaturas de pasteurización de la leche ^(11,17,28,29).

La actividad de agua afecta en gran manera su crecimiento, el límite inferior para este patógeno es 0.94, se ha señalado inhibición del crecimiento a valores inferiores en medios con pH neutro, necesiéndose a_w superiores conforme el pH disminuye, no obstante se han encontrado cepas capaces de sobrevivir durante un año o más en los alimentos que tienen una a_w baja; estos microorganismos son incapaces de tolerar concentraciones elevadas de sal, se dice que una concentración de sal superior al 9% en la salmuera es bactericida. Para que su crecimiento sea óptimo, se requiere un pH en torno a la neutralidad, estas necesitan un pH entre 6.6 y 8.2, siendo bactericidas los valores por encima de 9.0 y por debajo de 4.0; a medida que el pH sobrepasa el óptimo o desciende por debajo de él, disminuye su ritmo de crecimiento, la naturaleza del ácido orgánico también influye en el pH mínimo al que se inicia el crecimiento. De igual modo a lo que sucede en casi todas las demás bacterias, en las Salmonelas, los parámetros de pH, a_w , contenido de nutrientes, y temperatura, todos ellos están relacionados entre sí. Estos microorganismos son bastante sensibles a la radiación ionizante, siendo suficientes dosis de 5 a 7.5 KGy para eliminarlas de la mayoría de los alimentos y piensos y son destruidas más rápidamente mediante irradiación a temperaturas elevadas (<55 °C), a temperaturas reducidas, las bacterias son menos sensibles a la radiación ionizante; su inhibición se mejora mediante el uso de varios factores asociados, por ejemplo, un conservante en asociación con pH y temperatura reducidas ^(11,28,29).

Estos microorganismos se diferencian de las demás bacterias Gram (-) por ser capaces de crecer en un gran número de medios de cultivo y producir colonias perfectamente visibles en 24 horas a temperaturas próximas a 37°C ⁽²⁹⁾, es metabólicamente creativa, teniendo la habilidad de utilizar una variedad de sustratos, crece fácilmente en muchos alimentos, así como en agua contaminada con alimentos o heces ⁽¹¹⁾.

A pesar de que no forman esporas, son capaces de sobrevivir durante mucho tiempo en los alimentos y en otros sustratos, también en superficies tales como la cerámica, vidrio,

acero inoxidable y en la piel humana; estas bacterias están muy difundidas en la naturaleza, siendo las personas y los animales sus principales reservorios, puede ser encontrada viviendo libre en la naturaleza y como parte de la flora nativa de estos^(28,29), y es también conocido que sobrevive bien en estado desecado; si bien su hábitat principal es el tracto intestinal, de vez en cuando se pueden encontrar en otras partes del organismo, el intestino delgado, es especialmente un sitio primario de acción para los agentes infecciosos provenientes de alimentos porque son ingeridos con estos, todas las enfermedades provenientes de estos microorganismos inician aquí, y así, las infecciones son causadas por la presencia de organismos viables usualmente multiplicándose⁽¹¹⁾.

Los plenos, el agua, los alimentos de origen animal y los que están expuestos al contacto con aguas residuales, son los principales vehículos para la transmisión de estos patógenos a los seres humanos y para diseminarlos a los ambientes de elaboración y de las cocinas⁽²⁸⁾. Como formas intestinales, los microorganismos son excretados en las heces desde las que pueden ser transmitidos por insectos y por otros seres vivos a un gran número de lugares, cuando el agua y los alimentos que han sido contaminados por insectos o por otros medios de contaminación son consumidos por personas o animales, estos microorganismos son diseminados de nuevo por medio de la materia fecal, cerrándose de este modo su ciclo en la naturaleza, y así la reinfeción es virtualmente garantizada^(29,30). Las Salmonelas existentes en los efluentes de aguas residuales y en las heces secas de los animales, llegan a los arroyos, a los ríos y a las aguas costeras, el lodo de las aguas residuales puede contener grandes cantidades de estas bacterias, por lo que si se utiliza con finalidades agrícolas estas serán diseminadas⁽²⁸⁾.

Las pieles de los animales se pueden contaminar con esta bacteria, a partir del origen fecal, en la población animal, las especies de este género se mantienen por medio de infecciones asintomáticas de estos y en los plenos, ambos orígenes de microorganismos sirven para mantener re infectados a los animales de abasto de un modo cíclico. El hecho de encontrarse en carnes, huevos, e incluso el aire, hace inevitable su presencia en determinados alimentos gracias a la contaminación cruzada. A nivel de los consumidores, se cree que el portador de esta bacteria desempeña un papel en la transmisión de las enfermedades provocadas por estas, la preparación y manipulación inadecuadas de los

alimentos en los hogares y en los establecimientos del servicio de alimentación siguen siendo las principales causas de los brotes, la ampliación del comercio internacional de productos animales y piensos, es en gran parte responsable de la distribución universal de la Salmonelosis y sus problemas subsiguientes⁽²⁹⁾.

Salmonelosis es el nombre genérico empleado para designar a las infecciones humanas y animales originadas por miembros del género *Salmonella* ⁽¹⁷⁾, es una de las causas más frecuentes de enfermedades por alimentos y probablemente la mejor conocida; dependiendo de la especie involucrada, los síntomas y la severidad de la enfermedad varía ampliamente, el tipo más peligroso es *Salmonella typhi*, la cual está adaptada al hombre como hospedador⁽⁵⁰⁾. Existen tres tipos importantes de Salmonelosis: entérica (fiebre tifoidea), gastroenteritis y un tercer tipo localizado en uno o más órganos acompañado de septicemia. El síndrome paratifoideo es más benigno que el tifoideo⁽²⁹⁾, las infecciones invasivas son causadas por microorganismos que penetran tejidos y además se multiplican intracelularmente, entre las bacterias invasivas asociadas con infecciones provenientes de alimentos se encuentran *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*⁽¹¹⁾. En países económicamente desarrollados, la incidencia de la fiebre tifoidea es generalmente baja, sin embargo, esta aún ocurre ocasionalmente, una historia muy diferente sucede en países en desarrollo donde los sistemas de sanitización no son suficientes para prevenir reinfecciones de desechos humanos ⁽⁵⁰⁾.

La fiebre tifoidea es un ejemplo de una situación donde un patógeno proveniente de alimentos puede penetrar el intestino, entrar a la corriente sanguínea y comenzar a multiplicarse ⁽⁵⁰⁾; aunque este patógeno tal vez colonice el intestino sin causar enfermedad, es necesaria la asociación cercana y penetración de la mucosa intestinal para inducir la diarrea y enfermedad sistémica ⁽¹¹⁾. Las cepas invasoras por ejemplo *S. typhi*, atraviesan la mucosa intestinal, pasan al sistema linfático y son englobadas por los fagocitos en cuyo interior se multiplican, después, estas bacterias vuelven a entrar en la corriente sanguínea, causando septicemia ⁽²⁸⁾; el microorganismo puede invadir la corriente sanguínea y en los casos extremos, el paciente puede entrar en coma ⁽¹⁷⁾. Parece ser que en la patogenia de la Salmonelosis pueden intervenir dos toxinas, una enterotoxina y una citotoxina⁽²⁹⁾, estos patógenos provocan la enfermedad cuando mueren, después de multiplicarse en el intestino

de su hospedador y de sufrir la lisis subsiguiente que libera una potente endotoxina; se trata de un liposacárido que forma parte de la membrana de la célula bacteriana y que es el principal responsable de los síntomas clínicos las enterotoxinas producidas en el interior del intestino humano muy bien podrían tener un importante rol en la enfermedad⁽¹⁷⁾. La bacteria tifoide puede entrar y esconderse en las mismas células del cuerpo (células blancas de la sangre) que están supuestamente para defendernos de ellas, una vez que *S. typhi* entra a las células, es muy resistente a los antibióticos y se requiere terapia repetida⁽⁵⁰⁾; han sido identificados muchos mecanismos posibles de virulencia *in vitro*, así como en animales, pero hay mucho aún por entender acerca del rol *in vivo* de varios genes de *Salmonella* que tal vez estén involucrados en la invasión⁽¹¹⁾.

En las personas el período de incubación varía considerablemente, por lo general, está comprendido entre 12 y 36 horas⁽¹⁷⁾, a partir del momento de la ingestión del alimento, los síntomas suelen tardar en aparecer de 12 a 14 horas, aunque se han señalado períodos más cortos o más prolongados que el indicado; la fiebre tifoidea es la que tiene el período de incubación más largo, produce la temperatura corporal más elevada, y el índice de mortalidad más alto⁽²⁹⁾.

La infección con esta bacteria es principalmente a través de la ingestión, según datos bibliográficos, para que se produzca la Salmonelosis generalmente se necesita un número de células del orden de 10^7 - 10^9 ufc/g, aunque se ha indicado que se pueden presentar casos en los que se encuentran números de células relativamente bajos^(17,29); los datos obtenidos de varios brotes indican que el número necesario para ocasionar la enfermedad puede ser bastante bajo, tan pequeño como 100 células en condiciones propicias, en algunos casos especialmente cuando el vehículo ha sido el agua o alimentos grasos tamponados, en los alimentos implicados epidemiológicamente se han encontrado pequeñas cantidades (<100 ufc/g)⁽²⁸⁾.

Las pruebas de la vacuna tífica en personas voluntarias indican una dosis infecciosa (DI_{50}) de 10^7 ufc/kg. de peso en los varones sanos y que está relacionada con la supervivencia de la bacteria durante el tránsito a través del estómago: el agua ingerida en horas fuera de las comidas tiene un tiempo de retención mínimo, mientras que los alimentos

grasos protegen a los microorganismos de la acción de los ácidos del estómago⁽²⁸⁾; casi siempre los alimentos implicados en brotes provocados por este patógeno son de origen animal⁽⁴⁵⁾. Las dosis infecciosas en animales tienden a ser más altas que para humanos, varios experimentos han reportado dosis de 10^6 a 10^9 bacterias son requeridas antes que la enfermedad clínica sea observada y usualmente son requeridas grandes dosis para causar infecciones experimentales⁽¹¹⁾.

La enfermedad dura corrientemente hasta siete días pero algunos de los síntomas pueden persistir semanas o incluso meses, hay algunos portadores que eliminan *Salmonelas* intermitentemente aunque no presenten síntoma alguno de enfermedad, debido a que este tipo de portadores es difícilmente detectado antes de que aparezca un brote, en los establecimientos alimentarios puede presentarse un número insidioso y creciente de portadores⁽¹⁷⁾.

A pesar de que generalmente los microorganismos desaparecen con rapidez del tracto intestinal, hasta un 5% de los enfermos pueden ser portadores de los microorganismos después de curar esta enfermedad⁽²⁹⁾, en el caso de *S. typhi* aproximadamente el 10% de los individuos infectados permanecen en estado de portador asintomático⁽³³⁾, este se puede prolongar durante varios meses y durar años, típicamente, las personas portadoras crónicas albergan el organismo en la vesícula biliar⁽²⁸⁾.

3.3 CONTAMINACIÓN

Los microorganismos involucrados en infecciones provenientes de alimentos incluyen *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*, han sido recuperadas de casi todo tipo de alimentos incluyendo lácteos, carne, vegetales y frutas, por lo cual se considera que los alimentos son el vector principal de la infección que estas producen^(11,28). Se estima que 80-90% de los casos de *Listeriosis* son asociados a la ingestión de alimentos contaminados, los alimentos más comúnmente asociados son aquellos donde un proceso listericida no ha sido aplicado; productos procesados, los cuales son susceptibles a contaminación post-proceso ó pre-empacado; formulación de los productos lo cual permite crecimiento; aquellos que son almacenados en refrigeración y tiene una vida de anaquel de más de 10 días y productos listos para comer⁽¹¹⁾. La leche cruda y quesos suaves tradicionalmente hechos de esta son

la principal preocupación ya que esta bacteria continúa su crecimiento a temperaturas de refrigeración ⁽⁵⁰⁾, diversos brotes durante los 80's que fueron positivamente ligados al consumo de queso y vegetales crudos ha dado la inclusión de este microorganismo en la actual lista de patógenos serios provenientes de alimentos ⁽⁴⁷⁾. Johnson et al., (1990a, b,c) asignaron los microorganismos patógenos a tres grupos de riesgo basándose en datos epidemiológicos, incidencia en leche y características de los microorganismos individuales; *Salmonella spp.*, y *L. monocytogenes* se consideraron microorganismos de alto riesgo⁽²⁷⁾.

3.3.1 INSTALACIONES

Todo patógeno que pueda estar presente en las vacas, manipuladores, utensilios y en el ambiente puede ser un contaminante accidental de la leche, en la microbiota inicial se han aislado varios, dos de los caracterizados son *Salmonella* y *L. monocytogenes* entre otros⁽²⁷⁾. Las vacas en período de lactación pueden despedir este último en la leche como consecuencia de mastitis por un amplio periodo de tiempo, así, puede estar presente en el producto alimenticio original⁽²⁵⁾, y/o puede colonizar los establecimientos de procesado de alimentos y contaminar el producto como sucede a través de las instalaciones ya que al igual que *Salmonella*, pueden crecer en las superficies que contactan con los alimentos; con respecto a esta bacteria Gram (-), se dice que coloniza el ambiente de la granja, y puede también ser diseminada a través del medio ambiente por diferentes maneras⁽¹¹⁾. Estos y otros patógenos humanos han sido encontrados en las industrias procesadoras trabajando con leche y otros tipos de alimentos⁽⁵⁸⁾.

La presencia de los patógenos provenientes de leche es asociada directamente con el manejo de las vacas lecheras y las prácticas de ordeño realizadas en la granja; buenas y estrictas prácticas de higiene contribuyen a la reducción de los patógenos provenientes de leche. Esta claro, por muchos estudios que el procedimiento de sanitización antes del ordeño efectivamente reduce la contaminación microbiana inmediatamente antes de la adhesión a unidades de ordeño y disminuye la incidencia de infecciones en la ubre causadas por diversos patógenos principalmente ambientales ⁽²³⁾.

Los residuos lácteos que quedan en las superficies del equipo de lechería después de una limpieza deficiente proporcionan abundantes nutrientes para el crecimiento de muchos tipos de microorganismos, la temperatura ambiente a la que dicho material se almacena es favorable para el crecimiento de los mismos, además, las superficies permanecen a menudo húmedas durante largos periodos permitiendo el crecimiento de microorganismos hasta valores elevados y la formación de biofilms; cuando el equipo se vuelve a utilizar, los microorganismos contaminan a la leche, el tipo y número de microorganismos introducidos de esta forma depende del grado de limpieza y sanitización. En el equipo que se limpia deficientemente se forman costras de leche, un material muy mineralizado, en las superficies, las aguas muy duras o el uso de agentes de limpieza muy alcalinos favorece la formación de costras lácteas que protegen a los microorganismos de la acción de los detergentes y sanitizante, por lo cual deben utilizarse periódicamente agentes de limpieza ácidos para reducir o eliminar las costras lácteas ⁽²⁷⁾.

En ambientes secos de plantas procesadoras de productos como leche o chocolate en polvo, los niveles de organismos permanecerán bajos, sin embargo, en ciertos casos, como en los ambientes húmedos o que siguen procedimientos de limpieza húmedos, los patógenos pueden incluso multiplicarse a niveles altos; un número de recientes publicaciones referidas a la ocurrencia de microorganismos patógenos, alterantes o indicadores en ambientes de procesado de alimentos claramente demuestra la importancia de esta fuente ⁽⁴⁴⁾.

El medio ambiente donde se procesan alimentos es una fuente de recontaminación importante pero pobremente reconocida y entendida, los patógenos pueden acceder a dichos ambientes a través de materiales crudos, personal o equipo móvil, a través de goteras y aberturas en edificios o a través de insectos; algunos de estos microorganismos se pueden establecer en el ambiente de procesado y fundar nichos donde ellos pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo, rajaduras y grietas en pisos y paredes, estructuras huecas en edificios y en equipos, interfaces entre estos y el piso, pueden formar tales nichos ⁽⁴⁴⁾. La transmisión de patógenos puede también ser provocada por aerosoles producidos durante la limpieza de las superficies de procesado de alimentos ⁽³²⁾.

En la industria láctea, el equipamiento inapropiado para su limpieza y sanitización, y microflora proveniente del aire son considerados usualmente fuentes importantes de contaminación en leche y productos lácteos⁽²²⁾; el tipo de bacterias que llega a estos productos procedente del aire es más importante que el número; los ventiladores, las corrientes, el polvo y las labores de los operarios contribuyen a la contaminación por este medio⁽²⁷⁾; el impacto de la recontaminación de productos proveniente de esta fuente es frecuentemente enfatizada a algunas categorías de alimentos tales como bebidas, productos culinarios y lácteos refrigerados⁽⁴⁴⁾.

L. monocytogenes está en todas partes, por lo que puede ser introducido en las plantas procesadoras de alimentos a través de muchos canales diferentes, ha sido mostrado que coloniza ambientes progresivamente y contamina productos durante el procesado, ciertas cepas pueden volverse persistentes en plantas, mientras otras son contaminantes esporádicos, no ha sido aclarado el posible rol de resistencia a la sanitización en la habilidad de colonizar ambientes de procesado por cepas de este patógeno⁽²⁾. Puede sobrevivir y crecer en líneas de producción de alimentos y en los ambientes de producción, especialmente en el equipo y áreas difíciles de limpiar⁽⁴⁰⁾, es capaz de sobrevivir por más tiempo bajo condiciones ambientales adversas que otras bacterias no formadoras de esporas de importancia en enfermedades causadas por alimentos; además es particularmente difícil de controlar en instalaciones de procesado, las plantas de productos refrigerados, en particular, proveen condiciones las cuales permiten su crecimiento y supervivencia⁽⁴⁷⁾.

Los resultados de diversas investigaciones indican que cuando *L. monocytogenes* y otras *Listeria spp.* están presentes en alimentos procesados comercialmente, esto sucede principalmente porque el producto fue contaminado después de procesado más que porque ese organismo sobrevivió al tratamiento térmico que normalmente proporciona un producto seguro; esta idea es soportada por la carencia de evidencia científica que indique que el tratamiento térmico mínimo requerido, dado a productos lácteos y otros productos es inadecuado para inactivar niveles de dicha bacteria, que tal vez estén en los productos antes del procesado térmico⁽⁴⁷⁾.

Las Salmonelas también se pueden establecer y multiplicar en el ambiente y en el material de las diversas instalaciones de elaboración de alimentos. Una vez introducidas en el medio ambiente, pueden permanecer viables durante meses ⁽²⁶⁾.

Los procedimientos Cleaning-in-place (CIP) son empleados usualmente en líneas de procesado de leche, sin embargo la acumulación de microorganismos en las superficies de los equipos dando como resultado la formación de biofilms, es una limitante de estos procedimientos⁽²²⁾; las células suspendidas libremente se fijan a las superficies cuando los nutrientes comienzan a ser limitados, los microorganismos intentan localizar materia orgánica adherida a los equipos de procesado a los cuales ellas pueden adherirse y vivir ahí⁽⁵⁸⁾. En la industria de alimentos y la industria láctea, los biofilms causan serios problemas tales como impedir el flujo de calor, incrementar la resistencia por fricción y la corrosión, conduciendo a pérdidas de producto y energía, además provocan serios problemas higiénicos y pérdidas económicas debido a la alteración de los alimentos; se han publicado un número de reportes en la persistencia de patógenos provenientes de alimentos en superficies que contactan con los alimentos y muchos nuevos organismos como *Listeria monocytogenes* han sido sumados a la lista⁽²²⁾, la formación de biofilms de este microorganismo en los ambientes de procesado puede ser una fuente importante de contaminación secundaria⁽³⁷⁾, para evitarlo, deben ser controlados todos los caminos potenciales de entrada y contaminación cruzada⁽⁴⁷⁾. Las otras fuentes comunes involucradas en la acumulación de biofilms son los pisos, conductos de agua residual, sellos de goma, cintas transportadoras y superficies de acero inoxidable ⁽²²⁾, en los cuales dicha bacteria ha sido detectada, además podría sobrevivir en aerosol y convertirse en una amenaza como recontaminación ⁽⁵⁸⁾.

3.3.2 PRODUCTOS LÁCTEOS

LECHE

Como es sabido la carga microbiológica en la leche recién ordeñada es afectada por situaciones anormales debidas a infecciones, enfermedades o hábitos de ordeño deficientes los cuales pueden afectar su microbiota; la mastitis, una enfermedad inflamatoria del tejido mamario, puede ocasionar la llegada de un elevado número de células somáticas y microorganismos a la leche, entre ellos *Listeria monocytogenes*. La composición de la leche

hace que sea un excelente medio de cultivo para muchos microorganismos al menos que se congele o se procese para destruir o prevenir su crecimiento⁽²⁷⁾. Existen vacas lecheras que aparentan salud, sin embargo pueden servir como reservorio para este patógeno y secretarlo en la leche^(28,47), los animales pueden tener este organismo en sus intestinos sin estar enfermos, debido a esto, se pueden propagar hacia la carne y productos lácteos⁽¹⁹⁾. Una vez obtenida de la vaca, la leche tal vez sea contaminada posteriormente a través de contacto inadvertido con heces y ensilado, ambos a menudo la contienen, además de que se encuentra normalmente presente en el ambiente de la granja lechera⁽⁴⁷⁾.

Si bien este microorganismo puede sobrevivir al proceso de termización (calentamiento a 62-65°C durante 15-20 seg. seguido de un rápido enfriamiento a <6°C) y multiplicarse durante el almacenamiento posterior en frío, generalmente se acepta que las actuales condiciones mínimas de pasteurización (71.7°C, 15 seg. o 62.8°C, 30 minutos) son suficientes para inactivarlo⁽²⁷⁾, y si se presenta en leche pasteurizada, se considera que es debido a una contaminación post-proceso o falla en la temperatura de pasteurización; su crecimiento puede ocurrir sin ningún signo aparente de alteración en el alimento y crece bien en productos lácteos líquidos de 4 a 35 °C⁽¹¹⁾. Charlton et al.,(1990) hallaron especies de *Listeria* en 75 de 597 muestras (12.6%) tomadas en plantas lácteas, la mitad de los aislamientos se identificaron como *L. monocytogenes*. La leche cruda es una fuente importante de este patógeno, la excreción en esta es un factor importante en la transmisión y epidemiología de las listeriosis; la ubicuidad de las diversas especies de esta bacteria en el ambiente rural, hace que su control y erradicación del nicho agrícola y por tanto de la leche cruda, sea un trabajo bastante improbable⁽¹⁷⁾. Se ha averiguado que el número máximo de células que elimina una vaca infectada, tanto de modo natural como de modo artificial, es de aproximadamente 10⁴ ufc/ml, en general, los protocolos convencionales para pasteurizar la leche son adecuados para destruirlo en cantidades de 10⁵-10⁶ ufc/ml, tanto si se encuentran libremente suspendidas como si son intracelulares⁽²⁹⁾.

