

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS**



Actividad antimicrobiana de compuestos polifenólicos provenientes de extractos de cáscaras de nuez contra *Salmonella* sp aplicados en el proceso de comercialización de melón (*Cucumis melo*).

Por

Q.F.B. EMILIO CARRANZA GARCÍA

Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS con Acentuación en Microbiología.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS  
PROVENIENTES DE EXTRACTOS DE CÁSCARAS DE NUEZ CONTRA  
*Salmonella* sp. APLICADOS EN EL PROCESO DE COMERCIALIZACIÓN  
DE MELÓN (*Cucumis melo*).

Comité de tesis

---

Director de tesis: Dra. Norma Laura Heredia Rojas

---

Secretario: Dr. José Santos García Alvarado

---

Vocal: Dr Raúl Rodríguez Herrera

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Investigación en Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila bajo la dirección interna de la Dra. Norma L. Heredia R. y la dirección externa del Dr. Raúl Rodríguez H. y la codirección del Dr. J. Santos García A. Este proyecto fue aprobado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología para el proyecto “CONACyT”.

## AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios por haberme dado la oportunidad de completar otra meta más en mi vida y proveer salud a mis seres queridos. Por proveerme de mesura y buenos pensamientos para llevar a cabo todas mis tareas. Por cruzarme en el camino de la gente maravillosa que me ha acompañado en estos años.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico ofrecido para la realización de mis estudios de posgrado.

Agradezco a la Dra. Norma Heredia y al Dr. Santos García por haberme brindado la oportunidad de seguir cumpliendo mis metas en la vida y por la excelente formación profesional que recibí por su parte.

Dr. Cristóbal Aguilar, realmente no tengo palabras para explicar lo agradecido que estoy, por sus consejos, su inmenso apoyo, y todas las facilidades que me brindó para llevar a cabo este proyecto, siempre estaré inmensamente agradecido.

Dr. Raúl Rodríguez, muchas gracias por su apoyo y por las facilidades para llevar a cabo este proyecto.

Quiero agradecer profundamente al Dr. Salvador Valtierra y a su apreciable esposa Sra. Sofía Rodríguez, por su gran apoyo, su aprecio y sus valiosos consejos, además de ser un excelente ejemplo a seguir. M.C. Diana, gracias por estar ahí siempre, compartiendo todo momento.

A mis padres Emilio y Antonia, por educarme y apoyarme siempre. Gracias por confiar en mí y por darme su cariño incondicionalmente. Por enseñarme tanto en la vida. Los

quiero mucho. A mis tías Pati y Juani, por su compañía siempre y por alentarme a seguir adelante, cada una en su singular manera. A mis padres por darme la vida, por sus consejos y su apoyo. Gracias a todos por ser parte de mi familia, y por ser parte de mí.

Amigos; Abigail gracias por tu amistad incondicional, por ser mi amiga y aguantarme todo. Liliana, Ximena y Julieta, por ser mis amigas desde hace tanto tiempo y ya saben que aunque no nos vemos seguido siempre las llevo en mi mente. Lalo, por compartir de todo juntos desde hace tanto tiempo.

M.C. Luisa, muchas gracias por su tiempo y sus consejos. M.C. Eduardo, gracias por su amistad, su tiempo, echarme la mano y darme consejos. A todos mis compañeros y amigos que hice en el Lab. de Bioquímica y Genética de Microorganismos, Sandra, Rosy, Fabi, Aldo, Don Esteban, Nereida y Alma. A la QFB Alejandrina Montes, gracias por tu amistad y espero sigamos en contacto después de estos dos años.

Gracias al M.C. Arturo Rodríguez, Dr. Juan Carlos, por las atenciones recibidas por su parte. Gracias al grupo de 7mo. semestre de Bromatología y a los alumnos de maestría por su disposición para conmigo.

## DEDICATORIA

Este trabajo fue realizado con mucho cariño y entusiasmo, siempre teniendo en mente que cada acción realizada es producto del amor y las bendiciones de Dios, gracias por brindarme más de lo que merezco, porque con tu respaldo seguiré realizando y poniéndome nuevas metas.

*In memoriam*, abuela Isabel Mendoza Alfaro (q.e.p.d.) por guiarme desde pequeño y seguirme guiando desde el cielo.

Quiero dedicar este trabajo a mis padres Emilio y Antonia, que es el resultado de muchos sacrificios que han hecho a lo largo de mi vida para que pueda seguir adelante, nunca les fallaré. Ustedes son la fuerza y razón que me motiva a seguir.

Dr. Cristóbal Aguilar, sin su apoyo este trabajo no podría haber sido posible, muchas gracias.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	vi
TABLA DE CONTENIDO.....	vii
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUCCIÓN.....	16
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	18
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. HIPÓTESIS.....	20
5. OBJETIVO GENERAL.....	21
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
7. ANTECEDENTES.....	23
7.1. Generalidades acerca del melón.....	23
7.2. Problemas relacionados con la calidad y la seguridad del melón.....	25
7.3. El melón mexicano; panorama actual.....	27
7.4. Proceso de comercialización del melón.....	29
7.4.1. Cosecha.....	30
7.4.2. Pre-enfriado.....	32
7.4.3. Lavado.....	33
7.4.4. Línea de clasificación.....	34

7.4.5. Empacamiento.....	34
7.4.6. Almacenaje después del empacado.....	34
7.4.7. Transporte.....	35
7.5. <i>Salmonella</i> : generalidades.....	35
7.6. <i>Salmonella</i> como patógeno de humanos.....	37
7.7. <i>Salmonella</i> como causa de brotes epidémicos implicados a alimentos.	41
7.8. Métodos empleados para reducir y/o eliminar contaminación microbiana en frutas y vegetales.....	44
7.8.1. Métodos fisicoquímicos.....	45
7.8.2. Métodos biológicos.....	47
7.9. Uso de extractos de plantas como antimicrobianos.....	48
7.10. Los compuestos polifenólicos.....	49
7.11. La cáscara de nuez como fuente de taninos.....	54
7.12. Las pruebas sensoriales para determinar el efecto de los compuestos aplicados en el control microbiológico y de calidad en alimentos.....	56
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	58
8.1. Cultivos bacterianos.....	58
8.2. Extracción química de los compuestos polifenólicos y determinación del peso seco del extracto acuoso de las cáscaras de nuez.....	58
8.3. Determinación cuantitativa de los compuestos de interés, Taninos Hidrolizables y Taninos Condensados.....	59
8.4. Determinación de la actividad antibacteriana del extracto acuoso de las cáscaras de nuez mediante difusión en pozo.....	60
8.5. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) <i>In vitro</i> del extracto de cáscaras de nuez.....	60
8.6. Determinación del efecto bactericida del extracto de cáscaras de nuez sobre el modelo alimenticio contra <i>Salmonella</i> sp. ....	61
8.7. Efecto del extracto de cáscaras de nuez sobre la calidad sensorial del modelo alimenticio.....	63
8.8. Aislamiento y caracterización de <i>Salmonella</i> en melones Cantaloupe de distintos puntos de venta (Según la NOM-114-SSA1). ....	67



8.9. Análisis estadístico.....	67
9. RESULTADOS.....	77
10. DISCUSIÓN.....	83
11. CONCLUSIONES.....	90
12. PERSPECTIVAS.....	91
13. LITERATURA CITADA.....	92
14. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	105

**LISTA DE TABLAS**

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Distribución de serotipos de <i>Salmonella</i> , según la muestra, México 1972-1999.....	38
2. Medidas de tendencia central de las edades de los consumidores en la prueba triangular.....	62
3. Determinación cuantitativa del contenido de taninos hidrolizables, condensados y totales en el extracto acuoso de cáscaras de nuez.....	77
4. Concentraciones probadas contra <i>Salmonella Typhi In vitro</i> para la determinación de la CMB.....	78
5. Respuestas de la prueba triangular.....	79

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Diagrama de flujo del proceso de comercialización de melón.....	29
2. Ácido gálico como unidad estructural de los taninos hidrolizables.....	49
3. Reacción de depolimerización oxidativa para la obtención de antocianidinas, cuantificación de taninos condensados.....	50
4. Tubos con una muestra de extracto acuoso de cáscara de nuez, a la izquierda; extracto crudo. A la derecha, concentración ajustada a la CMB <i>In vitro</i> .....	61
5. A la izquierda puede observarse un melón con tratamiento, a la derecha un melón no tratado.....	62
6. Muestras para la prueba triangular, al centro la muestra tratada con el extracto acuoso de cáscaras de nuez por 5 min, rotación y agitación constante.....	63
7. Cuestionario aplicado en la prueba triangular.....	63
8. Cuestionario para el análisis sensorial del melón tratado vs. un melón sin tratar.....	65
9. Muestra del extracto acuoso de cáscaras de nuez.....	76
10. Efecto del tratamiento y control negativo sobre la población de <i>Salmonella Typhi</i> inoculadas artificialmente.....	79
11. Análisis genérico de las respuestas correctas en la prueba triangular.....	80

## RESUMEN:

El melón (*Cucumis melo*) es una de las hortalizas más producidas en el país, y en particular en la Comarca Lagunera. Se cultivan alrededor de 24 000 ha anualmente en todo el país y el 30% de dicha producción es exportada, principalmente a los Estados Unidos. En 2002 se detectó la contaminación de este producto con *Salmonella* sp. Este microorganismo es actualmente la causa más importante de brotes de gastroenteritis asociada a alimentos, causando anualmente 1.4 millones de casos y alrededor de 500 muertes tan solo en los Estados Unidos.

Debido a que el melón crece al ras del suelo y a su morfología, puede ser fácilmente contaminado con *Salmonella* sp. u otros microorganismos. Se sabe que al contaminarse el producto, este microorganismo puede alojarse en la cáscara (epicarpo) donde es capaz de vivir y reproducirse y donde resulta difícil eliminarlo. Debido a esto se han desarrollado estrategias para controlar la contaminación tales como el uso de agentes sanitizantes en el proceso de comercialización del producto. Estos agentes pueden ser productos químicos, los cuales pueden acumularse y ser residuales, alterando las características del producto. Por lo tanto, recientemente se ha optado por el uso de compuestos de origen natural que pueden ser alternativas efectivas contra este microorganismo sin alterar la calidad del producto.

Una fuente importante de compuestos polifenólicos es la cáscara de la nuez, que al ser considerada un desecho, pudiera ser empleada redituablemente. En el presente trabajo se empleó un extracto acuoso obtenido a partir de la cáscara de la nuez, como agente bactericida en contra de *Salmonella* Typhi, en la etapa de lavado del melón y se evaluó su capacidad antimicrobiana, *In vitro* y en el producto. Se obtuvo una muy buena actividad bactericida al emplearlo *In vitro* obteniendo una CMB de 4.3mg/ml. Por otra parte, al ser empleado directamente sobre el producto (4.3mg/ml) se obtuvieron

reducciones de hasta un log. Así mismo, se evaluó prevalencia de *Salmonella* en melón Cantaloupe de distintos puntos de venta en la ciudad de Saltillo, Coahuila, México, no se encontraron aislados positivos para *Salmonella* spp.

### ABSTRACT:

Cantaloupe melon (*Cucumis melo*) is one of the most produced fruits in Mexico, particularly in La Comarca lagunera. There are 24 000 ha harvested annually and the 30% of the production is exported, principally to the United States of America. In 2002 melons grown in México were found to be contaminated with *Salmonella* sp. This microorganism is nowadays the lead cause of gastroenteritis outbreaks due to foods, causing around 1.4 million of cases and 500 deaths annually, just in the United States.

Because melon is cultivated at ground level and its morphology, it can be contaminated with *Salmonella* sp. or any other microorganisms, it is well known once *Salmonella* reaches the surface, it can live and multiply itself therein. In addition, it results in a hard removing microorganism and there have been developed strategies to eliminate contamination of melons such as sanitizers, but these chemical products could get stuck and remain after the washing, changing the melon sensorial properties. It has been opted to use effective natural substances against *Salmonella* organisms and not-changing melon sensorial properties.