Aunque puede haber mastitis debidas a *Salmonella*, la principal causa de su presencia en la leche es la contaminación con materia fecal procedente de un animal infectado o de animales portadores asintomáticos que la diseminan⁽²⁷⁾, la leche fresca está implicada corrientemente como vehículo de transmisión en los brotes de Salmonelosis; esta

llega a la leche por medio de la contaminación de la ubre y de los pezones, menos corrientemente durante infecciones septicémicas de las vacas y posiblemente desde los operarios que manipulan la leche⁽²⁸⁾.

La pasteurización de la leche y el tratamiento térmico de sus derivados, ha dado lugar a una reducción sustancial de los casos, sin embargo estos alimentos están todavía implicados, singularmente en ciertas regiones en las que se consume o procesa sin pasteurizar⁽¹⁷⁾. En los brotes de las enfermedades humanas en los que estos patógenos están implicados, la leche cruda es un importante vehículo de transmisión de la enfermedad, la serovariedad concreta relacionada con el consumo de leche cruda es *S. dublin*, no obstante los productos lácteos pasteurizados presentan pocos riesgos para la salud debido a que estos microorganismos no soportan la pasteurización, a pesar de esto, diversos brotes se han asociado al consumo de leche pasteurizada, lo que puede deberse habitualmente a una contaminación post-pasteurización, a un tratamiento térmico inadecuado o a un abuso de temperatura durante el almacenamiento^(29,27). En 1985, una epidemia de *Salmonella typhimurium* fue rastreada a leche pasteurizada de una lechería contaminada en USA, la cepa fue resistente a 5 diferentes antibióticos, y dio como resultado alrededor de 180,000 personas infectadas⁽⁸⁾.

Un tratamiento térmico correcto asegura la ausencia de patógenos en las leches estables, aunque, la posibilidad de que la leche UHT (Ultra High Temperature) sufra una contaminación post-proceso con patógenos no puede ignorarse totalmente, pero si el tratamiento ha sido diseñado y controlado correctamente, la contaminación es extremadamente rara; los productos UHT no se han asociado a ningún brote importante ni tampoco a casos más restringidos. Por otra parte, en un estudio del crecimiento y la supervivencia de patógenos en leche ultrafiltrada, se concluyó que diversos microorganismos se comportan de un modo similar a como lo hacen en leche normal, excepto *L. monocytogenes* que creció más velozmente, además, se ha descrito que diversas bacterias vegetativas han soportado el proceso de deshidratación, incluyendo este patógeno y también a miembros de la familia Enterobacteriaceae; con respecto a estos últimos, se sabe que las Salmonelas sobreviven al secado por atomización^(17,27).

QUESO

La producción de queso convierte a un producto altamente perecedero, la leche, en otro más estable y son diversos factores los que contribuyen a su estabilidad. Anteriormente se pensaba que los patógenos vegetativos inicialmente presentes en la leche cruda perderían viabilidad durante el almacenamiento y maduración del queso, pero las investigaciones realizadas al respecto por Ryser y Marth (1991) y posteriormente Spahr y Uri (1993), indican que algunos patógenos, como *Salmonella* y *L. monocytogenes*, pueden sobrevivir durante ese período. Diversos factores influyen en la presencia y supervivencia de patógenos en este producto: características del organismo, como su tolerancia al calor, ácido y sal, número inicialmente presente y su estado fisiológico que influye en la capacidad de sobrevivir a las operaciones del proceso. Entre los parámetros que adquieren importancia cabe destacar la temperatura de procesado y almacenamiento, la producción de ácido por los cultivos iniciadores, la adición de sal y otros inhibidores y el proceso de maduración⁽²⁷⁾.

Su elaboración con leche cruda y una maduración inferior a 60 días requiere el control de patógenos y microorganismos alterantes, durante el ordeño y en la leche durante su almacenamiento y transporte desde la granja a la quesería; la producción de ácido hasta un pH de 5.0 o algo más bajo limita el crecimiento de ciertos microorganismos, desgraciadamente, muchos quesos blandos no llegan a desarrollar tal grado de acidez, y durante la maduración el pH vuelve a subir. En el laboratorio, las bacterias lácticas de cultivos iniciadores exhiben propiedades inhibitorias importantes contra ciertas bacterias, como *L. monocytogenes*, por lo que pueden limitar el desarrollo de patógenos durante la maduración⁽²⁷⁾.

El queso es uno de los alimentos que en ocasiones ha estado implicado en brotes de Salmonelosis, en 1995 se inició una red Europea de vigilancia de las Salmonelosis humana, con la finalidad de mejorar su prevención en la UE⁽¹⁷⁾. La *Salmonella* puede multiplicarse durante la fabricación del queso y sobrevivir en diversas variedades de este producto, durante más de 60 días, diversos brotes producidos por esta bacteria, debidos al consumo de quesos contaminados han sido atribuidos a una falta de control durante el proceso de elaboración o a la utilización de leche cruda contaminada⁽²⁷⁾.

Cuando *L. monocytogenes* está presente en leche empleada para elaborar queso, su crecimiento disminuye pero no es prevenido completamente por la presencia de cultivos iniciadores ácido lácticos, esta bacteria es concentrada en la cuajada, quedando solo una pequeña porción de células en el suero, una vez en la cuajada, el comportamiento del patógeno oscila de crecimiento a muerte de casi todas las células; durante la maduración del los números disminuyen gradualmente, en forma rápida, durante el periodo inicial de maduración, y luego se estabiliza o incrementa marcadamente⁽¹¹⁾. Aunque generalmente no se multiplica durante la fermentación que se usa en la elaboración de este producto y de cármicos, varias semanas después de que esta es completada, existe con frecuencia un número escaso de supervivientes⁽²⁸⁾.

En 1950, estos productos fueron sospechosos de jugar un rol en la listeriosis proveniente de alimentos, sin embargo, desde junio de 1985, tres importantes brotes han sido directamente vinculados con queso suave contaminado, confirmando así su rol en la Listeriosis proveniente de alimentos. En junio de 1985, la habilidad de este tipo de alimento, para servir como un vehiculo, se volvió evidente cuando los quesos estilo mexicano marca Jallsco fueron vinculados a un brote masivo en el sur de California, 82% de los aislados clínicos fueron serotipo 4b, el equipo y el entorno de la fábrica presentaban una gran contaminación con este microorganismo. Un segundo brote importante ocurrió en Suiza, el cual fue provocado por queso suave madurado llamado Vacherin Mont d'Or (1987). En el más reciente brote los llamados Brie de Meaux y Pont l'Éveque fueron responsables de dos pequeños brotes en Francia (1995-1997)⁽⁴⁷⁾.

Los quesos blandos madurados superficialmente, mantienen el crecimiento, de *L. monocytogenes*, especialmente cerca de la superficie, en la que el pH se eleva debido al crecimiento de los mohos de superficie⁽²⁸⁾. La Listeriosis ha sido asociada a quesos blandos tales como feta, Brie, Camembert, variedades con vetas azules o estilo mexicano⁽¹⁹⁾, la mayor incidencia de este organismo en los quesos blandos y en los madurados por mohos que en los duros ha sido confirmada en estudios en EEUU, Francia, Italia, Dinamarca, Chipre, España, Suiza y Alemania⁽⁴⁹⁾.

Los quesos madurados por mohos tienen altos niveles de humedad y un pH elevado debido al metabolismo del lactato por los mohos y son extremadamente susceptibles a la contaminación superficial durante el proceso de maduración. Los incrementos en el número de microorganismos se asocian con los aumentos del pH del alimento durante la maduración, también se ha aislado de la salmuera utilizada en la fabricación de quesos Brie y Feta y se ha detectado durante extensos períodos de almacenamiento en las variedades Colby y Cheddar y en los envasados refrigerados⁽²⁷⁾.

El Queso Ricotta mostró ser el mejor sustrato para el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en 24 diferentes tipos comerciales extraídos de supermercados en California. Los que se elaboran a partir de suero, son un excelente sustrato para patógenos bacterianos que tal vez contaminen la cuajada, y crezcan en ausencia de una flora láctica protectora para eventualmente causar infección⁽⁴⁹⁾.

Los patógenos, si están presentes, pueden sobrevivir en el helado durante meses, *Salmonellae* ha permanecido viable en helado durante 7 años; diversos productos lácteos congelados han sido retirados en EEUU desde 1985 por estar contaminados con *L. monocytogenes*. En la crema, debido al elevado contenido de grasa y al efecto protector que tiene en los microorganismos, los tratamientos térmicos son más fuertes que los que se aplican para la elaboración de leches líquidas; la mayoría de los brotes recientes de Salmonelosis se han asociado con postres y platos preparados con crema⁽²⁷⁾.

En el caso del yoghurt, Choi et al., (1988) encontró que diversas cepas de *L. monocytogenes* inoculadas en yoghurt podrían recuperarse tras un almacenamiento de hasta 3 semanas, el comportamiento de esta bacteria en leches fermentadas también ha sido revisado por Ryser y Marth (1991); este microorganismo ha sobrevivido en leches fermentadas con bacterias lácticas mesófilas y termófilas, la extensión de la supervivencia en yoghurt se asoció con el cultivo iniciador y con el pH final, mientras más bajo era el pH, más corto era el tiempo de supervivencia⁽²⁷⁾.

3.3.3 CARACTERISTICAS DE MATERIALES FRECUENTEMENTE USADOS EN LA INDUSTRIA LACTEA, LOS CUALES SERÁN EVALUADOS EN ESTE TRABAJO.

Las superficies que contactan con los alimentos pueden constituir una fuente muy importante de contaminación pero las que no contactan si están sucias pueden contribuir también a este fenómeno mediante la generación de partículas de polvo y aerosoles ⁽²²⁾. La recontaminación de diversos productos a través de superficies ha sido observada en muchos casos y son numerosos los ejemplos donde las piezas de equipo han sido identificados como fuentes de patógenos; un aspecto interesante es el impacto de la microflora residente en equipos de procesado ⁽⁴⁴⁾. La accesibilidad a las áreas donde se acumula suciedad está ligada también a la estructura de las superficies donde asienta; la aptitud de limpieza es variable según los materiales, la facilidad de limpieza se puede clasificar como sigue: vidrio (100), acero inoxidable (80), aluminio (70), goma (30), plásticos (20) ⁽²⁶⁾.

Algunas veces la microtopografía de una superficie puede complicar los procesos de limpieza cuando las grietas y otras imperfecciones protegen a las células adheridas, por esta razón, el diseño apropiado del equipo es esencial para evitarlas. Los tratamientos de limpieza que producen defectos topográficos en una superficie van a incrementar el número de sitios de adhesión para los microorganismos, los sanitizantes aplicados después de esta operación para eliminar cualquier sobrante de bacteria, pueden también inducir la corrosión de las superficies. El vidrio es algunas veces usado para el equipo de alimentos por su superficie lisa y resistente a la corrosión, el acero inoxidable resiste los daños por el impacto mejor que el vidrio pero es vulnerable a la corrosión y las superficies de goma son propensas a la deterioración y tal vez desarrollen grietas superficiales donde las bacterias pueden acumularse ⁽⁶⁾.

Micrográficas electrónicas de barrido han mostrado que los microorganismos patógenos y alterantes provenientes de alimentos se acumulan como biofilms en acero inoxidable, aluminio, vidrio, sellos de goma, teflón y materiales de nylon, típicamente encontrados en ambientes de procesado de alimentos. Las superficies de nylon y teflón son lisas y los microorganismos parecen estar fijados, sin embargo, las de acero inoxidable tienen una apariencia áspera debido a las rajaduras y grietas suficientes para atrapar a las bacterias, mientras que las de aluminio tienen grandes grietas y exhiben una apariencia

parecida a esponja. Tales topografías permiten el escape de bacterias atrapadas de las fuerzas de cizalla e incluso los métodos mecánicos de limpieza podrían ser inadecuados⁽²²⁾. Así, deberían ser considerados muchos factores en el diseño de equipo que contacta con alimentos para evitar la contaminación microbiana⁽⁶⁾.

ACERO INOXIDABLE

De todos los materiales de las superficies que han de contactar con los alimentos, los aceros inoxidable son los preferidos y los más comúnmente utilizados. Son muchos los aceros inoxidable disponibles, pero los más utilizados son los del llamado grupo 18-8, de este grupo las aleaciones de grado 300 satisfacen la mayoría de las necesidades, el grado 304 es resistente a la corrosión originada por la mayoría de los alimentos y agentes de limpieza, no da coloraciones y es fácil de limpiar y relativamente barato; los aceros inoxidable varían también en el acabado (o pulido) de sus superficies, desde el basto o sin pulimentar al de espejo. Una de las causas principales de la corrosión es el mal empleo de las soluciones de limpieza y de los sanitizantes, en especial el hipoclorito sódico, algunas veces estas soluciones se dejan demasiado tiempo en contacto con las superficies o se aplican a concentraciones equivocadas⁽¹⁷⁾.

PLÁSTICO

Los plásticos se están empleando mucho en la industria alimentaria y no hay duda de que en el futuro tendrán más importancia, tienen muchas ventajas, pues son baratos, ligeros, transparentes cuando es necesario, atóxicos, no causan coloraciones, son relativamente resistentes a la corrosión y pueden ser resistentes a los ácidos, a los álcalis y a los detergentes, además se pueden seleccionar para su empleo en un amplio rango de temperaturas; sin embargo, se abrasionan antes que los metales con lo que su limpieza se ve dificultada⁽¹⁷⁾.

Las propiedades de los plásticos varían muchísimo, dependiendo de la materia prima utilizada, de los aditivos que se incorporan y del método de fabricación; básicamente los plásticos utilizados por la industria de los alimentos se agrupan en dos categorías: termoplásticos y termoestables, los primeros se ablandan al calentarlos y se endurecen al enfriarlos, proceso que puede repetirse cualquier número de veces sin cambio químico

apreciable, muchos de estos se basan en el etileno (polietilenos, polipropilenos, cloruro de polivinilo, polímeros de fluorocarbono y acrílico), pero algunos se basan en otras sustancias químicas, como por ejemplo, el nylon; en general son muy resistentes a los ácidos, álcalis y agentes de limpieza, toleran grandes variaciones de temperatura, aunque deben incorporárseles termoestabilizantes y pueden resistir la absorción acuosa, estos tipos de plásticos se han empleado para la construcción de tanques, tuberías y accesorios y cintas transportadoras; la madera de las tablas de picado ha sido sustituida en parte por termoplásticos duros, pero durables, sobre todo polietileno de alta densidad⁽¹⁷⁾.

Los termoestables difieren de los anteriores en que se endurecen la primera vez que se calientan pero si se recalientan pueden experimentar degradación química, los que se utilizan como material de construcción del equipo alimentario comprenden poliésteres, resinas epoxi y poliuretanos; generalmente se emplean en un intervalo de temperaturas más amplio que en el caso de los termoplásticos pero son más sensibles al ataque por ácidos y álcalis⁽¹⁷⁾.

MADERA

La madera, como otros materiales absorbentes, no debe emplearse en el procesado de alimentos. Se ha utilizado en muchas mesas de corte, pero los jugos de los alimentos penetran en ella y son casi imposibles de eliminar con la limpieza, cuando las bacterias, que también son difíciles de eliminar, degradan los restos alimenticios, se desarrollan sabores amargos y olores anormales, por lo tanto, el empleo de la madera debe restringirse al máximo, aunque se permite su utilización en cubas de fermentación⁽¹⁷⁾.

3.4 HIGIENE, LIMPIEZA Y SANITIZACIÓN

3.4.1 HIGIENE

La higiene es uno de los varios factores importantes que deben ser controlados para evitar las enfermedades transmitidas por alimentos y/o la alteración de estos, es básica para lograr la inocuidad y calidad de los alimentos en todo el mundo, ya que influye no solamente sobre los alimentos producidos y consumidos localmente sino también sobre los alimentos que llegan al comercio internacional; las prácticas higiénicas son importantes en todos los

países, con independencia de su base económica y nivel de vida y son necesarias en cada etapa de la cadena alimentaria desde la producción o recolección hasta el consumo del alimento, cada una puede influir sobre la calidad e inocuidad de los alimentos que son consumidos en algún momento, las prácticas incorrectas de higiene y manipulación permiten que las materias crudas contaminadas que lleguen hasta el ambiente de instalaciones de procesado, servicio de alimentos o los hogares sean causa de la contaminación cruzada de los alimentos listos para consumo. Higienización es el término que incluye todas aquellas acciones que ayudan a mantener o mejorar el bienestar físico humano, incluidas la limpieza general de su entorno y la conservación de su salud ⁽¹⁷⁾.

3.4.2 LIMPIEZA Y SANITIZACIÓN

Limpieza es el conjunto de operaciones que permiten eliminar la suciedad visible o microscópica, estas se realizan mediante productos detergentes elegidos en función del tipo de suciedad y las superficies donde se asienta^(30,47), con estas operaciones se pretende eliminar los residuos de alimentos que proporcionan los nutrientes necesarios para la multiplicación microbiana y así poder mantener un control microbiano, como ayuda para conseguir esto, el proceso de limpieza debe ir seguido de una sanitización mediante un agente químico⁽¹⁸⁾, la cual comprende los procesos implicados en la destrucción de la mayoría de los microorganismos de las superficies y del equipo pero no necesariamente las esporas bacterianas que persisten después de que han sido totalmente limpiadas con detergentes y la suciedad ha sido eliminada; el fin corrientemente perseguido es disminuir el número de microorganismos, de forma que los que sobrevivan no influyan en la calidad microbiológica de los alimentos que contacten con dichas superficies^(16,17,47). La sanitización eficiente es requerida en plantas de alimentos donde las superficies húmedas proveen condiciones favorables para el crecimiento microbiano ⁽⁶²⁾.

El plan global de dominio de la higiene incluye la limpieza y sanitización, es importante mantener la planta y el material limpios, puesto que el propio trabajo crea un "flujo microbiano", estos microorganismos vienen del exterior con materias u objetos contaminados (materias primas, embalajes, carretillas elevadoras, etc.), el aire, el agua, con el hombre mismo, que se comporta como reservorio natural de bacterias (en piel, faringe, intestino), o

como un vector pasivo (manos, indumentaria, zapatos, etc.), de ahí la importancia de abordar la higiene en su conjunto ⁽²⁶⁾.

Por lo tanto, la rutina de usar buenas prácticas de limpieza y sanitización son de gran importancia para el seguro control microbiano⁽⁴⁷⁾, su aplicación es parte esencial de la producción de alimentos y la eficiencia con que estas se llevan a cabo ejerce una enorme influencia en la calidad final del producto⁽¹⁷⁾; su finalidad consiste en eliminar, o reducir a un número aceptable, la población microbiana sobre el equipo y en el ambiente donde se manipulan alimentos, existe la creencia popular errónea de que el proceso de limpieza y sanitización eliminará la totalidad de los microorganismos, en la práctica, esto no es posible sin usar algún procedimiento aprobado de esterilización como sucede con determinado equipo en los sistemas de procesado aséptico⁽¹⁸⁾. La limpieza y la sanitización tienen como fin asegurar una buena higiene, tanto a nivel de los locales, los materiales, el personal y el ambiente y es una de las condiciones necesarias para obtener un producto sano y de buena calidad sensorial ⁽²⁶⁾.

Las superficies pueden parecer limpias y seguir siendo inaceptables microbiológicamente, por el contrario, pueden parecer no limpias aunque en realidad sean bastante aceptables para ciertas operaciones, por lo cual es necesario la toma de muestras para confirmar aquello que los sentidos humanos perciben como limpio o no limpio; la razón por la que se limpian y sanitizan las superficies que contactan con los alimentos y el ambiente es para ayudar en el mantenimiento del control microbiológico, si se realiza con eficacia y en el momento apropiado, su efecto neto será el control de la población microbiana; un factor adicional que influye sobre la higiene, es la naturaleza de los materiales, los que son impermeables (acero inoxidable) son más fáciles de limpiar y desinfectar que los porosos (madera), ya que resulta más difícil eliminar los residuos de los alimentos y los microorganismos de éstos últimos, además el secado es más lento; la combinación de una mayor dificultad para su limpieza y un secado lento aumenta la probabilidad de que retengan residuos húmedos de alimentos y de que no se logre el control microbiano, esta es la razón para que haya disminuido el empleo de la madera en toda la cadena alimentaria y de que haya aumentado el empleo de materiales impermeables metálicos o sintéticos como el plástico ⁽⁴⁷⁾.

Los sanitizantes usados en la industria de procesado de alimentos incluyen agentes oxidantes (hipoclorito, peróxido de hidrógeno, ozono y ácido paracético); agentes desnaturalizantes (productos a base de alcohol); no oxidativos y agentes reductores de tensión superficial^(16,62). Los factores que influyen en la selección de un desinfectante son: toxicidad, corrosión, efecto sobre el alimento que se produce, actividad residual, manchas sobre el equipo, costo, aprobación por el gobierno de la composición del sanitizante, efecto que pueda ejercer sobre el medio ambiente y plantas para el tratamiento de aguas residuales después de que abandona las instalaciones de procesado, y si es preciso un aclarado con agua potable para eliminarlo, la influencia de los agentes sobre la salud de los trabajadores y la inocuidad del producto⁽¹⁶⁾. La elección de un agente sanitizante no siempre es fácil; en ciertos tipos de actividad debe tener una acción selectiva, para respetar cierta flora específica de maduración de ciertos productos, en otros casos, se buscará una acción más orientada hacia los microorganismos patógenos o alterantes⁽²⁶⁾.

Los sanitizantes que se deseen utilizar en las superficies que contactan con los alimentos deben cumplir lo siguiente:

- Destruir rápidamente los microorganismos, siendo igual de eficaces con las bacterias Gram (+) que con las Gram (-), deben destruir la mayoría de las esporas fúngicas, siendo también conveniente la destrucción de las esporas bacterianas.
- Ser suficientemente estables en presencia de residuos orgánicos y si fuera necesario, en presencia de aguas duras.
- No ser corrosivos ni dar color a ninguna superficie de la fábrica.
- Ser inodoros o no desprender olores desagradables.
- No ser tóxicos, ni irritantes a los ojos o la piel.
- Fácilmente solubles en agua y arrastrables por enjuagado.
- Estables durante mucho tiempo en forma concentrada y durante un tiempo más breve en forma diluida.
- Económicamente competitivos y al emplearlos presentar una buena relación costo/efectividad⁽¹⁷⁾.

Si una superficie permanece húmeda y contiene nutrientes para permitir la multiplicación microbiana, aumentará la población de microorganismos, la temperatura ambiental influye intensamente sobre la velocidad de multiplicación y sobre el tipo de microorganismos que se multiplican, la peor condición consiste en un residuo húmedo de alimento en una habitación templada; raras veces se considera el concepto de una flora normal característica asociada con el ambiente y el equipo de procesado, aunque la experiencia demuestra que ciertos microorganismos aparecen asociados más frecuentemente con determinados alimentos, aceptando la existencia de una flora normal que es capaz de multiplicarse sobre el equipo y posteriormente sobre éste sometido a operaciones incorrectas, se apreciará mejor el papel de la limpieza y la sanitización; el programa higiénico intenta controlar la población de esta flora normal de forma que equipo y medio ambiente sean aceptables para la preparación de los alimentos⁽¹⁶⁾.

Una vez limpias y sanitizadas las superficies que contactan con los alimentos pueden recontaminarse si establecen contacto con otras sucias, paños, alimentos crudos, salpicaduras, polvo, manipulación, insectos y roedores, así, la tarea de limpieza no es completa a menos que los artículos sean protegidos de la recontaminación entre dos empleos; si el objeto limpiado y sanitizado va a permanecer sin ser usado (por ejemplo durante toda la noche), será secado después de limpio, y sanitizado de nuevo antes de usarlo, el intervalo de tiempo entre los lavados adquiere importancia porque los microbios se multiplicarán cuando el objeto sea lavado, usado, vuelto a lavar y a utilizar, el objeto debe ser lavado a intervalos de tiempo que aseguren que la población microbiana se mantiene en un nivel aceptablemente bajo, la afirmación de que algunos sanitizantes tiene actividad residual sobre las superficies húmedas deberá ser comprobada si se usan dichos agentes para tal propósito⁽¹⁶⁾.

Los factores que influyen sobre la eficacia de los sanitizantes aplicados tras una limpieza húmeda incluyen:

- La concentración del sanitizante
- Tiempo de contacto
- Temperatura
- pH

- Dureza del agua
- Detergentes residuales
- Cantidad y clase de materia orgánica
- Tipo de superficie
- Clases y cantidades de microorganismos que deben ser destruidos ⁽¹⁶⁾.

Los cuatro factores más importantes que controlan la eficacia de la limpieza y de la sanitización son:

- Selección y concentración de los productos químicos utilizados
- Temperatura
- Tiempo de contacto
- Fuerza mecánica

Mediante la variación de estos cuatro factores es posible eliminar la suciedad que se acumula durante las operaciones de procesado de alimentos y sanitizar el equipo ⁽¹⁶⁾.

A pesar de que tan bien son seguidas las recomendaciones para limpieza y sanitización, todas las instalaciones de procesado de alimentos deberían verificar la efectividad de sus programas de limpieza y sanitización a través de análisis microbiológico de producto y muestras ambientales obtenidas de todas las áreas de las instalaciones, durante el muestreo ambiental, la eficacia de los procedimientos de limpieza y sanitización pueden ser fácilmente determinados a través del uso de sistemas de monitoreo bioluminiscente ATP, se debe dar particular atención a pisos, drenajes, paredes, área de llenado y empaçado y cualquier equipo de procesado que sea difícil de limpiar ⁽⁴⁷⁾.

La higiene de las superficies puede ser determinada mediante algún criterio (por ejemplo, número de microorganismos por centímetro cuadrado), los estándares de higiene deben ser realistas para las condiciones y el alimento que se prepara ya que permiten valorar el rendimiento de los procesos de limpieza y sanitización y pueden ser usados para confirmar que el medio ambiente este bajo control; en algunos casos podría llegarse a la conclusión de que las condiciones no son adecuadas para la preparación de un determinado alimento porque no se alcanzan los estándares de higiene para la inocuidad y

la calidad de éste. Las sustancias empleadas para sanitizar pueden ser de origen natural o químico ⁽¹⁸⁾.

3.5 ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN NATURAL

Algunos datos de conservación de alimentos se remontan a los tiempos de la prehistoria y se han refinado dentro de un arte culinaria en varias partes del mundo. Los beneficios potenciales de plantas comestibles, así como sus fitoquímicos, en la conservación de alimentos y mejoramiento de cualidades organolépticas de ciertos alimentos tradicionales ha sido practicada por siglos. Hace 5000 años, los chinos usaban hierbas como medicinas; reportes en el uso de hierbas y especias antimicrobianos puede ser trazada a 1550 a.C., cuando los antiguos Egipcios usaron canela, comino y tomillo para la conservación de alimentos y momificación; el almacenamiento de yoghurt bajo aceite de oliva ha sido practicado desde tiempos bíblicos, y fue asumido que el aceite tiene un rol conservador; evidencia científica del potencial de conservación de las especias emergió en el siglo XIX, en 1887 se dio el primer reporte de actividad antimicrobiana de aceite de canela contra esporas del bacilo de ántrax; en 1918 se observó la habilidad de los extractos acuoso y alcohólico de canela para conservar salsa de tomate; en 1929 se desarrollo un método en la India para conservar frutas nativas con clavo y sal; en 1939 se encontró que la canela inhibía crecimiento microbiano y los clavos inhibían *Bacillus subtilis* y *S. aureus*; aunque antiguas civilizaciones conocían el potencial antimicrobiano de muchos extractos de plantas, no fue hasta recientemente que los fitoquímicos implicados fueron caracterizados. Avances en técnicas de separación molecular permitieron el aislamiento de varios compuestos fitofenólicos, y la creciente demanda por alimentos mínimamente procesados con vida de anaquel extendida, ha revivido interés en la explotación del uso de agentes antimicrobianos naturales ⁽³⁹⁾.

Los fotoquímicos que exhiben varios grados de actividad antimicrobiana se encuentran en tallos de plantas, corteza, flores y frutas; las especias, las hierbas y sus aceites esenciales tienen varios grados de actividad biológica. En muchos casos, las concentraciones de los compuestos antimicrobianos en hierbas y especias son muy bajos para ser usados efectivamente sin efectos adversos en las características sensoriales de un

alimento, sin embargo, ellos pueden contribuir al sistema de barreras global presente naturalmente en un producto alimenticio, compuestos derivados naturales y otros productos naturales podrían tener aplicaciones en el control de patógenos en alimentos ^(39,41).

Las demandas de los consumidores en general juegan un rol crítico en la inspiración del momentum de investigación y desarrollo en protección de alimentos, el interés por alimentos mínimamente procesados y funcionalidad sostenida de ingredientes bioactivos producidos naturalmente está aumentando continuamente; estas peticiones están basadas en la creciente preocupación por el uso de conservadores sintéticos con documentación limitada de seguridad y tolerancia, el sospechado vínculo entre el excesivo uso de antibióticos y el desarrollo de resistencia en microbios y el incremento de los conocimientos en dieta y salud. Además, el reciente surgimiento de patógenos provenientes de alimentos tales como *Listeria monocytogenes*, la *Salmonella typhimurium* DT104 resistente a los antibióticos y el enterohemorrágico *Escherichia coli* O157:H7 han hecho de la seguridad de alimentos una prioridad por parte de las autoridades regulatorias de salud ⁽³⁹⁾.

La protección de alimentos de microorganismos alterantes y patógenos puede ser conseguida por varios métodos incluyendo manejo aséptico para prevenir o minimizar la entrada de microorganismos, remoción por métodos físicos a través de lavado, centrifugación o filtración, destrucción con calor, gas o irradiación, e inhibición de crecimiento por refrigeración, congelación, secado, o adición de conservadores; cada método es útil como un factor individual en el control microbiano o es parte de una barrera en un sistema de conservación de alimentos multi-factor ⁽³⁹⁾.

La preocupación actual por los aditivos alimentarios está en muchos casos asociada con el culto a la madre naturaleza, prevaleciendo la idea de que los alimentos "naturales" son buenos y que los "artificiales" (alimentos procesados que contienen aditivos) son malos, otros factores que contribuyen son: la información que figura en las etiquetas de los alimentos sobre los ingredientes; el creciente interés del público por la salud y nutrición; el aumento en el control de los alimentos; las acciones gubernamentales en relación con los ingredientes de los alimentos y las campañas de las asociaciones de consumidores; cualquiera que sea la contribución individual de estos factores, el resultado final es la

preocupación por los peligros ocasionados por los aditivos alimentarios. La definición técnica de aditivo alimentario del Food Protection Committee of the Food and Nutrition Board Academy of Sciences es "cualquier sustancia o mezcla de sustancias distintas a los componentes básicos que están presentes en los alimentos como consecuencia de su producción, procesado, almacenamiento o envasado", a los aditivos intencionalmente añadidos se les denomina voluntarios y cumplen propiedades funcionales en los alimentos como la de prevenir la alteración de los mismos ⁽⁴⁵⁾.

Los problemas toxicológicos asociados con el uso de ciertos antimicrobianos químicos en alimentos ha generado interés en la industria de alimentos por usar compuestos naturales, antimicrobianos comúnmente usados, tales como los ácidos orgánicos que son producidos en grandes cantidades a través de síntesis química, son también hallados naturalmente en muchos alimentos y son GRAS (generalmente reconocidos como seguros) de acuerdo a autoridades regulatorias como la FDA (Food and Drug Administration). Muchos ingredientes de alimentos naturales son evaluados a través del tiempo con beneficios probados como aditivos alimentarios, sin embargo, esto no garantiza una seguridad requerida para componentes específicos aislados de esos materiales. El aislamiento de componentes bioactivos de fuentes naturales posee nuevos parámetros de evaluación de seguridad:

- 1) Los procesos a los que se somete un aislamiento podrían enriquecer un alérgeno, mutagen o toxina indeseable, de la fuente natural.
- 2) Un componente no tóxico diferente podría ser activado durante el aislamiento.
- 3) Los métodos de extracción/purificación posiblemente podrían desnaturalizar un componente bioactivo y crear uno nuevo con manifestación tóxica.
- 4) Los solventes residuales podrían reaccionar y/o contaminar el producto final y comprometer las propiedades estructura-funcionales.
- 5) El nivel de consumo diario aceptable de un compuesto biológico aislado podría ser mayor que su consumo vía fuente natural.
- 6) El antimicrobiano natural purificado incorporado en una formulación podría reaccionar con otros ingredientes para formar especies tóxicas ⁽³⁹⁾.

La aplicación potencial de sistemas antimicrobianos naturales es enorme, las bases científicas para la incorporación en varios alimentos y los conocimientos técnicos de la biofuncionalidad máxima de sistemas antimicrobianos naturales está siendo actualmente explorada en varias partes del mundo ⁽³⁹⁾.

La extracción de antimicrobianos de fuentes naturales en algunos casos puede ser compleja y cara, la selección de fuentes naturales, aislamiento y aplicación comercial es desafiante debido a la variabilidad en cuanto a la composición de los alimentos, la cual influye en la conservación y las propiedades sensoriales y químicas complejas de antimicrobianos naturales, una de las limitaciones en el uso de los conservadores derivados naturalmente es la asociación de sabores los cuales pueden alterar el gusto de los alimentos; Lis-Blachin and Deans (1997) mostraron que los aceites esenciales derivados de fuentes botánicas comunes variaron ampliamente en composición y en actividad contra *L. monocytogenes*. Un conservador de alimentos funcional proporciona la inhibición consistente de los microorganismos. La variabilidad en composición y actividad inherente de los aceites esenciales crudos por lo tanto dificulta las aplicaciones en alimentos donde la vida de anaquel y seguridad dependen de la eficacia del conservador. Los aceites esenciales podrían posiblemente ser presentados más confiables si las concentraciones relativas de componentes antimicrobianos fueran ajustadas a niveles que proporcionen la intensidad y el espectro de acción requeridos. Se considera que esto podría ser realizado por destilación de los aceites crudos para producir preparaciones con una composición constante y reproducible, o por mezclado de fracciones individuales para alcanzar un nivel de actividad deseado. Los procedimientos de extracción no desnaturalizantes, métodos de aislamiento eficientes a gran escala y técnicas para retener las propiedades biofuncionales están siendo optimizadas para varios de los antimicrobianos naturales ⁽¹³⁾.

De los muchos agentes utilizados para impartir aromas y sabores a los alimentos, algunos poseen un efecto antimicrobiano evidente ⁽²⁹⁾, muchas especias contienen químicos específicos y/o aceites esenciales que pueden inactivar o inhibir varios organismos alterantes ó patógenos ⁽⁴⁷⁾, por lo que han sido objeto de la mayoría de los estudios por parte de los microbiólogos de alimentos; en general, los compuestos que comunican sabor tienden a ser más antifúngicos que antibacterianos. De un total de 21 compuestos que imparten

sabor examinados en un estudio, aproximadamente la mitad tuvieron concentraciones mínimas inhibitoras (MIC) de 1000 ppm o menos, tanto frente a bacterias como frente a Mohos, todos ellos fueron sensibles al pH, aumentando su poder inhibitor conforme disminuían el pH y la temperatura de incubación. A finales de la década de los años 1970, la búsqueda de agentes economizantes del nitrito despertó un renovado interés por dichas fuentes naturales y sus extractos, en las cuales, las sustancias antimicrobianas varían, en cuanto a su contenido, desde la alicina del ajo (con una variación del 0.3 al 0.5%) hasta el eugenol en los clavos (16-18%); cuando se emplean en su totalidad, los valores de las MIC correspondientes oscilan desde el 1 hasta el 5% para los microorganismos sensibles. Según han indicado varios investigadores, la salvia y el romero se encuentran entre las que tienen mayor poder antimicrobiano, habiéndose señalado que incorporadas a medios de cultivo a la concentración del 0.3% inhibieron 21 bacterias Gram (+) de un total de 24 y que fueron más eficaces que la pimienta inglesa; aún se desconocen los mecanismos mediante los cuales inhiben a los microorganismos, pudiéndose suponer que son diferentes para cada uno de los grupos de especies no emparentadas, la suposición de que el mecanismo del orégano, del romero, de la salvia y del tomillo es posible que sean parecidos, está avalada por el hallazgo según el cual, en algunas bacterias acidolácticas, la aparición de resistencia a una de estas especias fue acompañada de la aparición de resistencia a las otras tres ⁽²⁰⁾.

Además de las especias y semillas, existen otras fuentes naturales de antimicrobianos como frutas y vegetales frescos. Se ha investigado los restos provenientes de la elaboración del vino (semillas y cáscaras de uva), y se encontró que tienen la capacidad de matar *E. coli* y *S. aureus* ⁽²¹⁾, los científicos consideran que el extracto de dichos residuos podría emplearse como un aditivo en alimentos que tendría la ventaja de ser natural e inofensivo.

FITO-FENOLES

Los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana de las especias son primordialmente fenólicos de fracciones de aceites esenciales, algunos estudios se han enfocado en el mecanismo por el cual las especias o sus aceites esenciales inhiben microorganismos. Puesto que ha sido concluido que los terpenos en sus aceites esenciales son los antimicrobianos principales, el mecanismo involucra dichos compuestos y parece razonable que sus modos de acción pudieran ser relativos a otros compuestos fenólicos. El

modo de acción de los compuestos fenólicos es generalmente a través de la interferencia con funciones de la membrana citoplasmática incluyendo fuerza pronto motriz y transporte activo; los compuestos reaccionan con las proteínas de la membrana citoplasmática de los microorganismos, esto causa cambios en la permeabilidad de la membrana provocando un posible desorden de la fuerza pronto motriz afectada ⁽³⁹⁾.

La actividad antimicrobiana más consistente entre hierbas y especias ha sido encontrada con componentes de clavo, canela, semillas de mostaza, orégano, romero, salvia, tomillo y vainilla. Ciertos agentes fito-fenólicos tales como las oleorresinas de el aceite de oliva parecen proporcionar beneficios fisiológicos multifuncionales a los consumidores, y por lo tanto, son altamente atractivos para la industria de alimentos sanos. Ya que los fito-fenoles han estado en los alimentos y han sido consumidos por siglos, estos fito-antimicrobianos naturales parecen ser seguros comparados con los conservadores sintéticos ⁽³⁹⁾. Compuestos purificados derivados de aceites esenciales, tales como carvacrol, eugenol, linalol, aldehído cinámico y timol inhiben una amplia variedad de microorganismos, los aceites esenciales individuales pueden contener mezclas completas de tales compuestos, sin embargo, poco es conocido acerca de los efectos de interacciones entre constituyentes individuales en actividad antimicrobiana ⁽¹³⁾.

La actividad antimicrobiana de la miel ha sido atribuida al peróxido de hidrógeno y compuestos fenólicos, aunque la letalidad e inhibición por estos y otros componentes contra microorganismos varía grandemente, dependiendo de la fuente floral del néctar. En un estudio, las pruebas con discos revelaron que el desarrollo de zonas de inhibición de crecimiento depende de el tipo y concentración de la miel así como de el patógeno de prueba. La miel ha sido usada como vendaje de heridas desde tiempos antiguos y han sido revisados reportes que describen la inhibición del crecimiento de numerosas bacterias, entre ellas *L. monocytogenes* y *Salmonella*. Tres tipos de miel no procesadas evaluadas en dicho estudio fueron, en conjunto, más inhibitorias que los tipos de mieles procesadas para el crecimiento de cinco de los seis patógenos probados, las mieles oscuras no procesadas también contenían los niveles más altos de poder antioxidante, esta correlación podría soportar la noción de que los antioxidantes presentes en la miel contribuyen a la actividad antibacteriana ⁽⁵⁶⁾.

SAPONINAS

Saponinas son un grupo de glucósidos naturales los cuales son primordialmente encontrados en el reino vegetal, en diferentes partes de la planta incluyendo raíz, brote, flores y semillas, que las protegen del estrés ambiental y que presentan actividad antimicrobiana, antifúngica y antiviral. Dependiendo de la estructura de las saponinas podrían mostrar actividades hemolíticas, antimicrobianas, despolarización de membrana, unión con colesterol y alelopáticas. Diversas fuentes de plantas han sido usadas comercialmente, pero solo dos de ellas son permitidas actualmente como aditivos en alimentos, estas son extractos de *Quillaya saponaria* y *Yuca schidigera*, reconocidas como productos GRAS. Además de emulsificadores y potencializadores de sabor, pueden desempeñar una función importante como conservadores contra ciertas cepas como *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella spp.*, *P. aeruginosa*, *Aspergillus niger*, y *Penicillium chrysogenum* ⁽³⁹⁾.

FLAVONOIDES

Los flavonoides se encuentran como pigmentos en flores, frutas, corteza y tallos, están caracterizados por su actividad antimicrobiana de amplio espectro y por no inducir resistencia en los organismos objetivo. Los isoflavonoides, como productos naturales y como potentes inhibidores de crecimiento fúngico, podrían ser usados en el control de enfermedades en vegetales, debido a esta actividad antimicrobiana específica, ha sido sugerida su posible aplicación en granos como alternativa para prevenir la pérdida de estos productos en países desarrollados. También son de gran interés en tecnología de alimentos ya que contribuyen a la calidad sensorial y nutricional de las frutas y productos de fruta, está bien reconocida la actividad antioxidante de estos y los fenilpropanoides en varias bebidas incluyendo jugos de frutas. Recientemente ha habido un resurgimiento del interés en el rol de los flavonoides en la salud y enfermedad, al respecto, se ha sugerido una asociación entre la reducción de mortalidad de enfermedades coronarias y alto consumo de vino ⁽³⁹⁾. Entre las numerosas sustancias identificadas en plantas medicinales, los flavonoides representan una de las clases más interesantes de compuestos bioactivos, actualmente 40 especies de plantas están actualmente en uso como fitomedicinas por su contenido de estos compuestos. Algunas de estas sustancias se pueden encontrar como derivados del propolis, un material resinoso colectado por las abejas de exudados gomosos de los árboles y usado como un agente antibacteriano en los enjambres ⁽⁵⁶⁾.

TIOSULFINATOS

Tiosulfinatos tales como la alicina y el ajoene son componentes antimicrobianos del ajo. Entre los microorganismos que inhibe se encuentran *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Coliformes*, *E. coli*, *Helicobacter pilori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium phlei*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp*, *Aspergillus niger*, y *Penicillium spp*. El almacenamiento de los extractos de ajo es una limitación definitiva, muchos estudios han mostrado que pierden sus efectos antimicrobianos durante el almacenamiento, estas pérdidas varían con la temperatura así como con el tiempo de almacenamiento⁽³⁹⁾.

GLUCOSINOLATOS

Se encuentran en muchas especies de plantas de la familia Brassicaceae, éstas incluyen mostaza, col, coliflor, col de brucas, brócoli, colinabo; los glucosinolatos volátiles tales como los isotiocianatos presentan un amplio rango de efectos antibacterianos y antifúngicos, la aplicación de alil isotiocianato gaseoso como conservador en empaquetado de alimentos ha sido sugerido a bajas concentraciones. Presentan actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *Pseudomonas*, *E. coli*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Aspergillus flavus* y *Penicillium expansum*, entre otras⁽⁵⁸⁾.