Pecan shell is a great source of natural antimicrobial agents and it is considered as a waste, resulting in a profitable tannin source. The aim of this work was to use an aqueous extract obtained of Pecan shell as an antimicrobial agent in the washing step in melon processing and to evaluate its antimicrobial effect *In vitro* and on Cantaloupe melon. The aqueous extract showed good antimicrobial effect against *Salmonella* Typhi *In vitro*, 4.3 mg/ml as MBC, in the other hand, using it onto Cantaloupe surface (4.3mg/ml) resulted in 1 log reductions in *Salmonella* population. In addition, prevalence of *Salmonella* organisms was evaluated in whole Cantaloupe melons acquired from different markets in Saltillo, Coahuila, México and no positive isolates were found.

## INTRODUCCIÓN:

El melón (*Cucumis melo*) es la más importante de las cucurbitáceas que se cultivan en México y una de las hortalizas más extendidas, ya que se siembran más de 24 000 hectáreas anuales. En el año 2006, tan solo la Laguna se sembraron más de 4 000 hectáreas con un rendimiento promedio de 25 toneladas por hectárea (Reyes-Carrillo *et al.*, 2007). Además, es una de las hortalizas que generan más divisas para el país pues alrededor del 30% de la producción se exporta, principalmente a los Estados Unidos debido a la cercanía geográfica, su competitividad en precio y calidad, y al descenso de la producción de esta especie en invierno en ese país. Se estima que para 2008 las exportaciones de melón mexicano al mercado estadounidense serán de 205.8 mil toneladas (Borrego *et al.*, 2001; Hernández-Martínez *et al.* 2006)

En mayo de 2002 se detectó la contaminación del melón Cantaloupe mexicano con *Salmonella enterica* Poona, por lo que Estados Unidos reforzó sus restricciones fitosanitarias para su ingreso al país. Ante esta problemática, el gobierno mexicano logró la reapertura de las exportaciones de melón en diciembre del mismo año (SAGARPA, 2003) aunque a finales de éste año y principios de 2003 la participación del melón mexicano se vio disminuida (SAGARPA, 2003).

La infección por *Salmonella* es de gran importancia en materia de salud pública debido al impacto socioeconómico que ocasiona. Se transmite principalmente por alimentos los cuales causan la mayor parte de los brotes que afectan a centenares de personas. Aunque puede ser causada por cualquiera de los casi 2 500 serotipos, los que se aíslan con mayor frecuencia en México son *Salmonella enterica* Enteritidis y *S. enterica* Typhimurium (Gutierrez-Gogco *et al.*, 2000).

Desde las década de los ochenta y en la actualidad, la incidencia de salmonelosis de origen alimentario ha aumentado considerablemente y continúa esta tendencia (Castillo et al., 2004). Este incremento es el resultado de una combinación de factores relacionados con el desarrollo en la industrialización en todas las fases de producción de alimentos, cambios en las prácticas del manejo de los alimentos, así como el almacenamiento, distribución y preparación de los mismos, dando como resultado una fácil diseminación de gérmenes patógenos en los alimentos (Gutierrez-Gogco *et al.*, 2000; Borrego *et al.*, 2001).

Hoy en día, algunas prácticas en la comercialización de melón involucran una serie de medidas preventivas para disminuir o eliminar la contaminación con microorganismos del producto, por ejemplo, cosechar los melones en las horas menos cálidas del día, mantenerlo en refrigeración, eliminar del melón el calor del suelo mediante aire frío o hidrefrigeración. Para eliminar de manera más efectiva los residuos de suelo se requiere un paso de lavado, donde suelen emplearse plaguicidas en solución en donde además los melones pueden ser sumergidos para eliminar microorganismos patógenos (Dimsey, 1995). Basándose en este principio, se podrían emplear sustancias de origen natural capaces de eliminar la contaminación por *Salmonella*. Un estudio reciente demuestra la efectividad de extractos provenientes de la cáscara de nuez (*Carya illinoensis*) en contra de algunos hongos patógenos y bacterias (Osorio, 2007).

Debido a la manera en que suelen contaminarse y el poco conocimiento acerca de mecanismos efectivos de erradicación de *Salmonella* en frutas, es inapropiado del todo afirmar la seguridad de los productos alimenticios, por esta razón, la investigación en este campo es una prioridad para la industria agronómica, inocuidad alimentaria y la comunidad de salud pública (CDC, 2005).



### **DEFINICIÓN DEL PROBLEMA:**

Se dice que anualmente, tan sólo en los Estados Unidos, los gastos causados por microorganismos patógenos, debido a incapacidad laboral, consultas médicas y tratamiento, retiro del mercado de alimentos contaminados y demandas ocasionadas por brotes alimentarios, ascienden a casi 7,000 mdd (Akins *et al.* 2008).

El melón es una de las hortalizas que generan divisas para México no sólo para quienes lo cultivan, sino también para quienes lo procesan, empaacan, distribuyen y lo expenden. Además el 30% de la producción nacional se exporta, principalmente a los Estados Unidos (Borrego *et al.*, 2001).

En mayo de 2002 se detectó la contaminación del melón Cantaloupe mexicano con *Salmonella* Poona en los Estados Unidos y en Canadá, por lo que Estados Unidos reforzó sus restricciones fitosanitarias para su ingreso al país, trayendo como consecuencia una disminución muy significativa en la demanda de tal producto en aquel país, reflejándose en grandes pérdidas económicas para los productores de dicha hortaliza (SAGARPA, 2003).

Actualmente la incidencia de *Salmonella* en brotes asociados a alimentos va en aumento y debido a las repercusiones de este microorganismo en materia de salud pública e inocuidad alimentaria es necesario implementar medidas y optimizar el proceso de comercialización, no sólo del melón, sino de frutas y vegetales para eliminar posibles riesgos microbiológicos y grandes pérdidas económicas para la industria agrícola, de ahí el presente estudio.

## JUSTIFICACIÓN:

Actualmente se emplean agentes químicos para eliminar y/o reducir la contaminación microbiana en el proceso de lavado en las plantas de comercialización de melón Cantaloupe. Comúnmente para esto se emplean compuestos clorados que pueden interaccionar con la materia orgánica presente en la superficie reticulada del melón y dar origen a radicales libres, compuestos considerados peligrosos por su capacidad para causar cáncer (Parish *et al.*, 2003; Ruiz-Cruz *et al.*, 2007).

La tendencia actual es el uso de agentes de origen natural, tales como extractos de plantas para eliminar la contaminación por microorganismos de la superficie de frutas y vegetales (Raybaudi-Massilia, 2006; Guillier *et al.*, 2007). Una fuente redituable de compuestos (taninos), capaces de inhibir el crecimiento de estos microorganismos, es la cáscara de nuez por su carácter de desecho industrial y la asequibilidad de este recurso en la región (Villarreal-Lozoya *et al.*, 2006; McEachern y Stein, 1990).

Existen reportes que demuestran la actividad *In vitro* de dichos compuestos provenientes de plantas en contra de bacterias y hongos fitopatógenos, sin embargo, a la fecha existen pocos estudios que demuestren el efecto de estos compuestos, aplicados en un modelo alimenticio.

**HIPÓTESIS:**

Los compuestos polifenólicos provenientes de la cáscara de nuez inhiben el crecimiento de *Salmonella* sp. *In vitro* y sobre el modelo alimenticio aplicado en el proceso de comercialización del mismo.

**OBJETIVO GENERAL:**

Formular un producto a partir de cáscaras de nuez aplicable en la etapa de lavado, en el proceso de comercialización de melones, para eliminar la contaminación por *Salmonella* sp.

### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Extraer químicamente los compuestos de interés a partir de las cáscaras de nuez, así como determinar cualitativa y cuantitativamente los taninos hidrolizables y condensados presentes en los extractos.
- Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) *In vitro* del extracto de las cáscaras de nuez.
- Formular y evaluar la capacidad bactericida del extracto contra *Salmonella* sp. en un modelo alimenticio.
- Evaluar los efectos sobre la calidad del producto debido al extracto aplicado.
- Evaluar la prevalencia de *Salmonella* spp. en melón de diferentes locales comerciales en Saltillo, Coahuila, México.

## ANTECEDENTES:

### 7.1. Generalidades acerca del melón

El melón (*Cucumis melo*), cuya parte comestible es un fruto maduro, tiene mucha demanda en todo el mundo, fundamentalmente en la época calurosa, debido a sus cualidades nutricionales y refrescantes. Otros usos que le son atribuidos son propiedades medicinales, tales como diurético y demulcente, entre otras. Dentro de la familia de las cucurbitáceas, ocupa el tercer lugar en importancia por la superficie sembrada que ocupa. Es una especie cultivada en diferentes zonas de la geografía mundial, fundamentalmente en climas cálidos y no demasiado fríos, pues es muy sensible al daño por frío (PMA/UFFVA, 2005). Debido a la amplia gama de altitudes en que se cultiva tanto en el continente americano como en el viejo mundo, ha dado como resultado una gran diversidad morfológica de sus semillas y frutos. El melón es originario de África y Asia. Se considera que su cultivo se remonta a 2,400 años antes de la era cristiana en el territorio egipcio. Al inicio de la era cristiana el melón ya era conocido y quizá provenía de la India, Sudán o los desiertos iraníes; 300 años después estaba extendido en Italia. Durante la Edad Media, desapareció del sur de Europa, con excepción de España. En América fue introducido desde 1516 en la región centroamericana, mientras que en América del norte fue después de 1600 (SIAP, 2002; CONABIO, 2005).

Esta especie se cultiva en varios tipos de suelo, aunque prefiere aquellos de textura media y arenosos, ricos en materia orgánica, con buena aireación y pH comprendido entre 6 y 7. Deben ser suelos bien drenados, ya que los encharcamientos son causantes de asfixia radicular y podredumbre de los frutos, esta especie tiene una moderada tolerancia a la salinidad tanto del suelo, como del agua de riego, aunque el

incremento en la salinidad repercute en la disminución de la producción (CONABIO, 2005).

Esta planta presenta tallos gruesos, hojas pecioladas, pecíolos de 2.3-10.0 cm de largo o más, ligeramente engrosado. Presenta flores amarillas, monoicas, estaminadas en fascículos; pedicelos 0.4 – 1.8 cm de largo, 0.3 – 0.4 cm de ancho, campanulado, usualmente tomentoso; pétalos ovalados, agudos, obtusos. Presenta diferentes épocas de floración con base a la región de cultivo y a la variedad cultivada. Los granos de polen son grandes, pegajosos y pesados, por lo que no pueden ser transportados por el viento, siendo necesaria la participación de insectos para el transporte del polen. Se tiene reportado que la distancia de dispersión por parte de los insectos no es muy amplia, siendo la mayor distancia entre 800-1000 m a partir del centro de la congregación (CONABIO, 2005). El uso de abejas, en especial *Apis mellifera* (Suslow, 2004), promueve ampliamente el grado de polinización, dando como resultado un rendimiento de hasta 40 toneladas de producto / hectárea. Aun cuando se sabe el comportamiento productivo de las colmenas, existen muchas interrogantes en la polinización de los cultivos que no han podido ser dilucidadas (Reyes-Carrillo *et al.*, 2007).

Los frutos son de tamaño y forma variable pueden ser esféricos u ovoides aunque algunas variedades presentan frutos elipsoidales. La cáscara (epicarpo) es un tanto engrosada y suave como durable y perecedera, con patrones de coloración muy variables, de verde claro a verde oscuro, amarillo a pardo o blanco, glabros, lisos a rugoso-reticulados; la pulpa (mesocarpo) es abundante carnosa y de coloración de blanca a amarilla, naranja a rosado o verde. Su sabor va de ligeramente dulce a muy dulce (CONABIO, 2005).