Debido a las concentraciones variables de los constituyentes antimicrobianos en las diferentes especias y debido a los muchos estudios que se han llevado a cabo empleándolas en base a su peso seco, resulta difícil averiguar la MIC de una especia dada frente a microorganismos concretos; otra causa de los resultados contradictorios obtenidos por diferentes investigadores es el método de ensayo empleado. En los medios de cultivo, los extractos de especias son menos inhibidores que las especias. A pesar de las dificultades existentes para comparar los resultados de unos estudios con los obtenidos en otros, la actividad antimicrobiana de las especias es innegable y de aquí que un gran número de investigadores haya demostrado la eficacia de por lo menos 20 especias diferentes o la de sus extractos frente a la mayoría de los microorganismos causantes de intoxicaciones alimentarias, incluidos los Mohos productores de micotoxinas⁽²⁹⁾.

Algunas plantas medicinales son fuentes naturales de compuestos herbales valiosos los cuales son a menudo usados en el tratamiento de varios alimentos. *Syzygium jambolanum* (*Eugenia jambolana* Lam.), está extendido en la India, Ceylon, Malasia y Australia, sus semillas son usadas por personas de las aldeas para tratar enfermedades causadas por patógenos bacterianos, fúngicos o virales; en un estudio, los extractos metanólicos exhibieron MBC (concentración mínima bactericida) de 500 µg/ml, mientras los extractos acuosos mostraron valores de MBC de alrededor de 250 a 500 µg/ml, para diversos microorganismos⁽⁹⁾.

Los conservadores químicos tales como el sorbato de potasio y benzoato de sodio han sido usados para extender la vida de anaquel de los alimentos, sin embargo, el uso de estos conservadores puede causar brotes de alergias o efectos secundarios en los consumidores si ellos consumen más de cierta cantidad en sus alimentos⁽²⁴⁾. Para desestabilizar la capa de lipopolisacáridos de la membrana exterior de las bacterias Gram(-), ha sido propuesto el uso de diversos agentes quelantes tales como el EDTA y otras sustancias, desafortunadamente esos agentes que causan la permeabilización de la membrana exterior a menudo son muy tóxicos para ser usados como ingredientes de alimentos; el ácido cítrico como agente quelante parece ser más interesante para la desestabilización de la membrana externa de estos microorganismos además de la homogenización a alta presión en productos alimenticios (usada frecuentemente en lácteos), sin implicaciones de seguridad⁽³⁴⁾.

SANITIZANTES

Los sanitizantes se clasifican en:

1. Compuestos que liberan cloro.
2. Compuestos de amonio cuaternario.
3. Yodóforos.
4. Compuestos anfóteros.
5. Compuestos que liberan oxígeno^(16,17).

El cloro es en varias formas el sanitizante químico más ampliamente usado en la industria de alimentos⁽³⁹⁾, se elige para su uso en equipo en muchas instalaciones de

procesado de alimentos⁽⁴³⁾. En general, los organoclorados son bactericidas que actúan más lentamente que las formas orgánicas, pero ellos ofrecen la ventaja de estabilidad y son relativamente menos irritantes para el personal y menos corrosivos para el equipo; el cloro y los sanitizantes aniónicos generalmente remueven los biofilms mejor que el yodo, y los compuestos de amonio cuaternario (QAC). El rango de microorganismos eliminados o inhibidos por compuestos basados en cloro es probablemente más extenso que cualquier otro agente aprobado⁽⁸²⁾.

En procesos de sanitización, en la industria de alimentos, ha sido usada una amplia variedad de compuestos químicos, muchos de los cuales son QAC⁽²⁾, estos agentes especialmente dedicados a bacterias Gram (+) son moléculas catiónicas hidrofílicas, ya que la superficie bacteriana es hidrofílica y cargada negativamente, los QAC pueden penetrar la pared así como romper la membrana citoplásmica de las células suspendidas libremente; pero respecto a biofilms, las bacterias adheridas actúan como un escudo y reducen la accesibilidad de células adherentes presentes en la superficie del biofilm, por otro lado, son confrontados con el glicocalix desarrollado por células en este modo de crecimiento; esta matriz puede actuar como una barrera polianiónica funcionando como una resina intercambiadora de iones capaz de ligar un muy amplio número de moléculas obstaculizando el acceso de el sanitizante a la membrana celular⁽¹⁰⁾.

Con el propósito de desarrollar nuevos desinfectantes y antisépticos, se sintetizaron tres diferentes series de sales cuaternarias de imidazolium y pyrrolidinium mismas que fueron enfrentadas contra *Salmonella typhimurium* entre otras. La eficiencia antimicrobiana fue medida por la inhibición del crecimiento de bacterias y mohos expresada como valores de concentración mínima inhibitoria, dando buenos resultados las series de sales de imidazolium contra las bacterias y mohos examinados. Aún cuando los QAC son muy usados por amplio espectro de actividad biocida, sus aplicaciones directas a algunos campos altamente demandantes, como lo es la industria de alimentos, ha sido limitada por el descubrimiento del fenómeno de resistencia microbiana contra este tipo de biocidas⁽¹⁴⁾.

CITROL- K

Citrol-K es un producto de origen natural, no tóxico elaborado a partir de los extractos de semilla de toronja, de naranja y de limón; es biodegradable, cuenta con un amplio espectro de actividad contra diversos microorganismos patógenos y alterantes, causantes de muchas enfermedades y de la descomposición de los alimentos. Además es una buena opción para evitar el empleo de sanitizantes que son dañinos a la salud y de efectos negativos al medio ambiente, siendo también un antioxidante efectivo por su contenido de ácido ascórbico. Exhibe un amplio poder residual pero sin dejar trazas de sustancias tóxicas en las superficies tratadas con él. Con respecto a la toxicidad, el DL₅₀ vía oral de Citrol-K es de 5000 mg/kg. de peso, y la toxicidad crónica es 2500 mg/kg. de peso en rata⁽⁴²⁾.

La composición de Extractos cítricos es:

- Aminoácidos, Bases nitrogenadas
- Ácidos grasos, Ácidos orgánicos
- Carbohidratos
- Aldehídos : citral, aldehído cinámico
- Fenoles simples: eugenol, timol
- Terpenos: limoneno, pineno
- Esteres: acetato de linallil y acetato de geraniol
- Bioflavonoides: compuestos polifenólicos encontrados en frutas y hortalizas, los cuales tienen actividad biológica⁽⁴²⁾.

Bioflavonoides encontrados en las frutas y hortalizas:

- Narangina
- Neoesperidina
- Hesperidina
- Poncirina
- Quercentina (glicósido)
- Apigenina (glicósido)⁽⁴²⁾.

El mecanismo de acción del antimicrobiano Citrol-K es mediante la modificación de la permeabilidad de la membrana celular con los siguientes efectos irreversibles:

- Vertido citoplasmático
- Inhibición de transporte activo
- Alteración de la cadena respiratoria ⁽⁴²⁾.

Formas de aplicación como sanitizante:

- Aspersión
- Inmersión
- Nebulización
- Recirculación
- Cepillado ⁽⁴²⁾.

Propiedades técnicas:

- Estable en diferentes condiciones de manejo y procesamiento.
- Inerte a los alimentos en los que se incorpora.
- No corrosivo y no tóxico.
- No modifica las características sensoriales de los productos.
- Completamente miscible con el agua, en cualquier proporción.
- Compatible con otros aditivos empleados rutinariamente en la industria de los alimentos y bebidas.
- Tiene un pH ácido y funciona tanto en el rango ácido como en el alcalino, por lo que su actividad conservadora no depende del pH del medio, a diferencia de otros productos.
- Manejo fácil y seguro.
- Puede utilizarse como sanitizante de superficies en los programas rutinarios de limpieza y sanitización; también en la sanitización de las manos del personal que interviene en la elaboración de los productos alimenticios.
- Para su uso como sanitizante el tiempo de contacto recomendado es 20 min. ⁽⁴²⁾.

Propiedades Microbiológicas:

- Amplio espectro de eficacia.
- Tiene un gran poder bactericida y fungicida, aún en dosis pequeñas, desplegando una gran efectividad contra microorganismos Gram (+), Gram (-) y Mohos.
- No es degradado por los microorganismos.
- Inhibe la formación de micotoxinas.
- Su empleo continuo no conduce a problemas de resistencia ⁽⁴²⁾.

Propiedades Fisiológicas:

- Inocuo a seres humanos, animales y plantas
- No causa problemas de toxicidad por ninguna vía ⁽⁴²⁾.

Por sus propiedades de inocuidad, seguridad y efectividad, tiene una amplia gama de posibilidades de uso en diferentes sectores de la producción y de los servicios, por ejemplo : Industrias de productos cárnicos, lácteos, del mar, congelados, derivados de frutas, verduras y hortalizas, conservas y enlatados, cervezas, vinos y licores, refrescos, jugos y bebidas, agua purificada, harinas, pastas y similares, dulces, chocolates y golosinas, alimentos balanceados, servicios de comedor y servicios de transporte ⁽⁴²⁾.

3.6 RESISTENCIA MICROBIANA

3.6.1 ESTRES AMBIENTAL

Los microorganismos pueden desarrollar resistencia a tratamientos de procesado de alimentos ⁽⁶⁾. En la naturaleza, *L. monocytogenes* tal vez este sujeto a varios estrés ambientales, tales como alta y baja temperatura, condiciones ácidas, oxidativas y hambre⁽¹⁸⁾, esto puede inducir respuestas de estrés-adaptativo o protector, estos, son percibidos por los microorganismos como señales para la expresión de factores de virulencia los cuales les ayudan a incrementar la supervivencia. Por ejemplo, incubando un microorganismo a una alta temperatura pero sub-letal va a inducir la llamada respuesta de shock-térmico o de adaptación, la resistencia de *L. monocytogenes* a la temperatura u otros factores letales puede ser incrementada en gran medida por esta respuesta; la adaptación ocurre en todas las bacterias, incluyendo este patógeno ⁽⁴⁷⁾.

Los inóculos cultivados a temperaturas bajas proporcionan células que tienen una termorresistencia reducida, esta se incrementa por el crecimiento previo a temperaturas relativamente elevadas, por concentraciones altas de solutos o un pH de crecimiento subóptimo ⁽²⁸⁾, *L. monocytogenes* presenta estas características, ella responde sintetizando nuevas proteínas, llamadas proteínas de shock térmico (HSPs). La termotolerancia inducida por el shock térmico es transitoria y no hereditaria por lo que se le llama adquirida y su magnitud es también afectada por el ritmo y la duración de calentamiento, el estado fisiológico de las células bacterianas y el método usado para recobrarlas. Condiciones similares al shock térmico existen en el procesado de alimentos, el calentamiento ó cocinado lento, precalentamiento, agua caliente de lavado, proceso térmico suave, y mantenimiento de alimentos en bandejas térmicas son algunos ejemplos, también puede ocurrir durante la pasteurización de los productos lácteos en tina o en la producción de alimentos procesados refrigerados, ambos incluyen un largo tiempo de calentamiento ó enfriamiento ⁽⁴⁷⁾.

La naturaleza intracelular facultativa de este patógeno ha permitido a algunos investigadores especular que las células de, esta bacteria dentro de los leucocitos tal vez estén parcialmente protegidos de la inactivación térmica y así son más capaces de sobrevivir pasteurización que las células de la bacteria suspendidas libremente en la leche. Un brote en 1983 sugirió que este microorganismo puede sobrevivir pasteurización a alta temperatura por corto tiempo (HTST), subsecuentes estudios en células suspendidas libremente mostraron que este tipo de tratamiento térmico es adecuado; sin embargo, los resultados de investigaciones en resistencia de esta bacteria a nivel intracelular, estuvieron en conflicto, posteriormente, trabajos realizados por la FDA, CDC y la OMS sostienen que este tipo de pasteurización es un proceso seguro ⁽⁴⁷⁾.

La adaptación a condiciones ácidas puede incrementar la supervivencia de muchos microorganismos, incluyendo, cuando son expuestos a condiciones ácidas letales, esta también los protege marcadamente contra una variedad de factores perjudiciales tales como dosis letales de peróxido de hidrógeno, calor, NaCl, etanol, y ciertos compuestos hidrofóbicos surfactantes. Ya que la adaptación a condiciones ácidas incrementa la resistencia general, incluyendo tolerancia a los ácidos, no es sorprendente que células de

L. monocytogenes adaptadas a condiciones ácidas, así como *S. typhimurium* y *E. coli*, sobrevivan mejor en alimentos ácidos y fermentados que aquellos cultivos no adaptados. Aunque los ácidos orgánicos débiles y sus sales inhiben el crecimiento de *L. monocytogenes*, esos compuestos aumentan la virulencia de este patógeno ⁽⁴⁷⁾.

El tratamiento previo de un microorganismo afecta su comportamiento subsecuente, por ejemplo, el medio alimenticio. La supervivencia y crecimiento de *L. monocytogenes* a bajas temperaturas y en alimentos con alta presión osmótica, es estimulada por la presencia de ciertos solutos en el medio involucrados en la respuesta al shock osmótico, dichos solutos, tal vez estabilizan las diferentes funciones fisiológicas inestables de proteínas citoplasmáticas u otras estructuras bajo tales condiciones; estos compuestos incluyen glicina, betaina (trimetilglicina), carnitina (β -hidroxi- γ -N-trimetil-aminobutyrate), prolina y K^+ , siendo glicina la más efectiva y preferida, los cuales son conocidos como osmoprotectores, osmolitos o solutos compatibles y usualmente se acumulan en las células microbianas durante periodos de estrés osmótico. Dichos compuestos pueden existir en alimentos a niveles medibles, los de origen vegetal son ricos en betaina, mientras que los de origen animal contienen colina (el precursor de betaina) y carnitina ⁽⁴⁷⁾.

3.6.2 RESISTENCIA FRENTE ANTIMICROBIANOS

Los microorganismos deben su existencia ancestral a su habilidad para adaptarse a los cambios, se ha estimado que el último ancestro común de *S. typhi* existió hace 15,000-150,000 años, durante la fase del cazador humano y antes del desarrollo de la agricultura y la domesticación de animales ⁽³³⁾, sin embargo, una consecuencia desafortunada de este proceso, es el desarrollo de resistencia microbiana a los antibióticos, conservadores de alimentos y sanitizantes. Cuando una población de bacterias se enfrenta primero a un compuesto antimicrobiano, las células altamente susceptibles son eliminadas, pero las que ya poseen algún grado de resistencia, o adquieren ésta después (a través de mutación o cambio genético), tal vez sobrevivan y proliferen. El desarrollo de resistencia en patógenos provenientes de alimentos a agentes antimicrobianos es una preocupación porque son un problema global, facilitado por el comercio internacional de alimentos crudos y procesados, además hay inquietud acerca de el potencial de transferencia de organismos resistentes de

animales a humanos; también ha surgido resistencia múltiple entre bacterias tales como *Salmonella* ⁽¹¹⁾.

La resistencia microbiana propia a compuestos antimicrobianos puede ser conferida por características estructurales innatas de un microorganismo, tales como una membrana externa impermeable que resiste la penetración de antibióticos. Las bacterias Gram (-) tienen una capa gruesa de lipopolisacáridos que actúa como una barrera para limitar la difusión de moléculas de antimicrobiano hacia adentro de la célula, mientras que las bacterias Gram (+) característicamente tienen sustancias lipofílicas en su pared celular que retardan la penetración de compuestos antimicrobianos hidrofílicos o catiónicos. Además de las barreras, los microorganismos pueden poseer una variedad de otros mecanismos, por ejemplo, el organismo tal vez carece de un sistema de transporte necesario para la introducción completa o esta ausente el objeto bioquímico requerido para la fijación y apropiado funcionamiento de el compuesto antimicrobiano, o a través de la producción de un inactivador por un microorganismo susceptible distinto, al respecto, se ha encontrado que cepas de bacterias Gram(+) y Gram(-) contienen enzimas capaces de desactivar penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos; otro método involucra el flujo activo de un compuesto antimicrobiano de el citoplasma bacteriano, en este proceso, la bacteria resistente sintetiza una proteína integral de la membrana que impulsa la sustancia hacia afuera de la célula, antes de que ésta tenga la oportunidad de encontrar su objetivo intracelular⁽⁶⁾.

Aún cuando una especie de microorganismo es inicialmente sensible a un agente antimicrobiano, esta podría adquirir resistencia a través de mutación espontánea o a través de adquisición de material genético de una bacteria resistente por transferencia de genes. Dada la rápida adaptación de las bacterias a nuevos ambientes, esto sugiere que la mayoría de los cambios genéticos ocurre a través de otros procesos ⁽⁶⁾.

En un estudio reciente realizado por Kiessling et al., (2002), los cultivos de *Salmonella* aislados por los laboratorios de la FDA de productos alimenticios domésticos e importados, fueron probadas para resistencia a antibióticos, aproximadamente 49% de los aislados fueron resistentes a uno o más antibióticos y 10.1% fueron resistentes a tres o más. La resistencia de esta bacteria a agentes antimicrobianos es asociada con recombinación y

transferencia de genes de resistencia, esto no solo es real para antibióticos, sino para otros agentes antimicrobianos también; el mar operon, localizado en los cromosomas de Enterobacteriaceae, es un mecanismo intrínseco de resistencia antimicrobiana, la posición del mar es diseminado entre bacterias entéricas, incluyendo *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Hafnia*, y *Enterobacter*, y regula la expresión de más de 60 genes cromosomales⁽⁴³⁾.

Como en el caso de los antibióticos usados para tratamiento, las bacterias pueden desarrollar resistencia a compuestos antimicrobianos usados para sanitización, los más usados para propósitos veterinarios son formaldehído, iodo, compuestos con cloro y sulfato de cobre. En la industria de alimentos los más comúnmente usados son compuestos clorados, ácidos y alcoholes, la resistencia a compuestos de amonio cuaternario es bien conocida y diversos genes de resistencia han sido identificados en especies bacterianas Gram (+) y Gram(-). Además, varios reportes (Levy 2001, Russell 2001), han expresado que el uso de conservadores y sanitizantes puede contribuir al desarrollo de resistencia a antibióticos en las bacterias. Diferentes bacterias aisladas fueron probadas para su susceptibilidad a sulfato de cobre, cloruro de benzalkonio, peróxido de hidrógeno y cloroóxido, siendo los aislados de *Salmonella*, menos susceptibles que los demás aislados, esto podría implicar que *Salmonella* tendría una ventaja sobre esas especies bacterianas en un ambiente donde son usados esos compuestos; puesto que *Salmonella* es una bacteria zoonótica importante, esto podría conducir potencialmente a problemas de salud humana⁽¹⁾.

Aunque los sanitizantes son desarrollados para destruir microbios, estos han sido encontrados en soluciones de varios compuestos⁽⁶²⁾. Pueden surgir fácilmente buenas condiciones de adaptación debido a procedimientos inadecuados en las plantas de procesado, por ejemplo, limpieza insuficiente, enjuagado inadecuado después de ésta o concentraciones sub-letales del sanitizante⁽²⁾.

3.6.3 RESISTENCIA CONFERIDA POR BIOFILMS

La resistencia también puede ser conferida por la formación de biofilms en las superficies de procesado de alimentos como una respuesta de adaptación para proteger colonias de la limpieza y sanitización⁽⁶⁾.

La adaptación genética es la piedra angular de la salud y supervivencia y puede resultar de mutaciones y recombinación dentro de los genes, la adquisición de nuevo material genético, o de la expresión regulada de material genético existente; la flexibilidad en la expresión de genes de bacterias permite sobrevivir en ambientes con condiciones cambiando rápidamente, y siendo estas particularmente adaptables, han crecido en casi todo nicho ambiental en nuestro planeta. Un ejemplo importante de la adaptación bacteriana a través de expresión sistematizada de genes, es la habilidad de crecer como parte de una comunidad envuelta con exopolisacárido referida como un biofilm. La idea que las bacterias a menudo existen dentro de la naturaleza como biofilms más que como células individuales flotando libremente fue dada dentro de amplia aceptación por las ideas del Dr. J. William Costerton; el interés científico en el proceso de la formación de estos ha surgido en años recientes y los estudios de genética molecular a este respecto han comenzado a descubrir las fuerzas que conducen la transición al modo de existencia como biofilm ⁽³⁰⁾.

Biofilm, biopelícula o biofouling son términos referidos a adhesión biológica y crecimiento en superficies, son definidos como una población bacteriana encerrada en una matriz, adheridos a una superficie, la cual protege estos organismos fijados; consiste en los microorganismos y sus sustancias poliméricas extracelulares (EPS), usualmente polisacáridos, en asociación con una superficie sólida. El propósito de su formación es proteger los microbios de ambientes hostiles y actuar como una trampa para los nutrientes ^(36,58). De acuerdo con otros autores, es un consorcio funcional de microorganismos adheridos a una superficie y embebidos en EPS producidos por el microorganismo ⁽²²⁾.

En la naturaleza y en los sistemas de alimentos, los microorganismos son atraídos a superficies sólidas acondicionadas con nutrientes, esto es suficiente para su viabilidad y crecimiento, dichos microorganismos son depositados en las superficies y más tarde son adheridos, crecen y se multiplican activamente para formar colonias de células; en este aspecto, la formación de polímeros orgánicos es esencial para la apropiada colonización. Esta masa de células, más tarde se vuelve suficientemente grande para atrapar escombros orgánicos e inorgánicos, nutrientes y otros microorganismos permitiendo la formación de un biofilm microbiano ⁽²²⁾.

Se ha documentado que los microorganismos que colonizan las superficies como parte de una matriz de biofilm exhiben mayor resistencia a compuestos antimicrobianos, que células individuales duplicadas en suspensión, esto ha sido observado en superficies que contactan con los alimentos, implantes médicos e incluso lentes de contacto y es atribuido en parte a la lenta difusión de los antimicrobianos a través de la matriz de biofilm⁽⁶⁾. La formación de biofilms causa problemas en muchas industrias, son de particular interés en sistemas de distribución de agua de desecho, y en procesos de industrias de alimentos, a menudo son encontrados en grietas, esquinas, juntas, uniones y rajaduras o en las terminaciones muertas en los sistemas de tuberías, por esto, la limpieza y sanitización son importantes para evitar la acumulación de microorganismos; los que son formados dentro de las tuberías, pueden provocar una reducción del flujo a través de ellas, disminuir la transmisión de calor, contaminar el producto y corroer las líneas debido a la producción de ácido por los microorganismos, además, cuando un biofilm se desprende de una superficie, los microorganismos individuales son diseminados fácilmente⁽⁶⁹⁾.

Los microbios pueden ser divididos en dos grupos de acuerdo a su fase de crecimiento: suspendidas libremente (planktonic) o fijadas (sessile). En el estado libre, los microbios viven como organismos individuales flotando libremente mientras que en la fase fijada, ellos están adheridos a una superficie, funcionando como una comunidad integrada y encerrada. Los microorganismos prefieren vivir como organismos fijados porque ellos serán protegidos de agentes antimicrobianos⁽⁶⁸⁾, la formación de un biofilm ocurre virtualmente en cualquier superficie sumergida en cualquier ambiente en donde la bacteria esta presente, y los nutrientes son abundantes⁽²²⁾, es un fenómeno que ocurre tanto en ambientes naturales como en los creados por el hombre⁽¹⁷⁾ y pueden ser formados por todo tipo de microorganismos, incluyendo alterantes y patógenos, bajo condiciones satisfactorias⁽⁶⁸⁾.

Antes de la colonización bacteriana la superficie se acondiciona o prepara absorbiendo moléculas orgánicas⁽¹⁷⁾, éstas y los microorganismos son transportados a la superficie por difusión o en algunos casos por un flujo turbulento de líquido. La acumulación de moléculas en la interfase sólido-líquido en superficies que contactan con alimentos (comúnmente referidos como film de acondicionamiento) conduce a concentraciones más altas de nutrientes comparadas con la fase fluida. La transferencia de nutrientes es también

más rápida en un biofilm que para las células bacterianas en fase acuosa. Este incremento en el nivel de nutrientes favorece la formación de biofilm y es también dependiente de el tipo de cultivos competitivos asociados con el biofilm ^(22,58).

El acondicionamiento altera las propiedades fisico-químicas de la superficie tales como energía libre de superficie, cambios en hidrofobicidad y cargas electrostáticas las cuales pueden afectar. En 1971 Meadows mostró que la albúmina es Inhibitoria de algunos microorganismos mientras que la caseína y la gelatina favorece el proceso de adhesión; en la presencia de proteínas del suero, fue observado según Speers and Gilmour (1985), un incremento en la adhesión de diversos microorganismos asociados con leche a superficies de acero inoxidable, caucho y vidrio; posteriormente, Al-Makhlafi et al., (1995), encontró que la albúmina favorece la adhesión de *L. monocytogenes* a superficies de sílica ^(22,58).

El segundo paso en la formación de biofilms es la adhesión de microorganismos a la superficie acondicionada, este proceso puede ser activo o pasivo y depende de la motilidad o de la transportación de células libres por gravedad y difusión o fuerzas dinámicas de la fase fluida circundante. Las propiedades fisicoquímicas de la superficie de la célula bacteriana son importantes en la determinación de la adhesión de células durante ésta fase inicial de fijación; esta adhesión se lleva a cabo principalmente en dos etapas: una reversible seguida por una irreversible ⁽²²⁾.

Los microorganismos se adhieren a las superficies gracias a su capa más externa, el glicocálix, su principal rol es el proteger a las bacterias adheridas frente a los agentes antibacterianos pero también juega cierto papel en la captura de otras especies bacterianas que forman una segunda capa de microorganismos ⁽¹⁷⁾. Además, durante el complejo proceso de adhesión, los microorganismos alteran sus fenotipos en respuesta a la proximidad de la superficie ⁽⁵⁸⁾.

Inmediatamente después de la fijación inicial de la bacteria a la superficie sólida, comienzan a ocurrir cambios en la regulación de genes, esto sugiere que las células perciben la superficie sólida a la cual ellas están adheridas y que este sistema sensor provoca una cascada de señales que pueden llevar a los primeros patrones de expresión de

genes necesaria para la formación de biofilms; similar a las células eucariotas, las células bacterianas poseen sistemas sensores de superficie que inducen señales intracelulares suficientemente intensas para provocar cambios transcripcionales y morfológicos; los cambios en la osmolaridad percibida causada por cargas en superficies sólidas puede ser una señal importante para la bacteria para reconocer superficies⁽³⁰⁾.

Una vez que los biofilms son establecidos, son suprimidas la expresión de un número de adhesinas y factores de motilidad, por lo cual, el rol principal de las adhesinas, pilis y flagelos es la fijación inicial. Cuando las fuentes de nutrientes son agotadas, la bacteria se separa y se vuelve a suspender en el medio circundante, sugiriendo que la privación de nutrientes es lo que provoca que esta se mueva en busca de un mejor hábitat. Los biofilms microbianos son caracterizados en parte por la producción de una extensiva red de exopolisacáridos (EPS), muy hidratados, según Costerton et al., (1995), su producción tiene varias funciones, además de la captura de nutrientes, estas incluyen: facilitación de la adhesión inicial de la bacteria a la superficie; formación y mantenimiento de microcolonias y estructura del biofilm; y resistencia incrementada del biofilm a los estrés ambientales y agentes antimicrobianos. Los polisacáridos y las fimbrias en las paredes celulares de los microorganismos pueden formar un puente entre la célula y la superficie que está siendo colonizada, la matriz de EPS cambia la carga y la energía libre en la superficie⁽⁵⁸⁾.

Para formar un exitoso biofilm los microorganismos fijados tienen que desarrollar los sistemas de descomposición para materia orgánica compleja, los sistemas de desdoblamiento o desglose son a menudo una colaboración entre diversas especies diferentes. Según Costerton et al., (1995), la distribución de las células vivientes, sus agregados celulares, sus polímeros extracelulares y sus canales de agua varían constantemente, la arquitectura es especie-específica para cultivos simples y substrato-específica para multi-cultivos; en biofilms heterogéneos la arquitectura es a menudo irregular, lo cual es una consecuencia de los diferente patrones de crecimiento y adherencia de los microorganismos⁽⁵⁸⁾. Las especies de la colonización inicial pueden estimular potencialmente la colonización de especies que sean fisiológicamente compatibles, mientras inhiben la adhesión de otras. Los biofilms formados por mezcla de especies son a menudo mas gruesos y mas estables que los monoespecies⁽²²⁾.

Las interacciones débiles iniciales desarrolladas entre las células bacterianas y el sustrato son referidas como adhesión reversible, las fuerzas de interacción que influyen son las fuerzas de atracción de Van der Waals, fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas. La adhesión irreversible de células es el paso próximo crucial en el desarrollo de un biofilm, las fuerzas repulsivas principalmente previenen a las células bacterianas en la preparación de un contacto directo con la superficie, sin embargo el contacto ocurre debido a la producción de accesos de superficie por la bacteria tales como flagelos, fimbrias, pili y los exopolisacáridos. En la adhesión irreversible varias fuerzas involucradas incluyen, interacciones dipolo-dipolo, enlaces hidrógeno, iónicos y covalentes e interacciones hidrofóbicas. Los polímeros forman un puente entre la célula bacteriana y el sustrato y esto permite la asociación irreversible con la superficie, en este proceso, la remoción de las células requiere fuerzas más poderosas o drásticas tales como fregado o raspado ⁽²²⁾.

Los microorganismos dentro de un biofilm no están uniformemente distribuidos, ellos crecen en microcolonias encerradas en la matriz esparcidas dentro de canales altamente permeables al agua ⁽⁶²⁾. Se ha encontrado que las células fijadas profundamente en un biofilm reciben menos oxígeno y menos nutrientes que las células en suspensión, en respuesta a esta condición de hambre, algunas células enterradas exhiben una fisiología alterada, incluyendo una disminución significativa en el ritmo de crecimiento, haciéndolas más resistentes a los agentes antimicrobianos ⁽⁶⁾.

Avances recientes en la tecnología han permitido visualizar la heterogeneidad de los biofilms; ésta ha sido mostrada mediante síntesis de proteínas y actividad respiratoria, mientras contenido de DNA permanece relativamente constante, también por métodos de tinción para identificar regiones de biofilms que contenían células creciendo rápida y lentamente basado en su contenido relativo de DNA-RNA. Recientemente se ha sugerido, que el ritmo de crecimiento lento de algunas células no es únicamente debido a la limitación de nutrientes, se debe además a una respuesta general de estrés iniciada por el crecimiento dentro de un biofilm, provocando cambios fisiológicos que actúan para proteger la célula de varios estrés ambientales. El regulador central de esta respuesta es el factor sigma σ factor RpoS, originalmente se pensó que es expresado solo en fase estacionaria, no obstante, estudios recientes sugieren que este factor es inducido por una densidad de células alta y que las

células creciendo a esas densidades altas parecen haber experimentado la respuesta general de estrés⁽³⁶⁾.

Se ha encontrado que las limitaciones de difusión impartidas por la estructura de biofilm provocan variaciones locales de disponibilidad de nutrientes, pH, y tensión de oxígeno, por lo que las bacterias dentro son heterogéneas con respecto a la expresión de genes; los miembros de biofilms mixtos tienen requerimientos diferentes y desarrollan funciones metabólicas distintas haciendo comensalismo, la heterogeneidad dentro de biofilms puede dar como resultado una división de tipos de labores e incrementar la eficiencia metabólica de la población como un conjunto. Se cree que tal división de labor es regulada coordinadamente a través de comunicación intercelular, las señales autoinductoras son moléculas pequeñas, generalmente homoserine lactones en Gram (-) y péptidos en Gram (+), que son liberados por las bacterias y los cuales cuando se presentan en una concentración crítica, van a inducir la expresión de ciertos genes; ha sido sugerido que el biológicamente más significativo de las señales de autoinducción es transmitir información a la célula bacteriana acerca de los ritmos de difusión locales. Un ejemplo es la secreción de una proteasa requerida para degradar proteínas exógenas que se induce al haber una difusión reducida, permitiéndole esto beneficiar a la bacteria al poder disponer de aminoácidos en sus inmediaciones, situación que no se presenta en condiciones de alta difusión⁽³⁰⁾.

La evidencia experimental de modelado matemático sostiene que la bacteria puede exhibir comportamiento altruista o desinteresado, mientras esto puede parecer que desafía las reglas de supervivencia del más capacitado, los modelos indican que el comportamiento no egoísta en habitantes de un biofilm puede incrementar el rendimiento de crecimiento global. Se ha sugerido que la muerte programada de células puede ocurrir dentro de una comunidad de biofilm, una racionalización de comportamiento altruista en bacterias es que ésta reduce la carga metabólica e incrementa la disponibilidad de nutrientes para los sobrevivientes⁽³⁰⁾.

Ha sido mostrado que los microorganismos adheridos al sustrato y crecidos dentro de un biofilm son más resistentes a los antibióticos y sanitizantes, que las células

suspendidas libremente, ésta depende de su actividad metabólica, la condición de la matriz de EPS, el sustrato y las condiciones de crecimiento e incrementa con la edad del biofilm por esto es importante eliminar su formación rápidamente. Los microorganismos creciendo en un biofilm se rodean ellos mismos con sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y de una estructura multicelular compleja ⁽⁵²⁾.

La resistencia a los biocidas puede ocurrir cuando una célula desarrolla permeabilidad reducida (tal como una capa exterior de mucopolisacárido dentro de un biofilm), hay alguna evidencia que la adquisición de un plásmido pudiera ser responsable de los cambios en la envoltura celular lo cual da subsecuentemente a la bacteria menos susceptibilidad a los antimicrobianos; en una investigación se observaron cambios en la composición lipídica de la membrana de *L. monocytogenes* que confieren resistencia a antimicrobianos previamente efectivos, para este caso, fue sugerida una presunta estructura lipídica alterada de diferentes proporciones de ácidos grasos como la causa de incrementos observados en resistencia a conservadores tipo parabenos; el material capsular podría también facilitar la adsorción de agentes antimicrobianos, previniendo así su penetración al citoplasma. Por lo tanto, podría ser esperado que un biofilm donde el material capsular es un componente integral, proporcione células con protección contra sanitizantes ⁽⁶⁾. Cuando las células existen en un biofilm, se pueden volver 10-1000 veces más resistentes a los efectos de agentes antimicrobianos ^(17,38); las bacterias adheridas no sólo presentan mayor resistencia a los biocidas, también muestran una mayor resistencia al termotratamiento ⁽¹⁷⁾.

Es difícil remover los biofilms por limpieza normal, además de proteger a los microorganismos de agentes sanitizantes, a menudo sirven como una fuente de recontaminación para los alimentos procesados ⁽⁶¹⁾. Cuando un cultivo celular bacteriano comienza a carecer de un nutriente particular, esto reduce su crecimiento, la transición de crecimiento exponencial a lento es generalmente acompañada por un incremento en la resistencia a antimicrobianos, esto ha sido observado en biofilms maduros. Debido a que las células creciendo en biofilms están expuestas a experimentar alguna forma de limitación de nutrientes, ha sido sugerido que este cambio fisiológico puede explicar su resistencia a los agentes antimicrobianos. Otros determinantes diferentes al ritmo de crecimiento son responsables de un cierto nivel de resistencia, trabajos recientes han indicado que la

inducción de una respuesta de estrés rpoS - transmitido podría contribuir a la resistencia a los antimicrobianos. Finalmente las bacterias crecidas en biofilms podrían desarrollar un fenotipo biocida-resistente específico para el biofilm; debido a la naturaleza heterogénea de este, es probable que haya mecanismos de resistencia múltiple trabajando dentro de uno solo. Investigaciones recientes han comenzado a aclarar cómo y por qué las comunidades microbianas adheridas a superficies desarrollan resistencia a agentes antimicrobianos ⁽³⁶⁾.

Métodos en microscopía para el estudio de biofilms:

- Microscopio electrónico de barrido.
- Microscopio epifluorescente.
- Microscopio de fuerza atómica.
- Microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM), para la cuantificación.
- Confocal scanning laser microscopy (CSLM), para obtener información con profundidad-selectiva de la estructura tridimensional en un biofilm.
- Método copia-reproducción usando un material de impresión de polivinil siloxane hidrofílico.
- Modelos de automatización celular ^(22,52).

Hay algunas limitaciones que surgen durante el muestreo de biofilms, las ranuras, grietas terminaciones muertas, partes de corrosión, etc., son algunas de las áreas donde los biofilms pueden crecer y son difíciles de acceder, de este modo, el muestreo de tales áreas se convierte mas difícil. Además, algunas de las bacterias en biofilms en las superficies en alimentos y ambientes lácteos están sujetas a varios estrés tales como hambre, químicos, calor, frío y desecación las cuales dañan a la célula y las hacen no cultivables, sin embargo en una revisión reciente, *S. typhimurium* viable pero no cultivable expuesta a tratamiento con cloro fue enumerada satisfactoriamente mediante el empleo del procedimiento direct viable count (DVC) en combinación con una técnica de anticuerpo fluorescente indirecto ^(22,52).

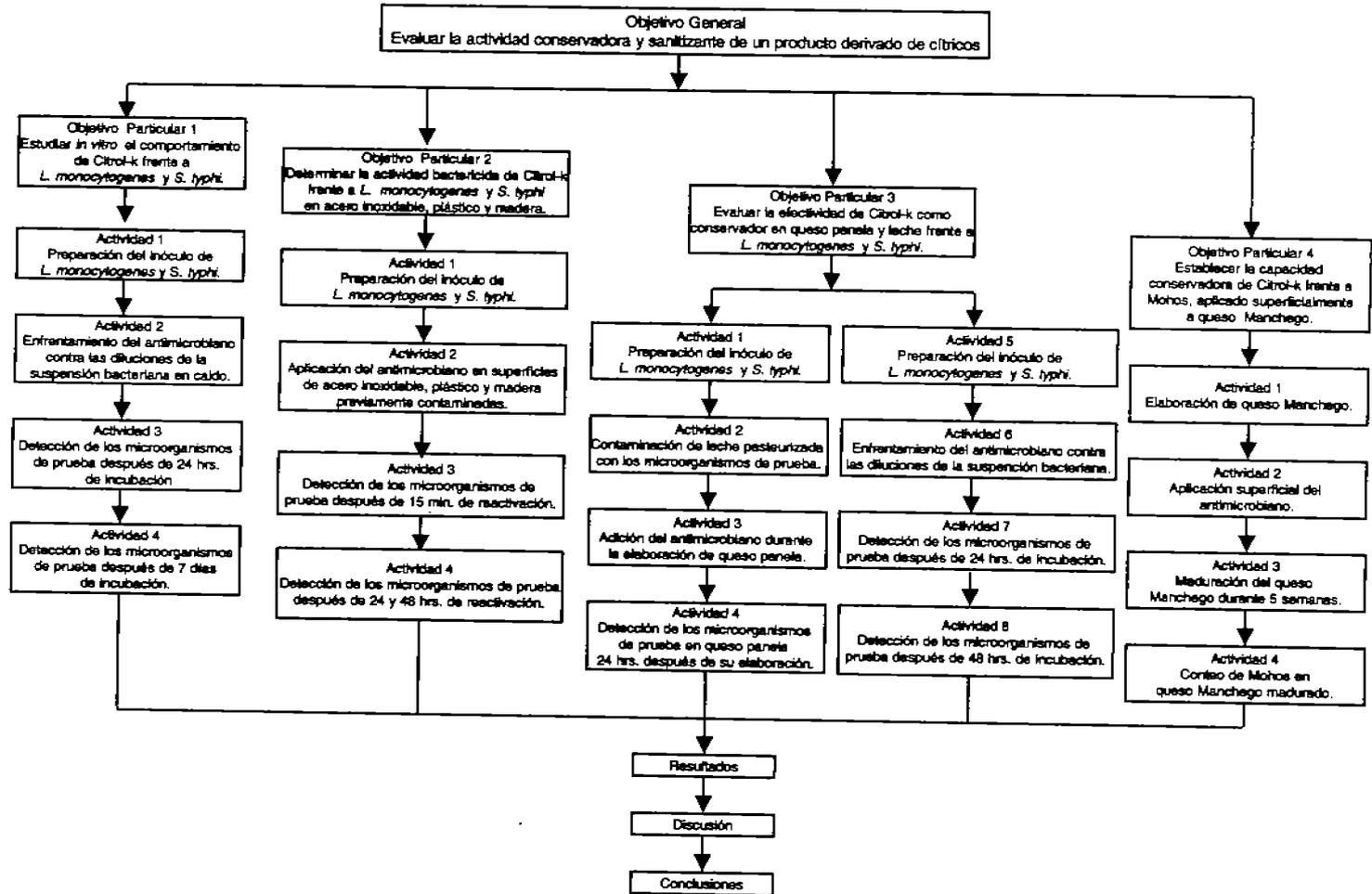
El serio y penetrante impacto de los biofilms bacterianos ha inspirado a muchos científicos a investigar los mecanismos regulatorios detrás de su formación y disolución. Un número de genes dirigidos así como estudios basados en proteomica y genómica global han

permitido la identificación de genes asociados con su desarrollo, sin embargo, separar los roles de todos estos genes es una prueba compleja⁽³⁰⁾.

Por investigaciones realizadas con diversas cepas de *L. monocytogenes*, se sabe que la estructura característica de los biofilms formados por este patógeno es en forma de "panal"; esta estructura es diferente a la elaborada por *Staphylococcus spp.* en forma de hongo, y es probablemente más similar a la de *Streptococcus mutans* en la cual se ha descrito una estructura en forma de esponja porosa⁽³⁷⁾. En una investigación, 13 de las cepas de esta bacteria fueron capaces de formar biofilms dentro de 24 horas⁽⁵²⁾. La temperatura y la humedad afectan la supervivencia de esta bacteria en superficies, se ha observado un incremento a 5-6 °C más que a 25°C y en cuanto a la humedad relativa, los resultados han variado⁽¹⁷⁾. Los residuos de materia orgánica en las superficies también afectan dicha supervivencia, por ejemplo los residuos de leche, la incrementan en acero inoxidable y caucho; sin embargo no sucede lo mismo con el suero de queso cottage como residuo⁽⁴⁷⁾. Algunos microorganismos como *Pseudomonas fragi* alteran la adhesión de *L. monocytogenes* a las superficies encontrándose en algunas investigaciones que la incrementa y en otras, que la minimiza^(22,47).

Frecuentemente se propone que el material orgánico principal reconocido por la bacteria es proteico, a este respecto, se cree que la modificación de la superficie con cadenas poliméricas hidratadas provee una barrera que minimiza o previene interacciones entre materia orgánica y bacterias, debido a esto, Wei et al., (2003) realizó una investigación, en la cual superficies de acero inoxidable fueron modificadas con una capa de polietilenglicol con el propósito de prevenir absorción de proteínas y adhesión bacteriana, el tratamiento aplicado en esta investigación fue capaz de prevenir adhesión de proteínas, pero no tuvo efecto en reducir la adhesión bacteriana, indicando que en la ausencia de una capa absorbida de proteínas, los microorganismos parecen ser oportunistas y usar otros mecanismos como medidas para colonizar superficies⁽⁶⁰⁾.

3. CUADRO METODOLOGICO.



5. METODOLOGÍA

5.1 CEPAS EMPLEADAS

Las cepas *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhi* fueron proporcionadas por el cepario del Laboratorio de Bacteriología ubicado la Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo No. 1, UNAM. Las cepas fueron subcultivadas en agar BHI (Infusión cerebro corazón, Difco) y agar SS (*Salmonella-Shigella*, Bloxón) respectivamente, por 24 horas a 37°C.

5.2 SUPERFICIES EMPLEADAS

Las superficies empleadas fueron de acero inoxidable, plástico y madera, con áreas de 16 cm². Antes de cada experimentación fueron lavadas, enjuagadas con agua potable, posteriormente fueron sumergidas en solución de cloro (100 ppm) durante 6 horas y nuevamente enjuagadas con agua potable; después se sometieron a una segunda inmersión en agua potable durante 6 horas (haciendo recambios de agua cada 2 h) y finalmente fueron esterilizadas en autoclave por 30 minutos a 121°C.

5.3 ANTIMICROBIANO EMPLEADO

El antimicrobiano empleado (Citrol-k) fue proporcionado por la empresa PL CORPORACIÓN, S.A. DE C.V.