El melón presenta diferentes épocas de fructificación con base a la región del cultivo y a la variedad cultivada. En México, durante la temporada primavera-verano inicia en septiembre-octubre y en temporada otoño-invierno a partir de febrero. Se tiene reportado que el número de frutos oscila entre 1 y 6 por planta, aunque se menciona un promedio general de 3 frutos por planta (CONABIO, 2005).

Las semillas de esta especie son amarillas, blanquecinas o color pardo claro, el color del margen no es diferenciado del centro de la semilla. Se reporta que el número de semillas por fruto es aproximadamente de 400. Por ser un fruto carnoso e indehisciente, necesita de un mecanismo para romper la cáscara rígida que presenta. Por tratarse de una planta cultivada, en la mayoría de los casos el hombre es quien dispersa la semilla a otros ambientes. La viabilidad de las semillas dependerá de las condiciones ambientales y del origen de la semilla, y puede ser desde unas semanas hasta 5 años (CONABIO, 2005).

La siembra en el cultivo a cielo abierto es en forma directa y puede ser en forma mecánica o manual, se depositan de dos a tres semillas por golpe y a una profundidad de 2 – 3 cm. El porcentaje o índice de germinación estará determinado por las condiciones ambientales, de humedad, temperatura y de oxígeno. Para esta especie se reporta un porcentaje de germinación que oscila entre 60 y 100%, cuando existen condiciones adecuadas. La germinación se lleva a cabo cuando el suelo alcanza una temperatura de 22-30°C, durante el desarrollo vegetativo de la planta debe mantenerse una temperatura de 25-30°C y para la floración de 20-25°C (CONABIO, 2005).

## 7.2. Problemas relacionados con la calidad y la seguridad del melón

Esta especie es susceptible a diversas plagas y enfermedades. Algunos virus que suelen infectarle son: mosaico del zucchini, mosaico del pepino, mosaico de la sandía y mosaico del tabaco. Los síntomas en la hoja son; mosaico con abollonaduras, filimorfismo, amarilleo con necrosis en limbo y pecíolo, en el fruto; abollonaduras, reducción del crecimiento, malformaciones (CONABIO, 2005).

*Erwinia carotovora* es la causante de la podredumbre blanda, dicha bacteria penetra por heridas en el fruto e invade tejidos medulares, provocando podredumbres acuosas y blandas que suelen desprender olor nauseabundo, esta capacidad para producir dicha sintomatología está dada por la capacidad que tiene esta bacteria de producir y secretar enzimas (pectinasas, celulasas y proteasas) capaces de degradar la pared de las



células vegetales (Thomson *et al.*, 1999). Esta bacteria tiene gran capacidad saprofítica, por lo que puede vivir en el suelo, agua de riego y raíces de malas hierbas. Las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, son altas humedades relativas y temperaturas entre 25 y 35°C (CONABIO, 2005). La presencia de esta bacteria en los campos productores de hortalizas trae consigo fallas en la siembra y grandes pérdidas de cosechas, así como una problemas para la aceptación del producto afectado al momento de ser comercializado (García, 2000).

Se tiene reportado que diversas especies de vertebrados ocasionan daños a los cultivos de melón, entre los que destacan aves, topes, ratas, ratones, liebres, conejos, etcétera. Para la región de la comarca Lagunera, destaca la presencia de tres vertebrados importantes sobre el cultivo: 1) Ratón campesino (*Apodemus* spp.); quien se alimenta de las semillas, principalmente por su valor nutricional y asequibilidad, de siembras directas con un daño de alrededor del 50 al 60%, siendo el mejor método de control la prevención debido a la ubicuidad de este roedor (Arrizabalaga y Torre; CONABIO, 2005). 2) Rata de campo (*Rattus* spp.) quien ataca los frutos, con daños mayores al 20%, el control de este depredador es con la aplicación de cebos envenenados, rodenticidas y trampas a la orilla del camino (CONABIO, 2005). 3) Tuzas (*Thomomys* spp.) quienes causan daño a las raíces por alimentarse de ellas, provocando a veces la muerte de la planta aunque no inmediatamente, estos herbívoros tienden a desenterrar las raíces, corarlas en pequeños trozos y acarrearlas en sus mejillas hasta su madriguera (CONABIO, 2005; Keinath y Beauvais, 2006), por ello se recomiendan varios tipos de trampas y/o la utilización de venenos para un buen control (CONABIO, 2005). Además de causar daños a los cultivos de melón, estos vertebrados pueden acarrear consigo parásitos, tales como pulgas que son vectores de los virus que dañan a este producto y acarrear además bacterias y protozoarios (Arrizabalaga y Torre).

Existen reportes que argumentan la capacidad de algunas serovariedades de *Salmonella* de infectar al nematodo *Caenorhabditis elegans*, un microbióvoro de vida libre que se alimenta principalmente de bacterias, aunque pueden alimentarse prácticamente de cualquier cosa a su alcance, usualmente adquiere bacterias al ingerir

agua contaminada y puede expulsarla en otros lugares al cambiar de posición (Santander *et al.*, 2003; Caldwell, *et al.*, 2003). Dicho nematodo puede ser infectado y llevado a la muerte por *Salmonella* Typhimurium, Enteritidis y Dublin, y por el contrario, puede ser infectado sin ocasionar la muerte por *Salmonella* Typhi, que es considerado un patógeno obligado de humano, esto limita el estudio de los mecanismos patogénicos o de virulencia de esta bacteria debido a que no hay posibilidad de emplear otros modelos celulares o animales (invasión celular y resistencia en el hospedero) (Santander *et al.*, 2003), sin embargo, este nematodo al ser ingerido por el ser humano resulta inofensivo, pero puede servir como vector o acarreador de varios patógenos entéricos que son protegidos, mientras se encuentran en el interior de su reservorio, contra tratamientos usuales para la desinfección de frutas y vegetales (Caldwell *et al.*, 2003).

Otro problema con el cual se enfrentan los productores de melón es la contaminación de la superficie del melón con heces de reptiles. *Salmonella* Poona, es la cepa de origen no humano mayormente aislada de reptiles, en especial de tortugas e iguanas, las cuales se comportan como portadores asintomáticos. Ésta se considera endémica, pues la mayor parte de las iguanas la porta en su tracto intestinal, el hábitat natural de *Salmonella*. Estas bacterias son liberadas al medio ambiente (en especial al suelo, al agua y a los alimentos) cuando se expulsa por vía fecal. Las frutas y vegetales pueden contaminarse, no sólo con *Salmonella*, sino con otros agentes patógenos intestinales (Figueroa *et al.*, 2005).

### 7.3 El melón mexicano; panorama actual

Las tendencias en cuanto a nutrición a nivel mundial enfatizan el consumo de frutas, vegetales y cereales, y por el contrario, minimizan el consumo de carnes y comidas que poseen un alto contenido en grasas, otro factor que influye de manera significativa en los hábitos alimenticios es que las personas tienden a desarrollar un modo de vida más acelerado que en décadas anteriores (Akins *et al.*, 2008). En México, el consumo de melón ha mostrado una tendencia alcista, hacia el año 2000 el consumo per cápita al año era de 3.67 Kg, mientras que para el 2006 tuvo un incremento considerable pues se consumían 4.72Kg (SAGARPA, 2008a).

Desde hace 75 años, el melón mexicano ha mantenido su importancia en el mercado internacional por su calidad. Generando una alta derrama económica en las zonas de cultivo, en donde beneficia a quienes lo manejan, empacan y comercializan, es el tercer producto agropecuario en la captación de divisas por exportación en el país (Borrego *et al.*, 2001; SIAP, 2002).

Una ventaja competitiva para nuestro país, es que la cosecha del melón mexicano también se lleva a cabo en la época en la que otros países competidores están fuera del mercado debido a su ubicación geográfica. Esto nos ha colocado en el segundo lugar como exportador mundial después de España, y por supuesto el proveedor más importante de los Estados Unidos, quien además de ser el mayor productor es el principal importador (SIAP, 2002). En 2006, en México se produjeron 556,480.06 toneladas, ascendiendo a un valor de 1,590,359.35 de pesos la producción de ese año en el país (SAGARPA, 2008b).

Las principales regiones productoras de melón en México, se concentran, en el caso de Michoacán, en Nueva Italia, El Aguaje, Pucacán, Las Cruces y Tepalcatepec; en Sonora en la Costa de Hermosillo; en Jalisco en el Distrito de Tomatlán, en Colima en Ixtlahuacán y en Durango y Coahuila, en la Comarca Lagunera (SIAP, 2002).

Debido a la diversidad de climas existentes en el país, el melón se produce todo el año, aunque no es uniforme, pues generalmente, la mayor cantidad se cosecha en el ciclo otoño-invierno (SIAP, 2002; SAGARPA, 2003).

Gracias al crecimiento de la producción mundial de melones, el comercio internacional ha podido mantener una tendencia alcista. Los principales demandantes de la hortaliza son Estados Unidos, Reino Unido, Canadá, Alemania y Holanda, cuyas importaciones representan aproximadamente 67% del total mundial. De los principales abastecedores de melones destacan por su importancia España, México, Estados Unidos, Costa Rica y Honduras (SIAP, 2002).

La demanda nacional es cubierta en gran medida por la Comarca Lagunera, en donde en 2006 se produjeron 109,670.07 toneladas en 4,043.75 hectáreas, generando un valor de producción que ascendió a los 218,78.42 miles de pesos (Espinoza-Arellano, *et al.*, 2005; SAGARPA, 2008c). En esta región la producción aparece en el mercado durante el ciclo primavera-verano, pues en la mayoría de las regiones productoras del país se cultiva principalmente en el otoño e invierno, que es el la época de mayor venta al extranjero, y envían al interior del país solamente aquellos saldos que no lograron colocar en otro país. La producción de la Comarca Lagunera, a pesar de tener gran calidad, no sale del país o lo hace esporádicamente, por coincidir con la del Valle de Texas, California y Arizona, además de que los aranceles durante su época de producción son demasiado altos (SIAP, 2002).

#### 7.4. Proceso de comercialización del melón

Para la comercialización del producto (Figura 1) se debe tomar en cuenta cuales son los requerimientos del consumidor final, dígase tamaño, forma, sabor, color, textura, aroma, entre otros. En la medida que se logre conjuntar estos requerimientos con una buena variedad de melón, la rentabilidad del mismo cultivo será más aceptable (SAGARPA, 2003).

### Canales de comercialización de melón en México

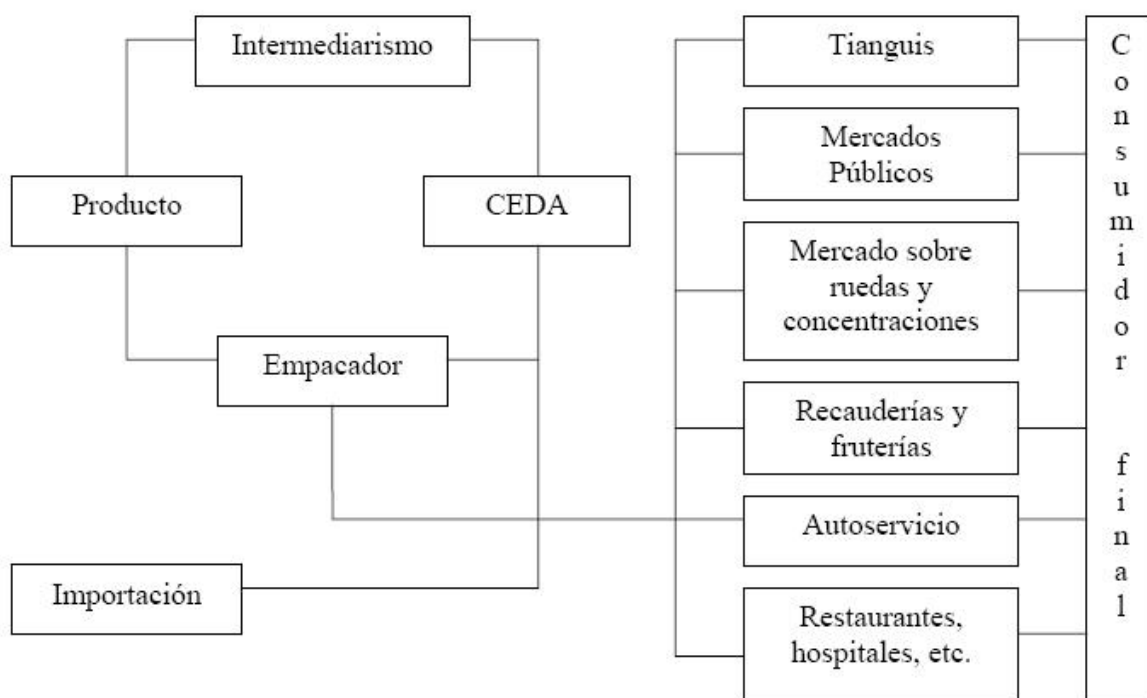


Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de comercialización de melón.

A continuación se describe el proceso de comercialización a nivel industria melonera, tomando en cuenta algunas opciones variantes en el mismo:

#### 7.4.1 Cosecha

A partir del día sesenta, después de la siembra inicia el desarrollo del fruto, este lapso puede ser menor o mayor dependiendo de la variedad y de la región del cultivo, una vez transcurridos los ochenta días a partir de la siembra termina el desarrollo del fruto, aunque este lapso puede variar. La madurez comercial es el estado en el que se encuentra el fruto al momento de ser requerido por el mercado, en este caso, corresponde al estado firme-maduro o “3/4 desprendido”, que se identifica cuando al cortar la fruta suavemente, ésta se desprende de la planta. Los melones cantaloupe maduran después de la cosecha, pero su contenido de azúcar no aumenta. Los frutos de esta especie se recolectan en diversos estados de madurez fisiológica, sin embargo

pueden estar inmaduros o en proceso de maduración para el consumo, se recomienda consumir los frutos tan pronto como sea posible después de su cosecha (Parnell *et al.*, 2003; CONABIO, 2005).

La fecha de cosecha varía dependiendo del inicio de la siembra, sin embargo, es común que se presente a los 3-4 meses de haberse sembrado. En México, el cultivo es esencialmente anual y por temporadas, por lo que el lapso de cosecha a siembra es de aproximadamente 5-7 meses, teniendo el terreno una temporada de reposo, aunque se ha reportado reposo hasta de cuatro temporadas en un mismo terreno (CONABIO, 2005).

En México se tiene registrado áreas de cultivo de esta especie para los estados de Baja California, Baja California Sur, Campeche, Coahuila, Colima, Chiapas, Chihuahua, Durango, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Quintana Roo, Sonora, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (SAGARPA, 2003; CONABIO, 2005).

Este producto es altamente perecedero y tiene solamente algunas semanas de vida de anaquel. Al momento de arribar al punto de venta debe hacerlo en las mejores condiciones para mantener sus características hasta el momento en que el consumidor lo adquiere, para lograr un producto de calidad debe darse el mejor cuidado post-cosecha posible. Estos cuidados resultarán en el retardo del tiempo de maduración, así como daños aparentes, incrementando la vida de anaquel (Dimsey, 1995).

El melón debe cumplir con las siguientes características al momento de la cosecha, para su posterior comercialización, según la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación:

- Debe presentarse entero.
- Sano: excluyéndose los afectados por la podredumbre o grandes alteraciones.
- Limpio: sin materias extrañas visibles incluyendo la ausencia en éstas de abonos y otros productos químicos.

- Exento de humedad exterior anormal.
- Sin olores ni sabores extraños.
- Con la forma y el color característicos de la variedad y sin manchas producidas por el sol.
- Con sus pedúnculos cercanos y sin heridas o lesiones no cicatrizadas, además sin deformaciones que puedan afectar su conservación, ser comestible y de aspecto fresco.
- Con un desarrollo y estado de madurez que les permita soportar su transporte y manipulación, para que puedan llegar en condiciones satisfactorias al lugar de destino (SAGARPA, 2003).

En base a sus características los melones pueden ser clasificados en dos categorías; de primera o selecta y de segunda o estándar. Los frutos de primera poseen una presencia esmerada de buena calidad, bien desarrollados, exentos de grietas y magulladuras. Los frutos de segunda, son aquellos que no alcanzan los requerimientos de la primera categoría. Poseen ligeros defectos de forma, coloración de la corteza ó pulpa y pueden presentar daños causados por parásitos y ligeras fisuras que no alcancen la pulpa (SAGARPA, 2003).

Al momento de cosechar el producto, existen factores que van a determinar la calidad y la vida de anaquel del producto, estos son; temperatura, métodos de manejo, control de plagas, empaque y presentación (Dimsey, 1995).

#### 7.4.2 Pre-enfriado

La temperatura es un factor vital en la calidad del fruto. Cada aumento de 10°C en el fruto lleva a un incremento de la respiración a razón de 2-3 veces. Esto acelera la maduración, incrementa la pérdida de humedad reduciendo la calidad y la vida de almacén. El fruto debe ser empacado y refrigerado en menos de 24 horas para mantener la temperatura ideal del producto (Parnell *et al.*, 2003; Dimsey, 1995).

Es recomendable realizar la cosecha del melón cuando la temperatura del día es más baja, por las mañanas, especialmente en los frutos destinados para exportación o con un tiempo de almacenamiento largo. Una vez cosechados, deben mantenerse refrigerados (no menos de 2°C) e idealmente mantenidos en cuarto frío. Deben mantenerse fuera del alcance de los rayos solares antes de su empaque. Resulta indispensable un manejo cuidadoso del producto debido que se daña fácilmente y puede agrietarse lo cual puede proveer sitios ideales para el crecimiento de microorganismos patógenos o detractores de la fruta. Este producto debe ser colocado en cubos o transportadores y no debe ser arrojado. Además, deben colocarse en superficies planas, aquellas superficies rugosas pueden mellarlo a causa de su propio peso (Dimsey, 1995).

Para maximizar el tiempo de almacén y la vida de anaquel es importante remover el calor que guarda del suelo tan rápido como sea posible. Antes de clasificarlo y empacarlo, el producto debe ser enfriado a por lo menos 15°C en un plazo de 8 horas después de la cosecha. Los métodos más efectivos de pre-enfriamiento son aire forzado o refrigerado por hidrogenfriado (este último resulta más caro). Estos métodos son rápidos y permiten el manejo de grandes cantidades de fruta. Existe otro método más barato pero menos efectivo, lavado con vapor de agua frío, recomendado para industrias procesadoras donde hay poca humedad (Dimsey, 1995).

#### 7.4.3. Lavado

El lavado es uno de los pasos más importantes durante el proceso de comercialización, después de escoger y enfriar los melones, deben ser lavados para remover restos de suelo y abono y algunos microorganismos de su superficie. El suelo y abono pueden evitar que los agentes sanitizantes en solución no se impregnen correctamente o pueden removerlos, reduciendo la efectividad de los mismos. El lavado puede realizarse antes de clasificarlos, en la línea de producción por aspersion o por inmersión en cubas (Dimsey, 1995; Ruiz-Cruz *et al.*, 2007).



#### 7.4.4. Línea de clasificación

Una clasificación uniforme en cuanto a tamaño y madurez es importante para un empaqueo de calidad. Este proceso puede realizarse en cintas transportadoras de rodillos o en cintas transportadoras especiales para clasificar el producto por peso. Debido a la variedad de formas del producto debe considerarse un sistema que no dañe al producto (Dimsey, 1995).

#### 7.4.5. Empacamiento

Existe una amplia gama de empaques que difieren en forma y materiales. El tipo de empaque depende principalmente del mercado hacia dónde va destinado. Los empaques y etiquetas son importantes para presentar atractivamente el producto, pero la función primordial es protegerlo. Los melones destinados a exportación deben presentarse en empaques que lo mantengan íntegro, a pesar de las condiciones de transporte, y que cumplan con los requerimientos del mercado hacia dónde va destinado (Dimsey, 1995; SAGARPA, 2003).

El tipo de empaque más recomendado es el “apretado”, pero sin llegar al apretado exagerado que provoca magullamientos o que permite el movimiento de los melones en la caja, sino un apretado firme que no permita el movimiento de los melones durante el transporte (SAGARPA, 2003).

#### 7.4.6. Almacenaje después del empaqueo

Posterior al empaque, el producto debe ser enfriado y refrigerado lo más pronto posible. Aún si el producto es refrigerado antes del empaqueo, la temperatura interna de la fruta habrá aumentado significativamente durante la clasificación. Un enfriado rápido y una refrigeración constante alargarán la vida de anaquel del producto. Las temperaturas de almacenamiento y los tiempos varían para los diferentes tipos de melón,

el melón Cantaloupe será almacenado por 2-3 semanas a 2-4°C (Dimsey, 1995; SAGARPA, 2003).

#### 7.4.7. Transporte

Para el traslado del melón a Estados Unidos, que es el principal mercado, se utiliza el camión frigorífico. Para el caso de Europa, lo más recomendable es el transporte marítimo, por sus bajos costos, en donde se deben manejar condiciones de frío óptimas, a fin de que el producto llegue en condiciones adecuadas para su comercialización (SAGARPA, 2003).

Los vehículos frigoríficos deben llevar una temperatura interior igual o menor a 2°C. Para el transporte menor a seis días se recomiendan temperaturas entre 4°C y 10°C. Para el mercado nacional se envía generalmente en camión con hielo encima, mientras que el de exportación se envía en camiones termo. Los costos de transporte son un factor que influye en gran medida sobre el precio (SAGARPA, 2003).

#### 7.5. *Salmonella*: generalidades

Las bacterias del género *Salmonella* son bacilos cortos, negativos a la tinción de Gram (Calva, 2001). No forman esporas, anaerobios facultativos, estrechamente relacionados morfológica y fisiológicamente con los otros géneros de la familia Enterobacteriaceae, a la que pertenecen. A excepción de la serovariedad Gallinarum-Pollorum, son móviles gracias a sus flagelos peritricos. Estos microorganismos crecen en un amplio rango de temperatura (7 – 48°C) a un pH entre 4 y 8, y con actividades de agua (aw) por debajo de 0.93 (Uribe y Suárez, 2006).

Al crecer bajo condiciones de aerobiosis o anaerobiosis, dirigen sus rutas metabólicas de una variedad de respiración ó un proceso fermentativo. Aeróbicamente, el oxígeno sirve como aceptor final de electrones, mientras que anaeróbicamente son aceptores de la cadena respiratoria, como nitrato, nitrito, fumarato o dimetilsulfóxido

(Contreras *et al.*, 1997). Fueron descubiertas por un científico estadounidense, el Dr. Daniel E. Salmon. Estas bacterias viven en el tracto intestinal de los humanos y otras animales, particularmente los reptiles (USDA, 2007).

La nomenclatura del género *Salmonella* es compleja y ha variado continuamente, desde el concepto inicial serotipo-especie propuesto por Kaufmann en 1966 basado en los antígenos de superficie (Uribe y Suárez, 2006). Actualmente consiste de una sola especie, que ha sido denominada *Salmonella enterica*. Ésta a su vez, está formada por siete subespecies, dependiendo de su capacidad para realizar diferentes reacciones bioquímicas. Esta subdivisión ha sido apoyada por varios métodos de hibridación ADN/ADN y métodos serológicos. Cada subespecie, a su vez, está subdividida en serotipos o serovares, de acuerdo al antígeno H (flagelar: del alemán *hauch*, “por el halo producido en un medio de cultivo a raíz del movimiento”) y O (somático: del alemán *ohne hauch*, “sin movimiento”) (Calva, 2001).