5.4 PREPARACION DEL INÓCULO DE LOS MICROORGANISMOS DE PRUEBA.

Para la preparación del inóculo del microorganismo de prueba, se empleó un cultivo de *Listeria monocytogenes* o *Salmonella typhi* fresco para lo cual fueron sembradas en un tubo que contenía 5 ml de caldo (BHI) y se incubó en estufa a 37°C durante 24 horas. La concentración del inóculo fue determinada mediante un conteo en placas de agar BHI utilizando diluciones decimales con solución salina para *L. monocytogenes* y agar S.S. para *S. typhi*, las placas fueron incubadas a 37°C. Se obtuvieron las medias de los conteos (X) y se aplicó el análisis de varianza para obtener la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).

5.5 COMPORTAMIENTO *in vitro* DE CITROL-K FRENTE A *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhi*.

Se enfrentaron cinco concentraciones del antimicrobiano (0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.0025 %) contra seis diluciones de los microorganismo de prueba, por separado (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000) en volúmenes de 4 ml de caldo BHI, y el control formado por caldo inoculado con el microorganismo de prueba sin antimicrobiano (como se muestra en la Tabla 3), se incubaron en estufa durante un periodo de 7 días en caldo BHI a una temperatura de 37°C (para favorecer la reactivación de aquellas bacterias que hubieran sido solamente lesionadas por el producto). Se tomaron muestras de 50 µl a las 24 horas y 7 días para enumerar las células cultivables en placas con agar BHI y SS respectivamente; el experimento tuvo 5 repeticiones en eventos independientes y los resultados fueron obtenidos por triplicado después de 48 horas de incubación a 37°C.

Tabla 3. EFECTO INHIBITORIO DEL ANTIMICROBIANO EN CALDO

Dilución Bacteriana	[%] Antimicrobiano					
	[0.04]	[0.02]	[0.01]	[0.005]	[0.0025]	control
10 ⁻¹						
10 ⁻²						
10 ⁻³						
10 ⁻⁴						
10 ⁻⁵						
10 ⁻⁶						

5.6 ACTIVIDAD BACTERICIDA DE CITROL-K FRENTE A *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhi* EN ACERO INOXIDABLE, PLÁSTICO Y MADERA.

Para la presente actividad se prepararon los inóculos de los microorganismos de prueba de la misma manera ya descrita en el punto 5.4.

Se usaron inóculos de 100µl de *L. monocytogenes* ó *S. typhi* en caldo BHI, para contaminar las diferentes superficies: acero inoxidable, plástico y madera, se dejaron secar 1 hora; posteriormente se agregaron las soluciones (1 ml para acero inoxidable ó plástico y 3 ml para madera) con las diferentes concentraciones del antimicrobiano (1.0, 0.5, 0.1, 0.07, 0.04%) y sus respectivos controles (positivo: superficie contaminada a la cual se le agregó agua estéril y negativo: superficie estéril), dejándolas actuar por el tiempo que recomienda el fabricante (15 minutos). Posteriormente fue retirado el sobrante de solución con antimicrobiano por decantado y se realizó una inmersión de la superficie en 100 ml de caldo BHI contenidos en bolsa ziploc, del cual se tomaron muestras de 50µl para detectar las células viables del microorganismo de prueba sembrándolas en placas con agar BHI para *L. monocytogenes* y agar SS para *Salmonella typhi* previamente reactivadas 15 minutos a

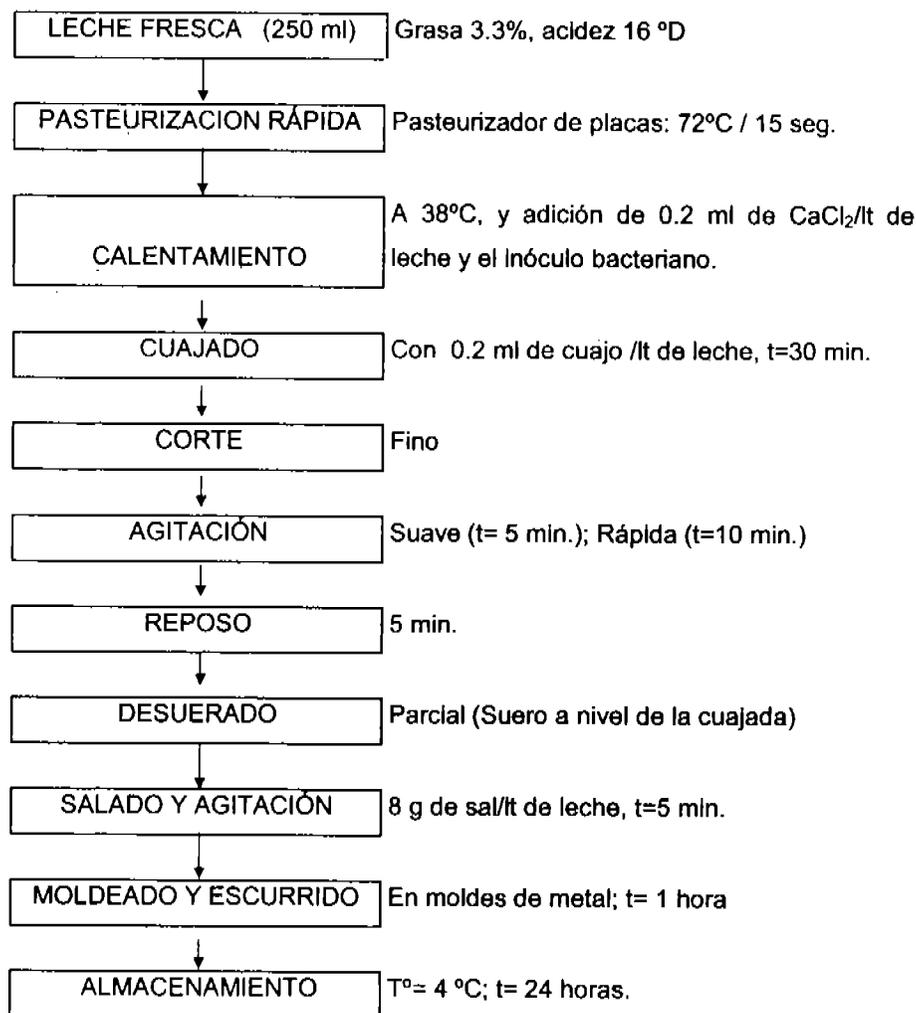
temperatura ambiente y después de 24 y 48 horas de incubación en estufa a 37°C (para favorecer la reactivación de aquellas bacterias que se hubieran lesionado por el producto). El experimento fue desarrollado cinco veces en eventos independientes y los resultados fueron obtenidos por triplicado después de 48 horas de incubación a 37°C.

5.7 EFECTIVIDAD DE CITROL-K COMO CONSERVADOR EN QUESO PANELA FRENTE A *L. monocytogenes* y *S. typhi*.

La preparación del los inóculos de los microorganismos de prueba se realizó como se indicó anteriormente en el punto 5.4.

Se elaboraron 36 quesos panela como se muestra en el Diagrama 1, agregando después de la pasteurización un inóculo con una concentración conocida de bacteria; se emplearon 5 concentraciones del antimicrobiano (1.0, 0.50, 0.10, 0.04, 0.02%), el cual fue adicionado antes del cuajado (experimento 1) o antes del salado (experimento 2), los quesos control solo fueron contaminados con la bacteria de prueba, y no se les adicionó el antimicrobiano. Los quesos obtenidos se refrigeraron durante 24 hrs, transcurrido este tiempo, se realizó la detección del microorganismo de prueba, para lo cual se agregaron 25 gr de muestra en 225 ml de solución salina, de esta se tomaron 50 µl para sembrarlos en placas con agar BHI en el caso de *L. monocytogenes* y en placas con agar SS para *S. typhi*, en ambos casos, las placas se incubaron en estufa a 37°C por 48 horas. Los 2 experimentos tuvieron 3 repeticiones y los resultados fueron obtenidos por triplicado.

Diagrama 1. ELABORACIÓN DE QUESO PANELA



5.8 COMPORTAMIENTO DE CITROL-K FRENTE A *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhi* EN LECHE.

Se prepararon los inóculos de los microorganismos de prueba de la misma manera ya descrita en el punto 5.4.

EFFECTO INHIBITORIO DEL ANTIMICROBIANO EN LECHE

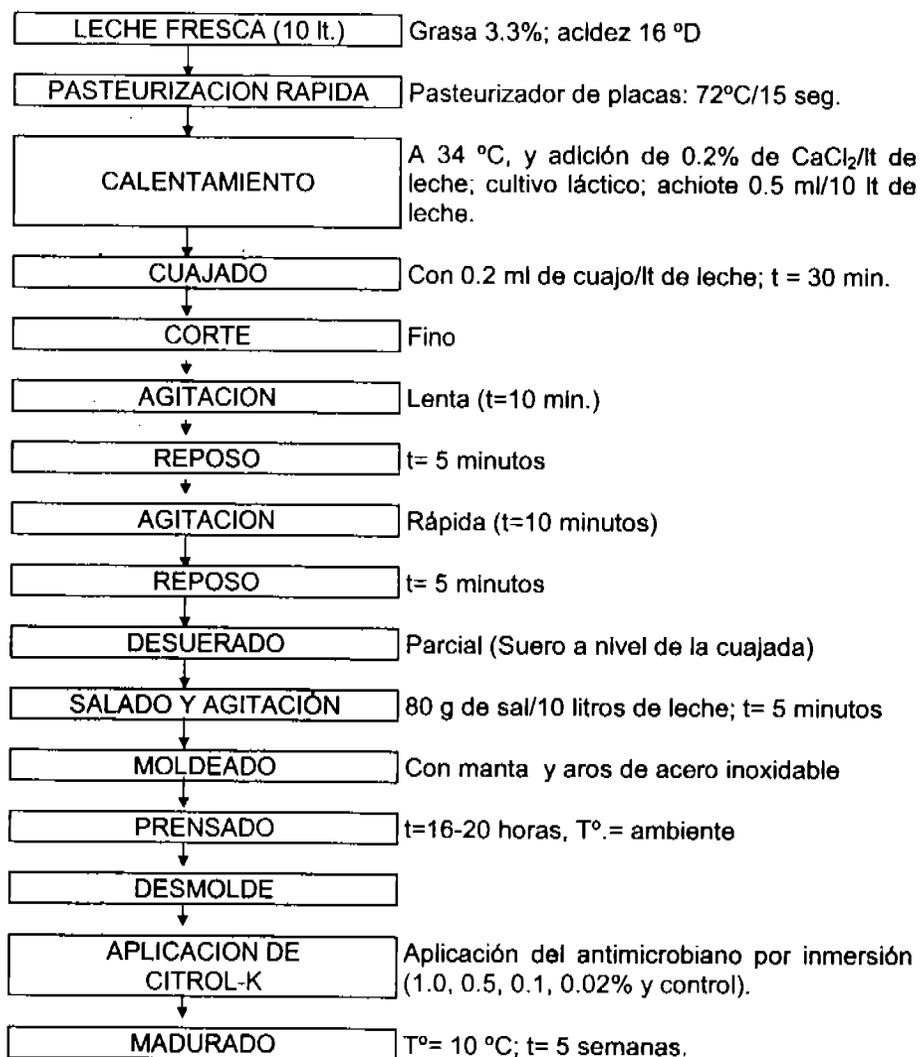
Se enfrentaron cinco concentraciones de Citrol-k (1.0, 0.50, 0.10, 0.04, 0.02%) y el control (leche pasteurizada inoculada con el microorganismo de prueba, sin antimicrobiano) contra seis diluciones de *Listeria monocytogenes* o *Salmonella typhi* en volúmenes de 4 ml de leche pasteurizada, como se muestra en la Tabla 3; se incubaron en estufa durante 24 horas a una temperatura de 37°C (para favorecer la reactivación de aquellas bacterias que hubieran sido lesionadas por el producto). Se tomaron muestras de 50 µl después de 24 y 48 horas para detectar las células viables sembrándolas en placas con agar BHI y agar SS respectivamente. El experimento fue desarrollado cinco veces en eventos independientes y los resultados fueron obtenidos por triplicado después de 48 horas de incubación a 37°C.

5.9 CAPACIDAD CONSERVADORA DE CITROL-K FRENTE A MOHOS APLICADO SUPERFICIALMENTE A QUESO MANCHEGO.

INHIBICION DE MOHOS EN SUPERFICIES DE QUESO MANCHEGO

Se elaboraron 25 quesos manchego, siguiendo los pasos que se presentan en el Diagrama 2; después de la etapa del prensado y de haberle retirado el molde y la tela, les fueron aplicadas las soluciones con diferentes concentraciones de Citrol-k por inmersión (1.0, 0.50, 0.10, 0.02%) y el control (queso manchego el cual no fue sumergido en solución con antimicrobiano), los quesos fueron almacenados en una cámara de maduración por 5 semanas a una Temperatura de 15 °C, y se les realizaron conteos de Mohos siguiendo la metodología de la norma oficial mexicana (NOM-111-SSA1-1994). El experimento fue desarrollado cinco veces en eventos independientes, y los resultados fueron obtenidos por triplicado.

Diagrama 2. ELABORACIÓN DE QUESO MANCHEGO



6. RESULTADOS

6.1 COMPORTAMIENTO *In vitro* DE CITROL-K FRENTE A *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhi*.

La media de la concentración inicial de los inóculos de *L. monocytogenes* fue de 2.5×10^{11} ufc/ml y el de *S. typhi* fue de 3.09×10^{10} ufc/ml, obtenidos del promedio de 5 repeticiones, (Tabla 4). Después de poner en contacto las diferentes concentraciones de *Listeria monocytogenes* o *Salmonella typhi* y del antimicrobiano durante 24 horas en caldo, se obtuvo *in vitro* una MIC de 0.005 y 0.01 % respectivamente donde éste inhibió el 100% del inóculo bacteriano inicial, las concentraciones empleadas del antimicrobiano fueron establecidas en base a las recomendadas por el fabricante y tuvieron que ser empleadas 3 más para poder encontrar las MIC; los datos que se muestran en las Tablas 5 y 7, son el resultado del desarrollo de 5 experimentos, obtenidos por triplicado. Después de 7 días de incubación, los resultados del efecto inhibitorio del antimicrobiano frente a *L. monocytogenes* o *Salmonella typhi* no variaron respecto a los obtenidos con 24 horas de contacto (Tablas 6 y 8). De las cinco repeticiones que se llevaron a cabo, no hubo ninguna variación en cuanto a los resultados obtenidos para los dos microorganismos de prueba.

Tabla 4. PREPARACIÓN DEL INOCULO DE *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhi*.

No. Repetición	<i>Listeria monocytogenes</i> Inóculo (ufc/ml)	<i>Salmonella typhi</i> Inóculo (ufc/ml)
1	2.33×10^{11}	3.00×10^{10}
2	2.40×10^{11}	3.20×10^{10}
3	2.80×10^{11}	3.40×10^{10}
4	2.60×10^{11}	3.00×10^{10}
5	2.40×10^{11}	2.86×10^{10}
X	2.50×10^{11}	3.09×10^{10}
S	1.72×10^{10}	1.86×10^9
C.V	6.88	6.039

Tabla 5. EFECTO INHIBITORIO DE CITROL-K EN CALDO FRENTE A *Listeria monocytogenes* CON UN TIEMPO DE CONTACTO DE 24 hrs.

[] Bacteriana	[%] antimicrobiano					
	[0.04]	[0.02]	[0.01]	[0.005]	[0.0025]	control
10^{-1}	-	-	-	-	+	+
10^{-2}	-	-	-	-	+	+
10^{-3}	-	-	-	-	+	+
10^{-4}	-	-	-	-	+	+
10^{-5}	-	-	-	-	-	+
10^{-6}	-	-	-	-	-	+

Tabla 6. EFECTO INHIBITORIO DE CITROL-K FRENTE A *Listeria monocytogenes* CON UN TIEMPO DE CONTACTO DE 7 DÍAS.

[] Bacteriana	[%] antimicrobiano					
	[0.04]	[0.02]	[0.01]	[0.005]	[0.0025]	control
10^{-1}	-	-	-	-	+	+
10^{-2}	-	-	-	-	+	+
10^{-3}	-	-	-	-	+	+
10^{-4}	-	-	-	-	+	+
10^{-5}	-	-	-	-	-	+
10^{-6}	-	-	-	-	-	+

Tabla 7. EFECTO INHIBITORIO DE CITROL-K EN CALDO FRENTE A *Salmonella typhi* CON UN TIEMPO DE CONTACTO DE 24 hrs.

[] Bacteriana	[%] antimicrobiano					
	[0.04]	[0.02]	[0.01]	[0.005]	[0.0025]	control
10^{-1}	-	-	-	+	+	+
10^{-2}	-	-	-	-	+	+
10^{-3}	-	-	-	-	+	+
10^{-4}	-	-	-	-	+	+
10^{-5}	-	-	-	-	+	+
10^{-6}	-	-	-	-	+	+

Tabla 8. EFECTO INHIBITORIO DE CITROL-K EN CALDO FRENTE A *Salmonella typhi* CON UN TIEMPO DE CONTACTO DE 7 DÍAS.

[] Bacteriana	[%] antimicrobiano					
	[0.04]	[0.02]	[0.01]	[0.005]	[0.0025]	control
10^{-1}	-	-	-	+	+	+
10^{-2}	-	-	-	-	+	+
10^{-3}	-	-	-	-	+	+
10^{-4}	-	-	-	-	+	+
10^{-5}	-	-	-	-	+	+
10^{-6}	-	-	-	-	+	+

6.2 ACTIVIDAD BACTERICIDA DE CITROL-K FRENTE A *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhi* EN ACERO INOXIDABLE, PLÁSTICO Y MADERA.

La concentración inicial para esta etapa de los inóculos de *L. monocytogenes* y *Salmonella typhi* obtenidos del promedio de 5 repeticiones fue de 2.74×10^8 ufc/ml y 3.25×10^8 ufc/ml respectivamente (Tabla 9).

En estas pruebas, se utilizó la concentración del antimicrobiano recomendada por el fabricante (0.04%) y cuatro concentraciones superiores para poder encontrar las MBCs en los diferentes materiales, en este caso, las dos cepas estudiadas sobre las diferentes superficies probadas requirieron las mismas concentraciones del antimicrobiano para la inhibición total del inóculo inicial después de 15 minutos de contacto con el antimicrobiano; como se puede observar en las Tablas 10, 11 y 12, el material que requirió menor concentración del antimicrobiano para la inactivación de las células bacterianas adheridas fue el acero inoxidable 0.07%; el plástico necesitó una concentración de 0.5%; y finalmente la madera con una concentración de 1.0%.

Por el hecho de no contar con un neutralizador para el antimicrobiano evaluado se introdujeron las superficies empleadas a una bolsa ziploc que contenía 100 ml de caldo BHI para favorecer la reactivación de las células lesionadas por el antimicrobiano, y se probaron tres tiempos de reactivación del microorganismo de prueba (15 minutos, 24 y 48 h) para una posible recuperación de estos. Se emplearon controles negativos para comprobar que los tratamientos previamente aplicados a los materiales fueran suficientes para la esterilidad de los mismos, y controles positivos para corroborar que las condiciones empleadas durante la experimentación y los tratamientos previamente aplicados a las superficies no afectaban el crecimiento de las cepas empleadas (Tablas 10, 11 y 12).

Tabla 9. PREPARACION DEL INÓCULO DE *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhi*.

No. Repetición	<i>Listeria monocytogenes</i> Inóculo (ufc/100μl)	<i>Salmonella typhi</i> Inóculo (ufc/100μl)
1	2.46 x 10 ⁸	3.40 x 10 ⁸
2	2.80 x 10 ⁸	3.00 x 10 ⁸
3	3.00 x 10 ⁸	3.20 x 10 ⁸
4	2.60 x 10 ⁸	3.00 x 10 ⁸
5	2.86 x 10 ⁸	3.67 x 10 ⁸
X	2.74 x 10 ⁸	3.25 x 10 ⁸
S	1.90 x 10 ⁷	2.54 x 10 ⁷
C.V.	6.94	7.82

Tabla 10. INHIBICION DE *Listeria monocytogenes* y/o *Salmonella typhi* EN ACERO INOXIDABLE.

m.o.	Tiempo de Reactivación	[%] antimicrobiano				
		[0.10]	[0.07]	[0.04]	control(+)	control(-)
<i>Listeria monocytogenes</i>	15 min. (T° amb)	-	-	-	+	-
	24 h (37°C)	-	-	+	+	-
	48 h (37°C)	-	-	+	+	-
<i>Salmonella typhi</i>	15 min. (T° amb)	-	-	-	+	-
	24 h (37°C)	-	-	+	+	-
	48 h (37°C)	-	-	+	+	-

Tabla 11. INHIBICION DE *Listeria monocytogenes* y/o *Salmonella typhi* EN PLÁSTICO.

m.o.	Tiempo de Reactivación	[%] antimicrobiano				
		[1.0]	[0.50]	[0.1]	control(+)	control(-)
<i>Listeria monocytogenes</i>	15 min. (T° amb)	-	-	-	+	-
	24 h (37°C)	-	-	+	+	-
	48 h (37°C)	-	-	+	+	-
<i>Salmonella typhi</i>	15 min. (T° amb)	-	-	-	+	-
	24 h (37°C)	-	-	+	+	-
	48 h (37°C)	-	-	+	+	-

Tabla 12. INHIBICION DE *Listeria monocytogenes* y/o *Salmonella typhi* EN MADERA.

m.o.	Tiempo de Reactivación	[%] antimicrobiano				
		[1.0]	[0.50]	[0.1]	control(+)	control(-)
<i>Listeria monocytogenes</i>	15 min. (T° amb)	-	-	-	+	-
	24 h (37°C)	-	+	+	+	-
	48 h (37°C)	-	+	+	+	-
<i>Salmonella typhi</i>	15 min. (T° amb)	-	-	-	+	-
	24 h (37°C)	-	+	+	+	-
	48 h (37°C)	-	+	+	+	-

6.3 EFECTIVIDAD DE CITROL-K COMO CONSERVADOR EN QUESO PANELA FRENTE A *L. monocytogenes* y *S. typhi*.

La concentración inicial de los Inóculos de *L. monocytogenes* obtenida del promedio de 3 repeticiones fue 2.13×10^7 ufc/ml y 2.87×10^7 ; mientras que para *S. typhi* fueron obtenidas concentraciones de 2.4×10^7 y 2.33×10^7 ufc/ml (ver Tabla 13); para ambos microorganismos, el primero fue utilizado en los experimentos en los cuales se adicionó el antimicrobiano a la leche (antes de cuajar), y el segundo en los que se adicionó dicho antimicrobiano a la cuajada. Después de las 24 horas de almacenamiento del queso panela a 4 °C, se realizaron las detecciones de los microorganismos de prueba, permitiéndole actuar al antimicrobiano durante este período de tiempo. Como se puede observar en las Tablas 14 y 15, el antimicrobiano evaluado no tuvo efecto alguno frente a *Listeria monocytogenes* o *Salmonella typhi* cuando fue adicionado a leche o a la cuajada durante la elaboración del queso panela en ninguna de las concentraciones probadas del antimicrobiano (1.0, 0.50, 0.10, 0.04 y 0.02%), los datos mostrados son el resultado del desarrollo de tres experimentos.