Se ha utilizado la electroforesis multilocus de enzimas (MLEE) para caracterizar diferentes cepas bacterianas. En este método se separan por electroforesis los componentes de un extracto celular, bajo condiciones adecuadas. Así, la actividad de veinte o más enzimas puestas a prueba son asociadas a una banda de proteínas que migra en el gel, de acuerdo a su tamaño. Las variaciones en el genoma de la bacteria pueden reflejarse en alteraciones de una o más enzimas, por lo que pueden obtenerse electroferotipos, o patrones de migración específicos de cepa (Calva, 2001).

Otra manera de clasificar a estas bacterias es por electroforesis en campos pulsados (PFGE). En este método, se digiere el genoma de la bacteria con una enzima de restricción de corte poco frecuente, es decir, produce fragmentos grandes de ácido desoxirribonucleico (ADN). Estos fragmentos son separados por electroforesis en gel, bajo un campo eléctrico pulsado, lo que hace que el ADN tome diferentes orientaciones alternas durante la migración. Esta metodología mostró que el cromosoma de *S. Typhi* es mucho muy variable, fluctuando en tamaño entre 3.96 y 4.92 Mb (Calva, 2001).

El análisis de plásmidos o moléculas circulares de ADN con replicación autónoma al cromosoma, que se transfieren de manera horizontal entre bacterias, y que codifican para resistencia a antibióticos o factores de virulencia, ha revelado que la gran mayoría de las cepas de *S. Typhi* carecen de ellos. Solamente aquellas cepas con resistencia múltiple a antibióticos las poseen, y éstas han aparecido esporádicamente aunque su presencia se ha incrementado en los últimos años. Lo cual, dificulta de manera importante a una clasificación, o tipificación de *Salmonella* por perfil de plásmidos (Calva, 2001).

La estructura del cromosoma y el orden génico entre algunas cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella* Typhimurium están muy conservados, aunque con algunas diferencias. Hay segmentos presentes en una pero no en la otra bacteria. El significado biológico de estas peculiaridades en el genoma de *Salmonella* permanece siendo un misterio (Calva, 2001).

#### 7.6. *Salmonella* como patógeno de humanos

Las bacterias del género *Salmonella* causan una enfermedad conocida como gastroenteritis o salmonelosis. Anualmente se reportan 1.4 millones de casos de salmonelosis implicada a alimentos y más de 500 muertes tan sólo en los Estados Unidos. La familia *Salmonellae* incluye cerca de 2 500 serotipos, los más comunes involucrados en infecciones son *Salmonella enterica* Enteritidis y *Salmonella enterica* Typhimurium, responsables de la mitad de infecciones diarreicas en humanos reportadas al año en los Estados Unidos y los más comúnmente aislados de humanos en México (Tabla 1) (Gutierrez-Cogco *et al.*, 2000; Calva, 2001, World Health Organization, 2005). Existen otros serotipos asociados a animales, inoocuos para ellos, que pueden enfermar a los seres humanos. Generalmente estas bacterias pasan desde las heces de las personas o animales infectados hacia otras personas o los alimentos. Estas bacterias al estar presentes en los alimentos usualmente no afectan el sabor, olor o apariencia de estos, asimismo, puede reproducirse en ellos (USDA, 2007).

Un estudio reciente del programa activo de investigación de enfermedades transmitidas a través de los alimentos identifica a *Salmonella* como la infección bacteriana más comúnmente reportada (42% *Salmonella*, 37% *Campylobacter*, 15% *Shigella*, 2.6% *E. coli* y 3.4% otros como *Yersinia*, *Listeria* y *Vibrio*) (USDA, 2007).

A finales de la época de los 90's, la incidencia de salmonelosis en México registraba cifras de 223.53 casos por cada 100 000 habitantes, con una mayor frecuencia en los grupos de 15 a 24 años, de 25 a 44 años y el grupo de 45 a 64 años, fue el segundo más afectado. En cuanto a la distribución estacional, ésta se intensifica a partir de los meses de abril y mayo alcanzando un pico en julio, con una disminución en septiembre y octubre. Los estados más afectados históricamente han sido Tabasco, Coahuila, Chiapas y Quintana Roo (Gutierrez-Cogco *et al.*, 2000).

*Salmonella* Typhi puede causar, también, una enfermedad conocida como fiebre tifoidea en humanos, quienes son sus únicos hospederos. La fiebre tifoidea prevalece en países en vía de desarrollo, donde normalmente significa un reto a las autoridades en materia de salud pública. Hay aproximadamente 17 millones de casos anuales con casi 600,000 muertes, principalmente en Asia y África. Las más altas incidencias han sido reportadas en Indonesia y Papúa Nueva Guinea, donde alcanza niveles de 1,000 por cada 100,000 habitantes. En México, la incidencia es de 10 por cada 100,000 habitantes (Calva, 2001).

El periodo de incubación abarca de una semana a un mes, siendo principalmente dos semanas, a partir del consumo del alimento o agua contaminada. No siempre ocurre una diarrea, generalmente las bacterias entran en circulación al torrente sanguíneo, causando fiebre cíclica acompañada de escalofríos, convulsiones y delirio. Pueden ocurrir desenlaces fatales, por otra parte, pueden desarrollarse cuadros de portador sano, excretando continuamente bacterias al ambiente (Calva, 2001).

Serotipo	Humano	No-Humano	Total
Typhimurium	3,225	578	3,803
Enteritidis	2,893	570	3,463
Typhi	1,128	34	1,162
Agona	866	643	1,509
Newport	865	235	1,100
Heidelberg	623	211	834
Anatum	608	748	1,356
Worthington	344	178	522
Infanatis	326	284	610
Muenchen	305	116	421
Orainenburg	281	229	510
Panama	229	87	316
Hadar	196	236	432
Saintpaul	195	135	330
Mbandaka	152	78	230
Senftenberg	129	238	367
Duesseldorf	126	82	208
Give	108	244	352
London	79	178	257
Bovismorbificans	74	125	199

Tabla 1. Distribución de serotipos de *Salmonella*, según la muestra, México 1972-1999 (Gutierrez-Cogco, 2000).

Estas bacterias pueden propagarse en los alimentos por contaminación cruzada, entre alimentos crudos infectados y alimentos listos para comer, al no llevarse a cabo una cocción adecuada de los mismos o por medio de una persona infectada manejando los alimentos con malas prácticas higiénicas. Cualquier alimento crudo de origen animal, así como frutas y vegetales pueden acarrear estas bacterias (USDA, 2007), virtualmente cualquier microorganismo patógeno puede estar presente, sin embargo, algunos patógenos altamente virulentos como *E. coli* O157:H7 o *Salmonella* son los que causan mayor preocupación (Brackett y Splittstoesser, 2001). Es de vital importancia llevar a cabo un buen manejo de los alimentos para prevenir que las bacterias en los alimentos crudos causen brotes epidémicos ya sea dentro o fuera del país (USDA, 2007). Se han reportado nuevos alimentos capaces de acarrear a estas bacterias, por ejemplo, los

huevos, en su cascarón. Aunque los alimentos con mayor incidencia siguen siendo los productos vegetales (Wallace *et al.*, 2001).

La dosis infectiva para desarrollar una salmonelosis varía de  $10^3$  a  $10^8$  UFC (Uyanik *et al.*, 2008). En la mayoría de las personas que enferman, experimentan diarrea, dolor abdominal y fiebre después de 8-72 horas de comer el alimento contaminado. Algunos otros síntomas no específicos que pueden presentar son, escalofríos, dolor de cabeza, náusea, vómito y deshidratación, afectando a individuos de todas las edades, aunque con mayor incidencia en menores de cinco años y mayores de 60 años. Los síntomas desaparecen usualmente en un plazo de 4-7 días. Muchas personas se recuperan sin tratamiento alguno, sin embargo, estas infecciones pueden poner en peligro la integridad de infantes, mujeres embarazadas y personas de edad avanzada, así como la gente con el sistema inmunológico débil (aquellos que padecen HIV/SIDA, cáncer, diabetes, enfermedades renales o pacientes transplantados), otros factores de riesgo, incluyen alteraciones de la flora normal (como resultado de una terapia antibiótica), hipoacidez gástrica (anemia perniciosa en infantes ó uso de antiácidos), cálculos biliares, aterosclerosis, esquistomosis, entre otros. Las defunciones por esta causa son raras; sin embargo, la morbilidad y los costos concomitantes de esta infección son altos (Uribe y Suárez, 2006; USDA, 2007).

Usualmente las personas que padecieron salmonelosis se recuperan completamente, aunque aproximadamente 5% de las personas con salmonelosis pueden desarrollar bacteremia y problemas serios y potencialmente mortales, aunque son más comunes en pacientes inmunocomprometidos (Uribe y Suárez, 2006). Otras posibles complicaciones que pueden desarrollarse incluyen, artritis reactiva (Quirós *et al.*, 2007), irritación en los ojos y dolor al orinar, sintomatología característica del síndrome de Reiter (USDA, 2007).

Se estima que desde finales de la década de los 90, tan solo en los Estados Unidos, los costos de hospitalización por salmonelosis ascendieron a 200 mdd (Uribe y Suárez, 2006) mientras que para el 2007, los costos referentes a las pérdidas económicas

debido a incapacidades, gastos médicos y demandas ascendieron a casi 7,000 mdd (Akins *et al.* 2008).

#### 7.7. *Salmonella* como causa de brotes epidémicos implicados a alimentos

Las bacterias del género *Salmonella* son la causa de infecciones alimentarias más frecuentemente reportada. Estas bacterias pueden llegar a contaminar frutas y vegetales debido al cultivo de estos productos en suelos infectados, riego con agua contaminada, contaminación con desechos humanos y animales infectados, principalmente. Debido a que los melones se cultivan al ras del suelo, su cáscara puede contaminarse fácilmente con desechos humanos y animales, así como por agua infectada. La industria del melón reconoce que una vez que el melón es contaminado, matar o eliminar los agentes patógenos es difícil dada la superficie rugosa del melón (Figuroa *et al.*, 2005; PMA/UFFVA, 2005). Además cuando el melón provenga de un cultivo exento de *Salmonella*, este puede llegar a contaminarse en la planta comercializadora (Akins *et al.*, 2008). Un estudio reveló que, en los hogares de los Estados Unidos, el 2.6, 1.6 y 1.8% de los melones, cilantro y lechugas, respectivamente, se encontraron contaminados con *Salmonella* spp. (Brandl y Mandrell, 2002).

En años recientes se han reportado varios brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Estados Unidos y Canadá, los cuales se relacionan con el consumo de melones cultivados en México. Como consecuencia de estos brotes, en mayo de 2002, Estados Unidos cerró la frontera al melón mexicano, lo que ocasionó una pérdida importante de ingresos a nuestro país (Figuroa *et al.*, 2005; Hernández-Martínez *et al.*, 2006).

Otros alimentos implicados a brotes epidémicos son; ensaladas verdes, bayas, tomates, lechuga y coles de Bruselas. El 50% de los brotes tienen origen en restaurantes o locales establecidos, el 13% en el hogar y el 57% restante en diferentes lugares como escuelas, trabajo, enfermerías y días de campo, entre otros (Smith DeWaal y Bhuiya, 2006). En base a estas estadísticas, y debido a la alza en la demanda de comida para



llevar ó lista para comer han aumentado el número de casos reportados y brotes de *Salmonella* y otros patógenos en alimentos (Akins *et al.*, 2008). Aún y sin haber reportes oficiales de brotes asociados a alimentos fermentados debido a *Salmonella* u otros patógenos, existen investigaciones que revelan la supervivencia y crecimiento de estas bacterias en dichos alimentos, debido principalmente a un fenómeno denominado “fortalecimiento por estrés” que consiste en un incremento de resistencia a la acidez, mediado por la expresión de genes análogos que codifican para proteínas de choque ácido y proteínas de secreción para contrarrestar el efecto del pH ambiental (Fleming, McFeeters y Breidt, 2001).