Tabla 13. PREPARACION DEL INÓCULO DE *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhi*.

No. Repetición	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Salmonella typhi</i>	
	antes de cuajar Inóculo (ufc/250µl)	después de cuajar Inóculo (ufc/250µl)	antes de cuajar Inóculo (ufc/250µl)	después de cuajar Inóculo (ufc/250µl)
1	2.4×10^7	2.8×10^7	2.6×10^7	2.4×10^7
2	2.0×10^7	2.8×10^7	2.2×10^7	2.8×10^7
3	2.0×10^7	3.0×10^7	2.4660×10^7	2.0×10^7
X	2.13×10^7	2.87×10^7	2.4×10^7	2.33×10^7
S	1.88×10^8	9.42×10^8	1.66×10^8	2.49×10^8
C.V.	8.84	3.29	6.93	10.69

Tabla 14. EFECTO BACTERIOSTÁTICO DE CITROL-K EN QUESO PANELA FRENTE A *Listeria monocytogenes* APLICADO ANTES O DESPUES DE CUAJAR.

[] Bacteriana	[%] antimicrobiano					Control
	[1.0]	[0.50]	[0.10]	[0.04]	[0.02]	
10^{-1}	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	+	+	+
10^{-6}	+	+	+	+	+	+

Tabla 15. EFECTO BACTERIOSTÁTICO DE CITROL-K EN QUESO PANELA FRENTE A *Salmonella typhi* APLICADO ANTES O DESPUES DE CUAJAR.

[] Bacteriana	[%] antimicrobiano					Control
	[1.0]	[0.50]	[0.10]	[0.04]	[0.02]	
10^{-1}	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	+	+	+
10^{-6}	+	+	+	+	+	+

6.4 COMPORTAMIENTO DE CITROL-K FRENTE A *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhi* EN LECHE

La concentración inicial del inóculo de *L. monocytogenes* y *S. typhi* obtenido del promedio de 3 repeticiones fue de 2.37×10^7 ufc/ml y 2.13×10^7 ufc/ml respectivamente (Tabla 16). Los datos de las Tablas 17 y 18 muestran que el antimicrobiano evaluado no tuvo efecto alguno sobre los microorganismos de prueba en ninguna de sus concentraciones empleadas (1.0, 0.5, 0.1, 0.04 y 0.02%) cuando se utilizó leche como sustrato y se incubó durante 24 ó 48 horas a 37°C.

Tabla 16. PREPARACION DEL INÓCULO DE *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhi*.

No. Repetición	<i>Listeria monocytogenes</i> Inóculo (ufc/ml)	<i>Salmonella typhi</i> Inóculo (ufc/ml)
1	2.2667×10^8	2.0667×10^8
2	2.4×10^8	2.0×10^8
3	2.2×10^8	2.2×10^8
4	2.6×10^8	2.0×10^8
5	2.4×10^8	2.4×10^8
X	2.37×10^8	2.13×10^8
S	1.37×10^7	1.52×10^7
C.V.	5.78	7.13

Tabla 17. EFECTO INHIBITORIO DE CITROL-K FRENTE A *Listeria monocytogenes* EN LECHE CON UN TIEMPO DE CONTACTO DE 24 Y 48 HORAS.

[] Bacteriana	[%] antimicrobiano					
	[1.0]	[0.50]	[0.10]	[0.04]	[0.02]	control
10^{-1}	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	+	+	+
10^{-6}	+	+	+	+	+	+

Tabla 18. EFECTO INHIBITORIO DE CITROL-K FRENTE A *Salmonella typhi* EN LECHE CON UN TIEMPO DE CONTACTO DE 24 Y 48 HORAS.

[] Bacteriana	[%] antimicrobiano					
	[1.0]	[0.50]	[0.10]	[0.04]	[0.02]	control
10^{-1}	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	+	+	+
10^{-6}	+	+	+	+	+	+

6.5 CAPACIDAD CONSERVADORA DE CITROL-K FRENTE A MOHOS APLICADO SUPERFICIALMENTE A QUESO MANCHEGO.

Las cuatro concentraciones probadas del antimicrobiano (1.0, 0.50, 0.10, y 0.02%) funcionaron para evitar el crecimiento de Mohos en la superficie de queso manchego. Como se puede observar en la Tabla 19, los resultados de los conteos realizados a los quesos después de cinco semanas de maduración, muestran que el control contenía un promedio de 473.33 ufc/gr de queso, mientras que en los quesos impregnados con el antimicrobiano no reportaron contaminación por Mohos. Los datos mostrados en esta tabla son el resultado del desarrollo de cinco experimentos.

Tabla 19. INHIBICION DE MOHOS EN SUPERFICIES DE QUESO MANCHEGO

Parámetro	[%] antimicrobiano				
	[0.02]	[0.10]	[0.50]	[1.0]	Control
X (ufc/g)	-	-	-	-	473.33
S (ufc/g)	-	-	-	-	45.77
C.V	-	-	-	-	9.67

7. DISCUSIÓN

Hay aumento del interés en la industria de alimentos por la presencia y crecimiento de los patógenos provenientes de alimentos en las plantas de procesado en las que, estos microorganismos pueden contaminar fácilmente los alimentos, los cuales sirven como reservorio y permiten la entrada de patógenos al tracto digestivo de los consumidores. Debido a lo anterior y a la demanda por productos lo más cercano a lo natural, se han realizado diversos estudios para valorar el efecto antimicrobiano de sustancias obtenidas de fuentes naturales frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhi* entre otras.

En diversas investigaciones realizadas con antimicrobianos de fuentes naturales se han encontrado que las MICs obtenidas para una misma fuente son diferentes, se cree que esto se debe a varios factores como es el método de obtención de dichos antimicrobianos⁽⁴⁷⁾. La metodología empleada para la obtención de dichas concentraciones también influye en la actividad antibacteriana de estos, se sabe que las MIC obtenidas *in vitro* por dilución en agar y zonas de inhibición, generalmente son superiores a las obtenidas por dilución en caldo, requiriéndose así concentraciones de orégano de 5 y 1% respectivamente para inactivar *L. monocytogenes*; en el presente estudio por el método de dilución en caldo fueron requeridas concentraciones menores al 0.1% para inactivar *L. monocytogenes* o *S. tiphy*, las cuales son menores a las encontradas por otros autores para este tipo de antimicrobianos.

Para *Listeria monocytogenes* los MICs que se han obtenido de diversos trabajos por el método de dilución en caldo son muy variadas: 0.1-1.0% orégano y tomillo, 0.70% clavo, 0.90% salvia, 1.0% romero, 1.4% nuez moscada^(47,13), canela 0.5%⁽³⁹⁾; 0.20 - 0.27% para a. hidroxicinámico (a. fenólico)⁽⁶¹⁾; 500 µg/ml para citral y carvacrol, 1000 µg/ml para geraniol, perillaldehído, linalool, citronellal, terpinelol y eugenol⁽¹³⁾. Además, salvia al 1.0% disminuyó 5-7 ciclos logarítmicos en 24 horas⁽³⁹⁾; aceite esencial de *Picea excelsa*, 0.07% inhibió 10⁵ ufc/ml, 2-3% fue bactericida contra 10⁵-10⁷ ufc/ml⁽⁸⁾; concentraciones ≥ 1% de clavo redujeron 8 logaritmos después de 7 días de incubación a 35°C⁽¹⁷⁾. Por el método de dilución en agar, la MBC (concentración mínima bactericida) obtenida con el orégano fue de 5% para *L. monocytogenes*⁽¹³⁾. Respecto a los conservadores, en caldo triptosa, el

benzoato sódico 0.2-0.3% consigue inhibición total; proplonato sódico 0.25-0.3%, la inactivación total y sorbato potásico 0.3%, crecimiento lento⁽²⁸⁾. En este trabajo, una concentración 0.005% de Citrol-k, inferior a cualquiera de las anteriormente citadas, redujo 10 ciclos logarítmicos de este patógeno en 24 horas, aunque cabe la posibilidad de que las células bacterianas hayan permanecido viables pero no cultivables. La actividad de los antimicrobianos depende en cierta medida, del mecanismo de acción que ejercen éstos y de las características de el microorganismo objetivo, su eficiencia puede diferir para diversas especies de un mismo género. Se han encontrado, en el caso de *Salmonella typhimurium*, los MICs para diferentes productos de origen natural han sido: semillas de *Syzygium jambolanum* son 3.1%⁽⁹⁾; tomillo u orégano 0.12%, lemongrass ó laurel 0.25%, ajo 4.9%; *S. typhi*, *Symphutum officinale* 2.9%⁽³⁹⁾; orégano 5% fue bactericida⁽¹³⁾; y con Citrol-k se requirió una concentración de de 0.01% para reducir 9 ciclos logarítmicos de *Salmonella typhi* en 24 horas por el método de dilución en caldo.

Dicha eficiencia también puede variar para cepas diferentes; la pared celular de las bacterias Gram (+) consiste de multicapa de peptidoglicano así como ácidos teicoicos y proteínas, la envoltura celular de las bacterias Gram (-) comprende una delgada capa de peptidoglicano, una membrana exterior y una zona periplásmica; la capa de peptidoglicano no provee protección contra químicos en el ambiente, basado en este hecho parece que las bacterias Gram (-) son menos dañadas que las bacterias Gram (+) por agentes microbicidas tales como los sanitizantes debido a lipopolisacáridos en su membrana exterior^(3,62), esto podría explicar por que la misma concentración del antimicrobiano evaluado en este trabajo fue más eficiente frente a *Listeria monocytogenes*, eliminando mayor cantidad de esta bacteria (10^{10} ufc/ml) con una menor concentración de Citrol-k (0.005%), comparada con *Salmonella typhi* para la cual requirió una concentración mayor (0.01%) para eliminar menor cantidad de esta (10^9 ufc/ml). Estos resultados del comportamiento de las bacterias Gram (+) y Gram (-) difiere con lo encontrado por Tassou et al., (1995) quienes investigaron el efecto del aceite esencial de menta en *L. monocytogenes* y *S. enteritidis* en un caldo de cultivo, y aunque las bacterias Gram (+) son generalmente más sensibles a los aceites esenciales que las bacterias Gram (-), los autores encontraron que *L. monocytogenes* fue más resistente a este aceite esencial que *S. enteritidis*⁽⁴⁷⁾. Pero concuerdan con Delaquis and Sholberg (1997) quienes obtuvieron una MIC superior para *S. typhimurium* ATCC

(0.15%) comparada con *L. monocytogenes* (0.05%) cuando evaluaron alil isotiocianato ⁽³⁹⁾, Alzoreky and Nakahara (2003), también obtuvieron MIC superiores para *S. infantis* (0.264%), comparada con *L. monocytogenes* (0.0165-0.264%) cuando evaluaron *Cinnamomum cassia* ⁽³⁾; el aceite esencial de cilantro inhibió fuertemente las bacterias Gram (+) entre ellas *L. monocytogenes*, pero tuvo poco efecto contra las Gram (-) ⁽¹³⁾.

En cuanto a los sanitizantes que actualmente son utilizados, con respecto a *L. monocytogenes*, 0.02% de ingredientes activos de sanitizantes aniónicos ácidos ó compuestos de amonio cuaternario, reducen cinco ciclos logarítmicos; cloro 0.01%, yodo 0.0045%, son efectivos para este patógeno ⁽⁴⁷⁾; en este trabajo la concentración necesaria para reducir 10 ciclos logarítmicos en 24 horas fue comparable al iodo y menor que la de cloro. En este estudio se encontró que después de 7 días de incubación en caldo BHI a 37°C, no se presentaron cambios en cuanto a la actividad antimicrobiana de Citrol-k frente a cualquiera de los patógenos probados en este estudio ya que no hubo reactivación de los mismos durante este periodo de tiempo.

Los biofilms microbianos están atrayendo atención en diferentes áreas tales como el campo médico, ambiente acuático e industrias de procesamiento de alimentos, estos son de considerable interés en el contexto de la higiene de alimentos ⁽³¹⁾, diversos estudios se han enfocado en el potencial de *L. monocytogenes* y *Salmonella* para crecer de este modo en varios tipos de superficies, los resultados han mostrado que estos patógenos pueden formar biofilms en superficies que contactan con alimentos y han sido encontradas con este tipo de crecimiento en el plástico, polipropileno, caucho, acero inoxidable y vidrio ^(22,52).

Mafu et al. (1990) encontró que *L. monocytogenes* se adhiere a acero inoxidable, cristal, polipropileno y caucho, después de tiempos cortos de contacto (20-60 min.) a temperatura ambiente y de refrigeración, la formación de material extracelular alrededor de las células adheridas fue revelado por un SEM (scanning electron microscopy) después de 60 minutos de incubación a ambas temperaturas ⁽⁴⁷⁾. Con base en estos datos, se estableció el tiempo en el cual se permitió que los microorganismos de prueba del presente estudio se adhirieran a las superficies probadas (acero inoxidable, plástico y madera), y de esta manera evaluar el sanitizante (Citrol-k) frente a células adheridas, ya que varias pruebas en

superficie han mostrado que las células de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* adheridas a éstas son más resistentes que las células en suspensión a los sanitizantes tales como el iodo, cloro y compuestos ácidos aniónicos; además se ha observado que los desinfectantes como el ácido paracético, cloruro de mercurio y formaldehído han mostrado que no tienen efecto en biofilms^(6,10,22,53); las pruebas de un método de detección basado en microscopía de láser confocal⁽⁶²⁾, han mostrado que el agente usado para la sanitización de superficies no penetra completamente las células agrupadas.

Los resultados en este estudio concordaron con estos autores ya que mostraron que las células de *S. typhi* o *L. monocytogenes* adheridas a acero inoxidable, plástico o madera son más resistentes frente al antimicrobiano evaluado que las correspondientes bacterias suspendidas libremente, debido a que fueron necesarias concentraciones de 0.07, 0.5 y 1.0% de Citrol-k para la inhibición de las células de estos patógenos adheridas a acero inoxidable, plástico y madera respectivamente en ambas bacterias, aumentando así 14, 100 y 200 veces la concentración del antimicrobiano, comparada con la necesaria para inhibir las células suspendidas libremente de *L. monocytogenes*, lo cual concuerda con lo encontrado por Chavant et al., (2004), quienes estudiaron los efectos de sanitizantes en la supervivencia de células de *L. monocytogenes* suspendidas libremente o adherentes, y encontraron que, la adición de BDTA (QAC) reveló una fuerte resistencia para estas últimas⁽¹⁰⁾. Frank and Koffi (1990) encontraron que *L. monocytogenes* fue más sensible a benzalconio (QAC) y ácido dodecildibenzensulfónico cuando estaba suspendida libremente, el contacto con ambos sanitizantes (0.01-0.08%) redujo poblaciones de células suspendidas libremente de 10^8 ufc/ml a niveles indetectables; en contraste, células individuales adheridas (10^5 ufc/cm²) disminuyeron 3-5 logaritmos⁽⁴⁷⁾. Lee and Frank (1991) encontró que la exposición a una solución con 0.02% de cloro residual por 30 segundos disminuyó la población de células individuales adheridas de 4.8 unidades logarítmicas,⁽⁴⁷⁾. Mosteller y Bishop (1993) encontró que 0.02% de cloro fue suficiente para inactivar más de 5 unidades logarítmicas de células de *L. monocytogenes*; sin embargo, un tratamiento similar falló para inactivar 3 unidades logarítmicas de esta bacteria adherida superficies de teflón y caucho⁽⁴⁷⁾. Sin embargo en este trabajo se logró reducir 8 ciclos logarítmicos de esta bacteria adherida a acero inoxidable con una concentración de 0.07% de Citrol-k.

Con respecto a *Salmonella typhi*, en este trabajo se encontró que son necesarias concentraciones de 0.7, 0.5 y 1.0% de Citrol-k para reducir 8 ciclos logarítmicos de células de esta bacteria adheridas a acero inoxidable, plástico y madera respectivamente, por lo que es necesario aumentar 7, 50 y 100 veces la concentración de Citrol-k, comparadas con la concentración requerida cuando las células de esta bacteria estaban suspendidas libremente dichos resultados concuerda con los resultados de Joseph et al., (2001), quienes encontraron que para la inhibición de células de *Salmonella* adheridas a superficies de acero inoxidable, plástico y cemento requirieron aumentar las concentraciones de Cl_2 o I_2 10 veces o más, comparadas a su réplica suspendida libremente⁽³¹⁾.

Referente a las superficies probadas en este estudio, se comprobó que los materiales con mayor porosidad requieren mayores concentraciones de sanitizante para la inhibición de las células bacterianas adheridas a estas, la madera fue el material que proporcionó mayor protección a las dos cepas estudiadas y en menor medida el plástico, mientras que el acero inoxidable probó ser de las superficies evaluadas, la más adecuada para su empleo en industria de alimentos porque protege menos a los microorganismos del tratamiento sanitizante aplicado en este estudio. Las superficies de plástico y madera requirieron concentraciones 7.1 y 14.4 veces mayores con respecto al acero inoxidable para inactivar cantidades iguales de los microorganismos de prueba (10^8 ufc); lo cual concuerda con Joseph et al., (2001), quienes encontraron variación de respuesta a sanitizantes, dependiendo de la superficie, requiriendo mayores concentraciones de sanitizantes las superficies de cemento comparada con plástico y acero inoxidable⁽³¹⁾. En otro caso, se mostró que la resistencia de las células adherentes de *L. monocytogenes* fue dependiente de la superficie, siendo poliéster o poliuretano las más difíciles de sanitizar⁽⁴⁶⁾. Krysinski et al., (1992) encontraron que la protección proporcionada por las superficies contra agentes sanitizantes o limpiadores varió, siendo más protectora la cinta de poliéster, seguida de la cinta de poliéster-poliuretano y acero inoxidable; aunque la mayor parte de los sanitizantes que fueron probados inactivaron la bacteria adherida a acero inoxidable, ninguno pudo hacer lo mismo en cintas de poliéster-poliuretano⁽⁴⁷⁾. Mustapha y Liewen (1989) encontraron que la destrucción de *L. monocytogenes* fue mayor en superficies lisas que en superficies picadas de acero inoxidable,⁽⁴⁷⁾. Estudios comparativos de limpieza en materiales como acero inoxidable, vidrio, compuestos de nylon y polivinilo no mostraron cambios significativos

cuando la superficie era nueva, sin embargo con el tiempo el acero inoxidable exhibe mejores propiedades higiénicas por la resistencia a daños causados por los procesos de limpieza y sanitización, y se ha encontrado que el tratamiento mecánico o electrolítico aplicado a acero inoxidable permite la producción de superficies lisas o pulidas ^(22,35).

Sinde y Carballo (2000) encontraron que las bacterias se adhieren mejor a materiales hidrofóbicos como el politetrafluoroetileno, seguido de caucho y acero inoxidable, que los compuestos de amonio cuaternario fueron más efectivos contra la adhesión de *Salmonella* que la adhesión de *L. monocytogenes* y dietilentetraamina mostró eficacia similar contra la adhesión de ambas bacterias⁽⁵³⁾. En este trabajo, no se pudo ver la variación de la efectividad de Citrol-k con respecto a las bacterias probadas, ya que los resultados mostraron un comportamiento similar en el que ambas bacterias requirieron las mismas concentraciones del antimicrobiano evaluado para inhibir la misma cantidad de microorganismo en las superficies. Por los resultados obtenidos, aparentemente Citrol-k tiene actividad bactericida, pero existe la posibilidad de que las células bacterianas hayan permanecido viables pero no cultivables, aunque por la metodología empleada se cree que el Citrol-k estaba tan diluido, que es improbable que se hubiese encontrado activo y haya dado un falso negativo, además de que las superficies embebidas en caldo BHI fueron incubadas a 37°C durante 48 horas para darles tiempo de reactivarse a las células bacterianas que hubiesen sido lesionadas por el antimicrobiano; una posibilidad para corroborar lo anterior, sería utilizar el ESEM environmental scanning electron microscopy para realizar el conteo directo de microorganismos en superficies, el cual se ha empleado en varios estudios de este tipo.

El problema de contaminación de alimentos no está limitado a instalaciones a gran escala, las esponjas caseras, las tablas de picado y los trapos representan áreas donde los microbios patógenos pueden estar depositados; en diversos estudios se han analizado muestras de varias superficies caseras incluyendo alimentos, lavandería y artículos de cocina para buscar presencia de biofilms, en los cuales se ha encontrado evidencia cualitativa de su presencia en todas las muestras analizadas; los resultados sugieren que puede haber una necesidad de productos sanitizantes de superficies de productos frescos que ataquen específicamente microbios presentes dentro de este modo especializado de

crecimiento y que además sean seguros para el consumidor en cuanto a su eficacia frente a los microorganismos y toxicidad. El antimicrobiano evaluado en este trabajo puede ser empleado en casa y para los alimentos ya que es un producto natural, no tóxico de amplio espectro microbiano⁽⁴⁶⁾.