Recientemente se asociaron tomates procedentes de Baja California y la Florida en un brote de *Salmonella* que enfermó a 77 personas, entre mayo 11 y junio 8 de 2008, en 17 condados de Nuevo México, Estados Unidos. Ante estas circunstancias, fueron tomadas medidas precautorias por parte de las autoridades de salud pública, retirando del mercado los tomates contaminados y emitiendo a la población un comunicado con una lista de productores de tomates seguros (New Mexico Environment Department, 2008).

De acuerdo a los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), cada año, enferman 76 millones de personas y 5,000 mueren a causa de la ingestión de alimentos contaminados (Smith-DeWaal y Bhuiya, 2006). En los últimos trece años se han reportado catorce brotes involucrando melones Cantaloupe. Más de la mitad de esos brotes involucraban melones cortados pero que no eran consumidos inmediatamente, permitiendo el crecimiento de bacterias patógenas en la pulpa de este fruto (Akins *et al.*, 2008).

Para aislar e identificar a *Salmonella* en alimentos en México existe el método oficial, NOM-114-SSA1-1994.

Que consta de cinco pasos básicos:

- Preenriquecimiento, donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células de *Salmonella* dañadas a una condición fisiológica estable.
- Enriquecimiento selectivo, empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de *Salmonella* e inhibir otros organismos presentes en la muestra.
- Selección en medios sólidos, en este paso se utilizan medios selectivos que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y permite el reconocimiento visual de colonias sospechosas.
- Identificación bioquímica, este paso permite la identificación genérica de los cultivos de *Salmonella* y la eliminación de cultivos sospechosos falsos.
- Serotipificación, es una técnica serológica que permite la identificación específica de un cultivo (SSA, 1995).

El análisis de alimentos para *Salmonella* requiere métodos diferentes a aquellos empleados en los laboratorios clínicos. Generalmente, estas bacterias están presentes en menor número en los alimentos, requiriendo muestras más grandes que las que se emplean en los análisis clínicos por ejemplo, en relación 1:9 (muestra : caldo preenriquecimiento), aunque se recomienda una muestra igual o mayor a 25gr para aumentar la posibilidad de recuperar las bacterias presentes (Andrews *et al.*, 2001). Por lo tanto, el uso de grandes muestras y el número de bacterias presentes, al ser plaqueados directamente en medios selectivos resulta en una gran disminución de la selectividad de los medios (Wallace *et al.*, 2001). El uso de ambos pasos, preenriquecimiento y enriquecimiento selectivo, son indispensables puesto que las bacterias encontradas en los alimentos se encuentran en un estado fisiológico particular (estrés fisiológico) y se logrará la resucitación de los microorganismos debilitados. El análisis de estas muestras es meramente cualitativo, no puede ser empleado con fines cualitativos ya que sólo determina ausencia/presencia de *Salmonella* spp. en la muestra analizada, debido al uso de medios de preenriquecimiento y enriquecimiento (Sperber, Moorman y Freier, 2001).

Los brotes epidémicos de alguna enfermedad infecciosa resultan generalmente de la exposición a un microorganismo en común. Usualmente, el agente etiológico que causa un brote proviene de una célula cuya progenie es genéticamente idéntica o estrechamente relacionada. En términos epidemiológicos, los organismos involucrados en el brote son clonalmente relacionados, miembros de la misma especie, comparten factores de virulencia, patrones bioquímicos y características genómicas (Olive y Bean, 1999).

#### 7.8. Métodos empleados para reducir y/o eliminar contaminación microbiana en frutas y vegetales

Existe una gran variedad de métodos empleados para reducir las poblaciones de microorganismos en frutas y vegetales enteros y en trozos. Cada método tiene distintas ventajas y desventajas dependiendo el tipo del producto donde será aplicado, el protocolo de empleo, y otras variables. El mejor método para eliminar patógenos del producto es la prevención de la contaminación en las primeras etapas del proceso, sin embargo, esto no puede ser siempre posible y la necesidad de lavar el producto, así como sanitizarlo es de vital importancia para prevenir brotes epidémicos. Cabe mencionar que el lavado y sanitizado no son capaces de eliminar totalmente los microorganismos patógenos del producto contaminado, por ende, hay que emplear protocolos que resulten más eficientes (Parish *et al.*, 2003).

Los métodos tradicionales para reducir poblaciones microbianas en el producto involucran tratamientos físicos, químicos y biológicos. La eficacia de estos métodos dependerá del tipo de tratamiento, tipo y fisiología del microorganismo blanco, características de la superficie del producto, tiempo de exposición y concentración de los sanitizantes, pH, temperatura, etcétera (Parish *et al.*, 2003).

Actualmente se emplean inmersiones con plaguicidas en el proceso de comercialización de melón para controlar las enfermedades post-cosecha durante el almacenamiento o el transporte en largas distancias. Los fungicidas recomendados son

una mezcla de benomyl (Benlato) y guazatine (Panoctino), ambos a 500ppm. El benomyl se emplea en pasta que se unta en el fondo de las cubas de inmersión, mientras que el guazatine se agrega en solución a la cuba de inmersión. Es de vital importancia mantener una buena agitación para que el funguicida impregne adecuadamente al producto y no sedimente (Dimsey, 1995).

Estos métodos pueden ser empleados por separado o en conjunto, sin embargo, hay que tomar en cuenta que las combinaciones de sanitizantes o diferentes métodos pueden presentar interacciones aditivas, sinérgicas o antagónicas (Parish *et al.*, 2003).

#### 7.8.1. Métodos fisicoquímicos

El lavado es uno de los pasos más importantes durante el proceso de comercialización de frutas y vegetales. Sin embargo, no todos los métodos de lavado y las soluciones empleadas son igualmente efectivos para todos los productos. Los sanitizantes químicos han sido usados ampliamente en este paso para reducir patógenos, sin embargo, la eficacia de los sanitizantes comunes puede ser limitada o ineficaz cuando se manejan grandes cantidades de vegetales o hay un exceso de materia orgánica en las soluciones para sanitizar (Ruiz-Cruz *et al.*, 2007).

La temperatura, algunos procesos involucran refrigeración para prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos en los productos. Sin embargo, existen poblaciones microbianas capaces de vivir y reproducirse a estas temperaturas. Piagentini *et al.* (1997) reportaron que *Salmonella* Hadar puede sobrevivir y proliferar en vegetales refrigerados. Mientras que el crecimiento de algunos patógenos puede ser inhibido a temperaturas de refrigeración, la supervivencia de algunos otros puede ser potenciada bajo ciertas condiciones. Por ejemplo, algunas cepas de *Salmonella* sobreviven por periodos de tiempo más largos en jugos de frutas en refrigeración que a temperatura ambiente (Parish *et al.*, 2003).

Por el contrario, el agua caliente puede ser usada como tratamiento de reducción de patógenos en algunas frutas o como control de plagas post-cosecha que causan pudrición del producto. El melón puede ser tratado con agua caliente o sanitizantes disueltos en agua caliente ( $H_2O_2$ ) con buenos resultados en la reducción de *Salmonella*, aunque existen efectos adversos sobre la calidad del producto, afectando su color, textura y sabor (Parish *et al.*, 2003, Ukuku *et al.*, 2004).

La radiación ionizante de  $^{60}Co$ ,  $^{137}Cs$  o de una máquina generadora de rayos de electrones, por sí solos o combinados con otros tratamientos como agua caliente, son usados como alternativas para extender la vida de anaquel de los productos. Irradiar a bajas dosis es considerada una buena herramienta para descontaminar y extender la vida de anaquel de rebanadas de melón. La letalidad de la radiación está influenciada por el organismo blanco, condición del mismo y factores ambientales. Tratamientos a bajas dosis (<1 kGy) inhibe el brote de tubérculos y raíces, retrasa la maduración del producto, elimina insectos en granos, frutas y nueces además de matar parásitos en cárnicos. Tratamientos a dosis medias (1–10 kGy) reduce las poblaciones microbianas, incluyendo patógenos sobre o dentro de los alimentos (Parish *et al.*, 2003; Prafull-Palekar, 2004).

Actualmente se emplean fungicidas en solución en el proceso de lavado. El cloro (Cl), es el agente más usado para reducir patógenos en vegetales enteros. Las concentraciones recomendadas de Cl van de 50 – 200ppm con tiempos de contacto de 1-3 minutos. En el proceso de comercialización la efectividad del Cl en la reducción de patógenos es limitada (1-2 log UFC/g), esta limitación puede deberse a una combinación de diversos factores como; exposición a la luz, al aire o a la alta concentración de materia orgánica de la solución sanitizante. Además, el Cl puede reaccionar con la materia orgánica para formar productos carcinógenos, por lo tanto, se debe optar por el uso de alternativas libres de Cl para sanitizar estos productos (Parish *et al.*, 2003; Vadlamudi, 2004; Ruiz-Cruz *et al.*, 2007).

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos aprobó el uso de ácido peroxiacético (AP) para sanitizar algunos productos, incluidos

frutas y vegetales, a concentraciones que no excedan las 80 ppm en el agua de lavado. Park y Beuchat (1999) reportaron que el AP a concentraciones de 40-80ppm redujo *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7 en la superficie de melón Cantaloupe y melón chino en un rango de 2.6-3.8 log UFC/g (Ruiz-Cruz *et al.*, 2007). Al emplear ácido láctico (2%) y ozono (30 mg/L) en contra de *Salmonella* Poona se encontraron reducciones de hasta 2.5 y 2.3 log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente (Vadlamudi, 2004).

Además de estos compuestos químicos, pueden emplearse otros como; yodo, bromo, sales cuaternarias de amonio, ozono, compuestos acídicos y alcalinos y peróxido de hidrógeno, entre otros (Parish *et al.*, 2003; Ruiz-Cruz *et al.*, 2007).

#### 7.8.2. Métodos biológicos

Existen algunas publicaciones acerca del uso de agentes biológicos para controlar y prevenir el crecimiento de patógenos de humanos sobre los productos. Algunas cepas de bacterias acidolácticas inhiben a *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium y *Staphylococcus aureus* en ensaladas de vegetales. Los estudios sugieren que la microflora no patogénica aplicada en las superficies del producto podría competir con los patógenos por el espacio físico y nutrientes, y/o pudiera producir compuestos antagónicos que afecten negativamente la viabilidad de los patógenos (Parish *et al.*, 2003; Leverentz *et al.*, 2006).

El uso de bacteriófagos para reducir poblaciones de *Salmonella* en fruta fresca resultó efectivo al disminuir alrededor de 3.5 log al ser aplicados en rebanadas de melón chino y almacenadas a 5 o 10°C. En cambio, no hubo reducción en rebanadas de manzana, probablemente debido al pH (4.2). Cabe mencionar que el uso de fagos para el control de patógenos debe aún ser estudiado a fondo (Parish *et al.*, 2003).

## 7.9. Uso de extractos de plantas como antimicrobianos

Muchos alimentos contienen compuestos naturales con actividad antimicrobiana. En estado natural, estos compuestos pueden desempeñar el papel de prolongadores de la vida útil de los alimentos. Incluso muchos de ellos han sido estudiados por su potencial como antimicrobianos alimentarios directos. El uso de aditivos alimentarios de origen natural implica el aislamiento, purificación, estabilización e incorporación de dichos compuestos con fines antimicrobianos a los alimentos (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2006). Además suelen ser usados para aumentar la seguridad microbiológica y estabilizar los productos comestibles. Los antimicrobianos de origen natural poseen un gran potencial debido a los requerimientos de los consumidores que implican productos frescos, libres de conservadores químicos y más naturales (Guillier *et al.*, 2007).