Para la evaluación de los sanitizantes es necesario tomar en cuenta las superficies donde van a ser aplicados, ya que generalmente las pruebas se llevan a cabo en suspensiones bacterianas con diluciones del sanitizante listas para usar pero al ser aplicadas en superficie, no son capaces de remover los microorganismos que pueden estar presentes en las superficies, esto podría deberse en parte a las dificultades técnicas y la carencia de una metodología aprobada, aunque un método de biofilm estandarizado ha sido aceptado por la American society for Testing and Materials (www.astm.org ASTM E2196-02), no hay tales métodos que hayan sido aprobados o avalados por agencias regulatorias.

Las concentraciones recomendadas por los fabricantes no deberían ser excedidas, ya que el uso de soluciones de sanitizantes extremadamente concentradas intensifica el daño a los empleados, incrementa el riesgo de contaminación química del alimento y en algunos casos causa corrosión; sin embargo, el antimicrobiano evaluado en este trabajo no representa ningún peligro para los empleados y no tiene efecto corrosivo a las concentraciones empleadas.

Uno de los aspectos importantes al aplicar un sistema de limpieza y sanitización en las superficies que contactan con los alimentos es la remoción de los microorganismos y los restos de alimentos porque de lo contrario, pueden provocar la formación de un biofilm, y el Citrol-k remueve eficientemente las células adheridas a las diferentes superficies estudiadas; según los resultados obtenidos, se debería evitar al máximo el empleo de superficies de plástico y madera ya que no cualquier sanitizante logra eliminar las células adheridas a estas, aunque si se emplea un buen sanitizante, como en este caso, se logra una buena sanitización en este tipo de superficies.

La mayoría de las investigaciones de antimicrobianos obtenidos de fuentes naturales se enfoca en valorar su actividad *in vitro* o aplicados a alimentos, pero muy pocas los

evalúan como sanitizantes, Citrol-k es un antimicrobiano obtenido de fuentes naturales que puede cumplir ambas funciones, aplicado como conservador en ciertos alimentos, pero también es eficiente como sanitizante en las superficies probadas.

En México leche no pasteurizada es muy consumida y la incidencia de enfermedades provenientes de leche es desconocida, en un estudio muestras de leche cruda obtenidas de tanques de almacenamiento de cuatro diferentes granjas en el sureste de la ciudad de México, y el 13% de las muestras examinadas fueron positivas para *Listeria monocytogenes* ⁽⁵⁷⁾. En este trabajo Citrol-k no presentó actividad antimicrobiana frente a ninguna de las dos bacterias probadas cuando se empleó leche como sustrato, sucediendo lo mismo cuando se adicionó durante la elaboración de queso panela, partiendo de leche contaminada con alguno de los microorganismos de prueba. La etapa en la cual fue adicionado el Citrol-k durante la elaboración del queso panela (en leche antes del cuajado, ó directamente a la cuajada), no influyó en su actividad antimicrobiana frente a las bacterias probadas ya los resultados obtenidos fueron iguales; esto podría deberse a que la actividad del antimicrobiano evaluado pudo haber sido inhibida o neutralizada por algún componente de la leche, a que el antimicrobiano requería de más tiempo (24 horas) para poder inhibir por lo menos cierta parte de los microorganismos inoculados o al pH de la leche (6.8 - 7.0). Como se menciona, la actividad antimicrobiana de los extractos y aceites esenciales es más efectiva cuando se prueba en caldo (*in vitro*), comparada con su efectividad mostrada cuando es aplicada en alimentos; en diversos estudios se ha encontrado que algunas sustancias no presentan actividad antimicrobiana cuando son evaluados en alimentos, en otros, esta actividad solo disminuye en cierta medida y muy pocos mantienen la misma. Parece ser que el contenido de grasa, proteína, concentración de cationes como el calcio presente en la leche, temperatura de almacenamiento y pH en el alimento, afectan dicha actividad ^(7,55,59), y probablemente esto pasó cuando se aplicó Citrol-k a la leche y en la cuajada.

Sin embargo, el Citrol-k presentó actividad antifúngica, evitando su crecimiento cuando fue aplicado superficialmente a queso manchego el cual fue almacenado en cámara de maduración durante 5 semanas; en este caso no fue necesaria una concentración mayor a la recomendada por el fabricante, siendo suficiente 0.02% del antimicrobiano para los

resultados mencionados. Por lo anterior se podría sugerir su aplicación superficial en quesos y/o su aplicación en películas y recubrimientos de estos productos; Weng and Hotchkiss (1992), probó la asociación de un polímero con un agente antifúngico, metil-1butilcarbamoll-2-benzimidazolcarbamato y la incorporación de imazalil, un agente antimicótico en films de polietileno usados para empaqueo de quesos, dando buenos resultados para la inhibición de mohos en superficies ⁽²²⁾. En otros estudios, Yoshida et al., (1987) encontró una MIC de 20µg/ml de ajo frente a *A. niger* ATCC ⁽³⁹⁾; también extractos acuoso y metanólico de semillas de *Syzygium jambolanum* fueron examinados para su actividad contra *A. flavus*, *A. niger* y *A. fumigatus*, obteniéndose MFC (concentración mínima fungicida) entre 125 -500µg/ml⁽⁹⁾.

De acuerdo a los datos proporcionados por el fabricante, Citrol-k no presenta sinergismo con otros antimicrobianos sintetizados químicamente o de fuentes naturales, sin embargo, en algunos casos, los antimicrobianos provenientes de fuentes naturales si presentan ésta característica. En un estudio se evaluó la interacción entre EDTA o lactoferrin y nisina, lisozima o monolaurin contra cepas de *L. monocytogenes* y *Salmonella enteritidis* entre otras, encontrándose que bajos niveles de EDTA actuaban sinérgicamente con nisina y lisozima contra *L. monocytogenes* pero EDTA y monolaurin interactuaron aditivamente contra este microorganismo. Lactoferrin solo no inhibió ninguna de las cepas bacterianas, pero incremento la actividad de la nisina contra cepas de *L. monocytogenes* ⁽⁵⁵⁾; Pol and Smith (1999) encontró que orégano- carvacrol, un fitofenol, incrementó la actividad de nisina sobre *L. monocytogenes* ⁽³⁹⁾; Singh et al., (2001) estudiaron el efecto de combinación de nisina y ajo en un alimento, la cual fue efectiva en la prevención de crecimiento de *Listeria monocytogenes* e incrementó ligeramente el efecto bactericida de nisina ⁽⁵⁴⁾; Alzoreky and Nakahara (2003), encontraron que EDTA 0.85mM, redujo las MICs de *Cinnamomum cassia* y *Cissus rotundifolia* por los menos 50% cuando se probó contra *L. monocytogenes* y *S. infantis* ⁽³⁾; concentraciones \geq 1% de nuez moscada y anís en 7 días redujeron 5-8 logaritmos de *L. monocytogenes*, usando \geq 1% de pimienta blanca, negra, roja y coriandro, la población disminuyó 2-5 logaritmos ⁽⁴⁷⁾; Además, en un estudio realizado por Blaszyk et al., (1998), en el cual se tuvo éxito en la inhibición de *Brochotrix thermosphacta* y *L. monocytogenes* con una solución que contenía citrato de sodio, monolaurin y eugenol mientras la mayoría de la flora láctica (*Lactobacillus*) fueron preservados ⁽⁴⁾.

Diversos microorganismos han desarrollado resistencia frente a los antimicrobianos comerciales que actualmente se emplean a través de la inducción del fenotipo mar⁽⁴³⁾. Se sabe por el fabricante, que el producto evaluado en este trabajo (Citrol-k) no crea resistencia de los microorganismos, tal como sucede con muchos fitoquímicos como los contenidos en el muérdago africano o en el cilantro^(12,48), siendo esta característica una cualidad importante para su aplicación en la industria alimentaria; pero es siempre recomendable aplicar las dosis adecuadas para evitar la aparición de cepas resistentes como se ha presentado con otros sanitizantes tales como el cloruro de benzalconio⁽²⁾.

Varios países industrializados han implementado sistemas de monitoreo de *Salmonella* y sistemas de monitoreo de resistencia. Ejemplo de este es el Sistema de Monitores de Resistencia Antimicrobiana (NARMS)⁽¹¹⁾, el cual monitorea resistencia a los antibióticos en *Salmonella* de diversas fuentes a través de USA. Además, deben ser desarrolladas continuamente nuevas técnicas para la inhibición del crecimiento microbiano no deseado puesto que estos se adaptan a sobrevivir en la presencia de métodos de control previamente efectivos. La comprensión de por qué cada método de conservación es efectivo es importante para poder predecir el surgimiento de respuesta de resistencia y su control mientras ellos se desarrollan. Las estrategias para contra atacar efectivamente el desarrollo de resistencia pudieran ser: cambio o rotación del uso de antimicrobianos, desarrollo de nuevos antimicrobianos, aplicación de varias barreras de conservación, prevención de adhesión bacteriana y utilización de exclusión competitiva.

Debido a que éstos patógenos son omnipresentes en las granjas y el medio agrícola lo cual representa un peligro latente, se debería llevar a cabo la aplicación de controles desde estos sitios y continuar durante todo el proceso de elaboración hasta la selección y manipulación de los alimentos por el consumidor, lo cual puede reducir el riesgo de *Listeriosis* y *Salmonelosis* transmitida por alimentos. Los objetivos que se persiguen con esto es reducir al mínimo la multiplicación de los microorganismos patógenos en las materias primas, antes y durante el tratamiento de los alimentos crudos, utilizar tratamientos que garanticen la destrucción de estos patógenos y reducir al mínimo el riesgo de recontaminación ya sea en la línea de producción o después del empaquetado.

Es muy importante mantener las superficies libres de microorganismos y residuos de alimentos para la inhibición de la adhesión inicial de bacterias, la formación de un biofilm puede tomar de varios días a varias semanas, por consiguiente, es de gran importancia tener métodos de limpieza y sanitización efectivos que eviten la formación de biofilms. El control de estos representa uno de los desafíos mas persistentes dentro de ambientes industriales y de alimentos donde las comunidades microbianas son problemáticas.

Los tratamientos de limpieza y sanitización dados a los equipos, paredes, techos y drenajes, deben ser adecuados para destruir o remover *L. monocytogenes* y *Salmonella*, especialmente en áreas designadas para manipulación del producto final. Para verificar el control de estos microorganismos, las plantas deben considerar la implementación de un programa de monitoreo de prueba por una bacteria indicadora. La frecuencia del muestreo, localización de la toma de las muestras y la acción correctiva a ser tomada son hechas a la medida de la operación de la planta. Además de la de higiene la planta, la capacitación del personal, debería ser componente importante de un programa de control de patógenos.

8. CONCLUSIONES

La actividad antimicrobiana de Citrol-k como muchos otros antimicrobianos químicos o provenientes de fuentes naturales, disminuye cuando este es aplicado a superficies reales ó como conservador en un alimento comparada con la actividad que presenta al ser evaluado *in vitro*.

Citrol-k es eficiente frente a células de *L. monocytogenes* y *Salmonella typhi* adheridas a superficies de acero inoxidable, plástico y madera. El rendimiento del antimicrobiano aplicado a plástico o madera disminuye notablemente ya que dichas superficies requieren concentraciones 7 y 14 veces más altas para su sanitización comparadas con el acero inoxidable, provocando con esto el aumento en el costo de la sanitización de dichas superficies, mostrando además, que su empleo en la industria de alimentos o en los propios hogares no es seguro; en contraste se pudo constatar por que el se debe preferir el acero inoxidable.

Citrol-k no presenta actividad antimicrobiana frente a las bacterias probadas aún en concentraciones altas (1%) cuando es aplicado como conservador en leche ó en queso panela bajo las condiciones empleadas en este trabajo; aunque es eficiente frente a Mohos cuando es aplicado a superficies de queso Manchego en concentraciones tan bajas como 0.02%, evitando su crecimiento durante 5 semanas de almacenamiento a 10 °C. Sin embargo, se requiere más investigación en cuanto a su aplicación en este tipo de alimentos.

9. REFERENCIAS

1. Aarestrup, M. Frank, and Henrik Hasman. 2004. Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances for disinfection. *Veterinary Microbiol.* 100:83-89.
2. Aase, B., Gunhild Sundheim, Solveig Langsrud and Liv Marti Rorvik. 2000. Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 62:57-63.
3. Alzoreky, N. S., and K. Nakahara. 2003. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Int. J. Food Microbiol.* 80:223-230.
4. Ammor, S., Isabelle Chevallier, Arlette Laguet, Jean Labadie, Régina Talon and Eric Dufour. 2004. Investigation of the selective bactericidal effect of several decontaminating solutions on bacterial biofilms including useful, spoilage and/or pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 21:11-17.
5. Araújo, A.B. y J. Carballo. 2004. Supervivencia al calor de bacterias adheridas a materiales de contacto con alimentos. *Alimentaria.* 357:27-31.
6. Bower, C. K., and M. A. Daeschel. 1999. Resistance responses of microorganisms in food environments. *Int. J. Food Microbiol.* 50:33-44.
7. Branen, Jill K., and P. Michael Davidson. 2004. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *Int. J. Food Microbiol.* 90:63-74.
8. Canillac, N., and A. Mourey. 2001. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiol.* 18:261-268.
9. Chandrasekaran, M., and V. Venkatesalu. 2004. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. *J. Ethnopharmacology.* 91:105-108.
10. Chavant, P., Brigitte Gaillard-Martinie and Michel Hébraud. 2004. Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase. *FEMS Microbiol. Lett.* Article Press, Uncorrected Proof- Note to users.
11. Cliver, Dean O., and Hand P. Riemann. 2002. Foodborne diseases. *Food Science and Technology.* Academic Press. Barcelona España, 2nd Edition.
12. Deeni Y.Y. and N.M. Sadiq. 2002. Antimicrobial properties and phytochemical constituents of the leaves of African mistletoe (*Tapinanthus dodoneifolius*(DC)

- Danser)(Loranthaceae): an ethnomedicinal plant of Hausaland, Northern Nigeria. *J. Ethnopharmacology*. 83:235-240.
13. Delaquis, Pascal J., Kareen Stanich, Benoit Girard and G. Mazza. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* 74:101-109.
14. Demberelnyamba, D., Ki-Sub Kim, Sukjeong Choi, Seung-Yeob Park, Huen Lee, Chang-Jin Kim, and Ick-Dong Yoo. 2004. Synthesis and antimicrobial properties of imidazolium and pyrrolidinium salts. *Bioorganic & Medicinal Chem.* Article in Press, Corrected Proof-Note to users.
15. Doganay, Mehmet. 2003. Listeriosis: Clinical presentation. *FEMS Immunology and Medical Microbiol.* 35:173-175.
16. Ducar, Maluenda Pedro y Benito Moreno García. 1991. El sistema de análisis de riesgos y puntos críticos, Su aplicación a las Industrias de alimentos. ICMSF. Acribia, Zaragoza España.
17. Forsythe, S.J., y P.R. Hayes. 2002. Higiene de los Alimentos. Microbiología y HACCP. Acribia, Zaragoza España, 2ª Edición.
18. Foster, J. W., and M. P. Spector. 1995. How *Salmonella* survive against the odds. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:145-174.
19. FSIS (Food Safety and Inspection Service). 1991. Listeriosis y Consejos en la Seguridad de los Alimentos. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y Servicio de Seguridad e Inspección de los Alimentos. www.fsis.usda.gov
20. FSIS (Food Safety and Inspection Service). 1999. Listeriosis y Consejos en la Seguridad de los Alimentos. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y Servicio de Seguridad e Inspección de los Alimentos. www.fsis.usda.gov
21. Fuenteoscura, Santiago. 2005. Embriagante y Sanadora. *Revista Quo.* 89:10.
22. Ganesh, Kumar C., and S.K . Anand. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 42:9-27.
23. Hassan, L., Hussni O. Mohammed and Patrick L. McDonough. 2001. Farm-management and milking practices associated with the presence of *Listeria monocytogenes* in New York state dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine.* 51: 63-73.

24. Hee, Choi Soon and Koo Bok Chin. 2003. Evaluation of sodium lactate as a replacement for conventional chemical preservatives in comminuted sausages inoculated with *Listeria monocytogenes*. Meat Sci. 65:531-537.
25. Hof, H. 2003. History and epidemiology of listeriosis. FEMS Immunology and Medical Microbiol. 35:199-202.
26. Hyginov, Critt. 2001. Guía para la elaboración de un plan de limpieza y desinfección, de aplicación en empresas del sector alimentario. Acribia, Zaragoza España.
27. ICMSF 6. 1998. Microorganismos de los alimentos, Ecología microbiana de los productos alimentarios. Acribia. Zaragoza España. 1ª Edición.
28. ICMSF. International. 1998. Microorganismos de los alimentos, Características de los patógenos microbianos. Acribia. Zaragoza España.
- 29) Jay James M. 1994. Microbiología Moderna de los alimentos. Acribia, Zaragoza España.
30. Jefferson, K. Kimberly. 2004. What drives bacteria to produce a biofilm?. FEMS Microbiol. Lett. Article in Press, Corrected Proof- Note to users.
31. Joseph, B., S. K. Otta, Indrani Karunasagar and Y. Karunasagar. 2001. Biofilm formation by *Salmonella spp.* on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. Int. J. Food Microbiol. 64:367-372.
32. Kang, Y.J., and J.F. Frank. 1990. Characteristics of biological aerosols in dairy processing plants. J. Dairy Sci. 73:621-626.
33. Kidgell, C., Ulrike Reichard, John Wain, Bodo Linz, Mia Torpdahl, Gordon Dougan and Mark Achtman. 2002. *Salmonella typhi* the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. Infection, Genetics and Evolution. 2:39-45.
34. Lanciotti, R., F. Patrignani, F. Bagnolini, M. E. Guerzoni and F. Gardini. 2003. Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Food Microbiol. 20:537-543.
35. Le Clerq-Perlat, M. N., and M. Lalande. 1994. Cleanability in relation to surface chemical composition and surface finishing of some materials commonly used in food industries. J. Food Ing. 23:501-517.
36. Mah, Thien-Fah C., and George A. O'Toole. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in microbiol. 9:34-39.
37. Marsh, Emily J., Hongliang Luo and Hua Wang. 2003. A three-tiered approach to differentiate *L. monocytogenes* biofilm-forming abilities. FEMS Microbiol. Lett. 228:203-210.

38. Mota de la Garza Lidia. 2005. Ponencia: Inocuidad de los alimentos. Curso teórico práctico: Microbiología vs Inocuidad. FES Cuautitlán. mail: microbiologia@lei.com.mx
39. Naidu, A.S. 2000. Natural Food Antimicrobial Systems. CRC Press, Florida, U.S.A.
40. Norrung Birgit DVM. 2000. Microbiological criteria for *L. monocytogenes* in foods under special consideration of risk assessment approaches. Int. J. Food Microbiol. 62: 217-221.
41. Pao-Chuan, H., Jeng-Leun Mau and Shu-Hui Huang. 2001. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. Food Microbiol. 18:35-43.
42. PL Corporación S.A. de C.V. 2005. Matías Romero No. 116, Col. del Valle, México, 03100 D.F. www.plcorporacion.com.mx
43. Potenski, Catherine J., Megha Gandhi and Karl R. Matthews. 2003. Exposure of *Salmonella enteritidis* to chlorine or food preservatives increases susceptibility to antibiotics. FEMS Microbiol. Lett. 220:181-186.
44. Reij, M.W., E.D. Den Aantrekker and ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force. 2004. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. Int. J. Food Microbiol. 91:1-11.
45. Roberts Howard R. 1986. Sanidad Alimentaria. Acribia, Zaragoza España 1986.
46. Ryner, J., Richard Veeh and Janine Flood. 2004. Prevalence of microbial biofilms on selected fresh produce and household surfaces. Int. J. Food Microbiol. Article in Press, Corrected Proof- Note to users.
47. Ryser, E.T., and E.H. Marth. 1999. *Listeria*, Listeriosis and Food safety. Marcel Dekker Inc., New York, EEUU.
48. Sacasa María Elena. 2004. Cilantro: un excelente bactericida. Salud y Nutrición. Vanidades México. 25:82.
49. Samells, J., A. Kalouri, K.J. Rogga, I.N. Savvaidis and M.G. Kontominas. 2003. Nisin treatments to control *Listeria monocytogenes* post-processing contamination on Anthotyros, a traditional Greek whey cheese, stored at 4°C in vacuum. Food Microbiol. 20:661-669.
50. Satin, Morton. 1999. "Food alert!, The ultimate sourcebook for food safety". Facts On File, Inc., New York, USA..
51. Secretaría de Salud. 2004. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, (Velázquez M.Oscar J., Kuri M. Pablo, eds.), Epidemiología. 21:8-9.
52. Seok, Chae Min and Heidi Schraft. 2000. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. Int. J. Food Microbiol. 62:103-111.

53. Sinde, E., and J. Carballo. 2000. Attachment of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiol.* 17:439-447.
54. Singh, B., M. Bernadette Falahee and Martin R. Adams. 2001. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin and garlic extract. *Food Microbiol.* 18:133-139.
55. Smith-Palmer, A., J. Stewart and L. Fyfe. 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiol.* 18:463-470.
56. Taormina, Peter J., Brendan A. Niemira and Larry R. Beuchat. 2001. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int. J. Food Microbiol.* 69:217-225.
57. Vázquez, Salinas Carlos, Oscar Rodas Suarez and Elsa Irma Quiñones Ramírez. 2001. Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico city. *Food Microbiol.* 18:177-181.
58. Venø, Poulsen Lena. 1999. Microbial Biofilm in Food Processing. *Lebensmittelwissenschaft und-Technologie.* 32:321-326.
59. Vrinda Menon K. and S. R. Garg. 2002. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. *Food Microbiol.* 18:647-650.
60. Wei, J., Dorthe Bagge Ravn, Lone Gram and Peter Kingshott. 2003. Stainless steel modified with poly (ethylene glycol) can prevent protein adsorption but not bacterial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 32:275-291.
61. Wen, A., Pascal Delaquis, Kareen Stanich and Peter Toivonen. 2003. Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiol.* 20:305-311.
62. Wirtanen, G., S. Salo, I.M. Helander and T. Mattila-Sandholm. 2001. Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 20:37-50.