Los sistemas antimicrobianos naturales de origen vegetal incluyen compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en las plantas (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2006).

Muchas especias y hierbas exhiben actividad antimicrobiana, los compuestos presentes en estos productos son derivados simples y complejos del fenol, los cuales son volátiles a temperatura ambiente. Muchos de estos compuestos han mostrado efectos favorables en contra de bacterias y hongos. Dentro de las bacterias patógenas adversamente afectadas por estos compuestos se encuentran; *C. botulinum*, *B. cereus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. enterica* Typhimurium, *S. aureus* y *V. parahaemolyticus* (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2006; Guillier *et al.*, 2007).

Se han reportado un gran número de estudios que revelan la actividad antimicrobiana *In vitro* de compuestos de origen natural, aunque relativamente pocos los estudios sobre la actividad antimicrobiana de estos compuestos en sistemas modelo de alimentos o en alimentos propiamente dichos (Guillier *et al.*, 2007; Kolodziej *et al.*, 2001).

Estudios en frutas demostraron el efecto de estos compuestos sobre la extensión de la fase de latencia de crecimiento y la reducción en el nivel de la población final de la microbiota presente en melón. Además, se han empleado peróxido de Hidrógeno, nisina, lactato de sodio y ácido cítrico en soluciones para el lavado melón entero con buenos resultados en la reducción de *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2006).

La eficacia de estos compuestos radica en la capacidad que tienen para reducir el pH en la fase acuosa de los alimentos y en el alto contenido de compuestos polifenólicos. Aunque estas capacidades pueden resultar en alteraciones de las características organolépticas del modelo alimenticio (Guillier *et al.*, 2007).

El efecto inhibitorio de los compuestos antimicrobianos (llámense químicos o naturales) sobre un microorganismo blanco, es determinado arbitrariamente, considerando un tiempo de exposición y la concentración mínima bactericida, la cual se enuncia como la mínima concentración del antimicrobiano en un rango probado capaz de inhibir el crecimiento del inóculo expuesto (Guillier *et al.*, 2007).

Cabe mencionar que el empleo de compuestos ajenos al modelo alimenticio, ya sea para control microbiológico o de calidad, deben estar regulados por la FDA y que al ser aplicados no afecten negativamente las características sensoriales, nutritivas o su garantía sanitaria (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2006).

#### 7.10. Los compuestos polifenólicos

El término tanino proviene de la antigua palabra Celta para denominar roble, una fuente de compuestos para curtir las pieles (Hagerman, 2002). Los taninos vegetales son productos naturales de peso molecular relativamente alto (de 500 a 3000 Da), lo cual les confiere la capacidad de formar complejos con carbohidratos y proteínas. En este contexto, son esenciales en la industria de la talabartería y la síntesis de nuevos adhesivos (Garro-Galves *et al.*, 2001; Dong-Bae *et al.*, 1993). Estos compuestos son



acumulados en las plantas, en troncos, raíces, hojas, frutos, cáscaras y cubiertas de las semillas (Mueller\_Harvey, 2001; Raybaudi-Massilia *et al.*, 2006) considerándose metabolitos secundarios debido a que, aparentemente, no intervienen en procesos como biosíntesis, biodegradación o metabolismo intermediario, sin embargo, se les conoce un potencial biológico, parecido a “mimetismo” hormonal y toxicidad, relacionándose al sistema inmunológico y de adaptación de las plantas (Hagerman, 2002).

Los taninos vegetales son clasificados en dos grupos, taninos hidrolizables y condensados (Garro-Galves *et al.* 2001).

Los taninos hidrolizables son derivados del ácido gálico (3,4,5-trihidroxi ácido benzóico). El ácido gálico se encuentra eterificado a un centro polihólico, y los grupos galoilo pueden estar esterificados fuertemente o ligarse oxidativamente a otras moléculas para formar taninos hidrolizables complejos. Los taninos hidrolizables pueden a su vez ser clasificados en dos grandes grupos, debido a su estructura; galotaninos y elagitaninos (Hagerman, 2002).

Los galotaninos son los más simples, son poligaloilos esterificados a una molécula de glucosa. El galotanino prototipo es el pentagaloil glucosa ( $\beta$ -1,2,3,4,6-pentagaloil-*O*-d-glucopiranososa). El pentagaloil glucosa (PGG) tiene cinco enlaces tipo éster idénticos que unen a los grupos hidroxilo del galoilo al centro de glucosa. La hidrólisis ácida de estos compuestos lleva a la producción de ácido gálico y el centro polihólico, por ello de hidrolizables. Los galotaninos simples son relativamente raros en la naturaleza, tienden a ser el principal constituyente de los ácidos tánicos comerciales. Estos compuestos están presentes en algunas especies de *Acer* (Arce), *Quercus* (Roble) y *Rhus* (Rustifina) (Mueller-Harvey, 2001).

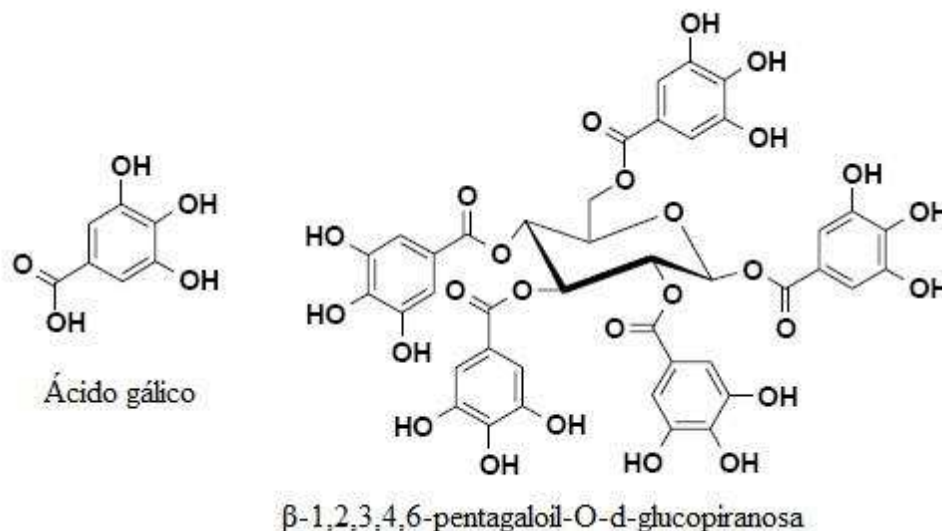


Fig. 2 Ácido gálico como unidad estructural de los taninos hidrolizables.

Los elagitaninos son derivados de la unión oxidativa de grupos galoilo. Son ésteres del ácido hexadiroxidifénico (HHDP) (Hagerman, 2002), esta molécula es la estructura característica de los elagitaninos. Estos taninos pueden romperse, mediante una hidrólisis, a un centro de glucosa y la posterior lactonización del ácido elágico, puede o no llevar a la producción de ácido gálico, dependiendo de la estructura original. Estos compuestos son encontrados frecuentemente en la madera del roble y extraídos de la misma, con altos rendimientos (hasta 10% del peso de la madera) para su uso comercial (Lei, 2002).

Los taninos hidrolizables (TH) pueden ser extraídos de las plantas a partir de diversos solventes. Pueden ser extraídos con agua, metanol al 50% y agua-acetona al 50-70%. El metanol tiende a ser el mejor solvente si se buscan taninos de bajo peso molecular. La solubilidad de los TH es muy variable. Pueden usarse otros solventes para extraer o eliminar compuestos no fenólicos de una muestra, por ejemplo, etilacetato (Mueller-Harvey, 2001). Estos compuestos pueden ser cuantificados mediante la prueba de Folin-Ciocalteu, donde todos los grupos fenólicos reaccionarán y producirán un cromóforo azul fosfotúngstico-fosfomolibdico, aunque la química de esta reacción no se encuentra bien elucidada. Esta técnica tiene como ventaja principal una mayor sensibilidad que la técnica de Folin-Denis (Schofield *et al.*, 2001).

Los taninos condensados (TC) o proantocianidinas comprenden un grupo de oligómeros de polihidroxi-flavan-3-ol y polímeros unidos por enlaces Carbono-Carbono entre subunidades de flavanol. Los flavonoides son un grupo diverso de metabolitos basados en un sistema heterocíclico de anillos de fenilalanina y policetonas (Hagerman, 2002). La clase más común de proantocianidinas son las procianidinas, que son cadenas de catequina y/o epicatequina unidas por enlaces 4+6 o 4+8. Por el contrario de los TH, estos compuestos provienen de la polimerización de flavanos amorfos por la acción de ácidos (Garro-Galvez *et al.*, 2001).

El estudio de estas moléculas ha sido difícil debido a la complejidad de estos. Pueden ser extraídos por distintos solventes, por ejemplo, agua, metanol o acetona. Estos compuestos pueden ser determinados cuantitativamente en residuos vegetales, o extractos acuosos, mediante; la depolimerización de las proantocianidinas, reacciones del anillo heterocíclico con aldehídos aromáticos o reacciones óxido-reducción. Sin embargo, la más empleada es la reacción con ácido-butanol. Esta reacción colorimétrica emplea una depolimerización de los TC de manera oxidativa catalizada por ácido, para producir antocianidinas rojas (Schofield *et al.*, 2001), las cuales son cuantificadas colorimétricamente (Hagerman, 2002). Los TH no reaccionan en este ensayo (Schofield *et al.*, 2001).

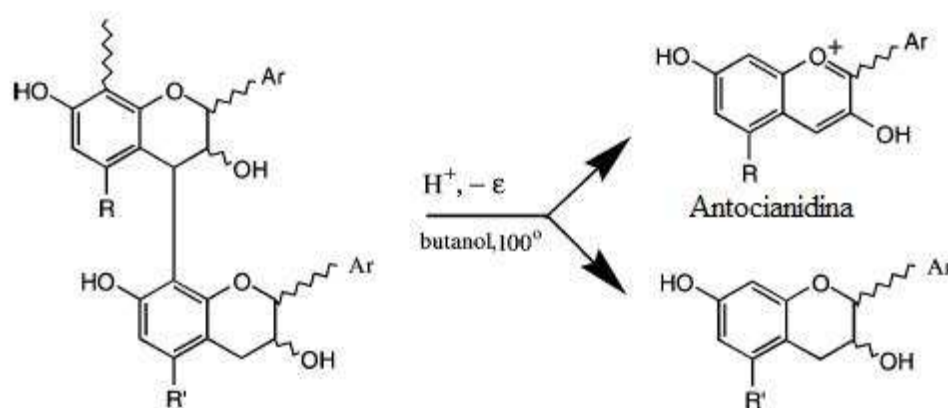


Figura 3. Reacción de depolimerización oxidativa para la obtención de antocianidinas, cuantificación de taninos condensados.

Los taninos tienen diversas funciones en los sistemas biológicos. Estudios recientes demuestran que son potenciales agentes quelantes de metales. Además se han empleado polifenoles extraídos del hollejo de canola debido a la capacidad como agentes precipitantes de proteínas (Naczki *et al.*, 1996). A estos compuestos se les considera, nutricionalmente hablando, como “antinutrientes” debido a la capacidad que tienen de reducir la digestibilidad de las proteínas ingeridas, al precipitarlas, dando como resultado una elevada excreción fecal de Nitrógeno. De igual forma, algunos compuestos fenólicos pueden inhibir las enzimas digestivas y otras enzimas de importancia (hidrolasas, isomerasas, oxigenasas, etcétera) (Guevara-González *et al.*, 2005)

A su vez, se han estudiado estos compuestos obtenidos a partir de nueces de Castilla (*Juglans regia*) como antioxidantes biológicos (Fukuda *et al.*, 2003; Hagerman, 2002). En 2003 se estudió la capacidad de extractos de taninos a partir de *Pinus caribea* contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) *In vitro*, mostrando que algunos de esos extractos inhibían un alto porcentaje de la replicación viral y además no mostraron efecto tóxico, sin embargo, se requieren más estudios a fin de elucidar el mecanismo de acción, así como los compuestos activos de dicho producto (Ruibal-Burnet *et al.*).

De igual forma, hay estudios recientes que demuestran la capacidad bactericida de estos compuestos, Panizzi *et al.* en 2002 probaron extractos y fracciones de estos extractos obtenidos a partir de plantas completas de zarzamoras (*Rubus ulmifolius*) contra una serie de bacterias, grampositivas y gramnegativas, hongos filamentosos y levaduras, encontrando efectivos dichos extractos contra algunas bacterias en particular o varias a la vez. Se han encontrado efectivos extractos ricos en compuestos polifenólicos obtenidos a partir de clavo, ciruela negra, granada y tomillo contra *Pseudomonas aeruginosa* multidrogoresistente, aislada a partir de un ambiente nosocomial, siendo un riesgo potencial infeccioso y de gran importancia en materia de salud pública (Nascimento *et al.*, 2000)

Muchos de los compuestos fenólicos tienen efectos directamente benéficos para la salud (Manach *et al.* 2004). Se ha demostrado que esos compuestos protegen los tejidos contra los efectos tóxicos y neoplásicos de un amplio rango de carcinógenos. Así, los polifenoles y sus derivados han manifestado tener efectos contra el cáncer y enfermedades del corazón, por lo que la ingesta de vegetales y frutas reducen el riesgo de diversos tipos de cáncer en humanos (Ito *et al.*, 1999; Raybaudi-Massilia *et al.*, 2006). Además de poseer efecto cardioprotector y hepatoprotector en seres humanos (Priyadarsini, *et al.*, 2002)

#### 7.11. La cáscara de nuez como fuente de taninos

El nogal pecanero, *Carya illinoensis*, es una especie frutal perteneciente al grupo de las nueces. Es miembro de la familia Juglandaceae, la misma del nogal común (*Junglans regia*). Es nativa del sur de Estados Unidos, extendiéndose por Texas y Norte de México (Lemus, 2004; Gilman y Watson, 1995).

Es un árbol de follaje caduco que vive muchos años, posee una frondosa copa y alcanza un tamaño de hasta 30 m de altura. Las hojas presentan un verde brillante en el haz y un verde más claro en el envés. La madera es quebradiza, por lo tanto, los árboles pueden ser fácilmente dañados en zonas con mucho viento. El fruto es una drupa, de 2.5-4 cm de longitud. La nuez es de forma oblonga, lisa, de cáscara delgada y puntiaguda. Su periodo de desarrollo es largo y se extiende aproximadamente por siete meses, un árbol de edad intermedia puede producir hasta 40Kg de nuez por árbol, dependiendo de la variedad cultivada y factores pedoclimáticos (Lemus, 2004; Gilman y Watson, 1995; Orona-Castillo *et al.*, 2005).

México es el segundo productor de nuez, únicamente superado por los Estados Unidos (Lemus, 2004). La producción total de nuez, a nivel nacional en 2006 fue de 68,359.68 toneladas, y en la Comarca Lagunera de 11,145.42 toneladas en ese mismo año (SAGARPA, 2008c). La nuez es un alimento altamente saludable. Es un producto

libre de colesterol, con altos contenidos de proteínas y ácidos grasos insaturados que reducen el contenido de colesterol en la sangre (Lemus, 2004).

La región lagunera aporta el 12% de la producción nacional de nuez pecanera. En el 2004 la región de estudio ocupó el segundo lugar como cultivo que mayor participación tuvo en el valor de producción, superado sólo por la alfalfa. Las formas más utilizadas para comercializar la nuez en la región son, a granel en costales y sin limpiar, seleccionada por su tamaño limpia y en costales, y descascarada y limpia. De acuerdo a la información compilada, se estima que de el 70 a 80% de la producción regional, se canaliza al mercado de exportación (Orona-Castillo *et al.*, 2005).

Las industrias que procesan al nogal aprovechan casi la mayor parte del árbol, desde su madera hasta sus frutos, pero de los cuales se desprende un enorme residuo, la cáscara de nuez. del cual no se le da ningún uso que aumente su valor, la cáscara de la nuez. Esta representa más del 50% del fruto del nogal, y es rica en taninos, lo cual le da un potencial poco explotado a las cáscaras de la nuez (Villarreal-Lozoya *et al.*, 2006). De acuerdo a McEachern y Stein, desde los años 50 en los Estados Unidos se han venido empleando los desechos de la producción de nuez para extraer aceites esenciales y taninos a gran escala (1990).

En un estudio reciente se determinó la cantidad de polifenoles totales (TH y TC), provenientes de la cáscara de la nuez, extraídos químicamente y definió a este recurso como una buena fuente de taninos, cuantificando 54.3mg TH/g y 140.9mg TC/g (Medina-Morales, 2007).

Por lo anterior proponemos la utilización para reducir el riesgo de contaminación por *Salmonella* en el melón Cantaloupe.

#### 7.12. Las pruebas sensoriales para determinar el efecto de los compuestos aplicados en el control microbiológico y de calidad en alimentos

Las pruebas sensoriales pertenecen a una disciplina científica usada para recordar, medir, analizar e interpretar reacciones a aquellas características de los alimentos y de los materiales cuando son percibidos por los sentidos de la vista, oído, gusto y tacto. El tipo de método de evaluación sensorial que se debe seguir dependerá, principalmente, del objetivo o finalidad que se persiga al analizar el objeto de estudio (Castañé, 2002).

Las pruebas de análisis sensorial analíticas son, en términos generales, de dos tipos: pruebas discriminatorias (o de diferenciación) y los análisis descriptivos. Las discriminatorias se llevan a cabo con la finalidad de establecer si existen diferencias entre los productos. Las más comunes son, dúo-trío, la A-no A y la prueba triangular (de la Presa-Owens, 2002).

Por otro lado, los métodos de análisis descriptivos involucran la detección y la descripción de aspectos sensoriales, ya sean cualitativos o cuantitativos, de un producto mediante un grupo de panelistas entrenados (5 a 100). Los parámetros percibidos se definen como atributos, características, notas de carácter, términos descriptivos, descriptores, o terminología. Los panelistas deben ser capaces de detectar y describir los atributos sensoriales percibidos de una muestra. Esos aspectos combinan, la descripción del producto y todas sus características de apariencia, olor, sabor, textura, entre otras, que lo van a diferenciar de otros productos. Los panelistas deben de acordar en cuanto a la definición de dichos conceptos. Además, los panelistas deben ser capaces de diferenciar y ordenar aspectos cualitativos y de intensidad de una muestra y definir el grado de cada característica presente en la muestra (Izquierdo, 2002; Meilgaard *et al.*, 2007).

Las pruebas descriptivas son ideales para obtener una descripción detallada del olor, sabor y la textura al gusto de alimentos y bebidas. Estos perfiles obtenidos acerca de los

productos analizados son de gran utilidad en la investigación y desarrollo de productos nuevos.

Dependiendo del objeto de estudio va a depender el número de diferentes perfiles descriptivos, a continuación se muestra una lista de ejemplos a considerar:

1. Términos de apariencia
  - a. Color
  - b. Textura de la superficie
  - c. Forma y tamaño
  - d. Interacciones entre las partículas
2. Términos de olor
  - a. Sensaciones olfatorias
  - b. Sensaciones nasales
3. Términos de sabor
  - a. Sensaciones olfatorias
  - b. Sensaciones de sabor
  - c. Parámetros de sensación oral
4. Términos de textura al gusto
  - a. Parámetros mecánicos; reacción del producto al efecto mecánico
  - b. Parámetros geométricos
  - c. Parámetros de grasa y humedad
5. Términos de textura al tacto
  - a. Parámetros mecánicos; reacción del producto al efecto mecánico
  - b. Parámetros geométricos
  - c. Parámetros de grasa y humedad
  - d. Parámetros de apariencia



## 8. MATERIAL Y MÉTODOS

### 8.1. Cultivos bacterianos

La cepa de trabajo, *Salmonella* Typhi CDC-9 fue donada por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Coahuila, cumpliendo con los parámetros de viabilidad y pureza. Dicha cepa se mantuvo en viales con glicerol a  $-52^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Esta cepa se activó en tubos con Infusión Cerebro Corazón (ICC, Bioxon), incubándose en condiciones aeróbicas estáticas por 24 horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Para la cepa de trabajo, se tomó una asada del cultivo del caldo anterior y se plaqueó sobre Agar Mueller-Hinton (Bioxon), fue incubada en condiciones aeróbicas por 24 horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Periódicamente se realizaron pruebas bioquímicas, así como extensiones sobre medios selectivos para comprobar su viabilidad y pureza.

### 8.2. Extracción química de los compuestos polifenólicos y determinación del peso seco del extracto acuoso de las cáscaras de nuez.

Las cáscaras de nuez empleadas fueron recolectadas de huertos ubicados en el municipio de Parras, Coahuila. Para su empleo se deshidrataron y fueron sometidas a un proceso de trituración y posteriormente pulverización en un molino de cuchillas.

Se llevó a cabo una extracción química de dichos compuestos mediante reflujo, se colocó una cantidad de cáscaras de nuez triturada y se le adicionó el agente extrayente, (agua destilada estéril) a una proporción 1:4. Esta mezcla fue colocada en matraces cubiertos con papel aluminio para evitar la oxidación de los compuestos de interés. Posteriormente se colocaron en un sistema de reflujo con una temperatura no mayor a  $60^{\circ}\text{C}$  por 4-6 horas, agitando ocasionalmente.

El extracto obtenido fue decantado y filtrado a través de 1) gasa, 2) papel filtro poro grueso, 3) filtro Whatman y 4) filtro de nitrocelulosa de 0.45 $\mu$ m de poro.

Se colocaron 3 series de tubos limpios y rotulados en una estufa a 80°C, se midió su peso, el cual fue registrado cada 2 días hasta que tuvo un peso constante en tres lecturas consecutivas. Se realizó la misma metodología para el extracto acuoso de cáscara de nuez. Esto fue realizado por duplicado en tres repeticiones.

8.3. Determinación cuantitativa de los compuestos de interés, Taninos Hidrolizables (Makkar *et al.*, 1992) y Taninos Condensados (Haggerman, 2002).

Se realizó una curva patrón para ácido gálico (equivalentes de TH). Se preparó una solución estándar de ácido gálico 500ppm, Colocando una serie de tubos. A estos tubos se les adicionó un volumen de agua destilada hasta alcanzar 400  $\mu$ l totales. Se agregaron 400  $\mu$ l del reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma) a cada tubo, se agitaron y se dejaron reposar por 5 minutos. Posteriormente fueron agregados 400  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.01M) a cada tubo, se agitaron y se dejaron reposar por 5 minutos. Finalmente se agregaron 2.5ml de agua destilada a cada tubo y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 750nm.

Para las muestras, se colocaron 400 $\mu$ l de la muestra en un tubo de ensaye, se le agregaron 400 $\mu$ l del reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitó y dejó reposar por 5 minutos. Se le agregaron 400 $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.01M), se agitó y se dejó reposar por 5 minutos. Se le añadieron 2.5ml de agua destilada y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 750nm. Dicho ensayo fue realizado por duplicado en tres repeticiones.

Se realizó una curva patrón de catequina (equivalentes de TC, Sigma). Se preparó una solución 1gr/L de catequina 1gr/L. Se colocaron 0, 125, 250, 375 y 500 $\mu$ l de la solución estándar en una serie de tubos. Se ajustó el volumen a 500 $\mu$ l con agua destilada. Se añadieron 3ml de HCl/Butanol (1:9), se agitó y fueron añadidos 100 $\mu$ l de reactivo férrico. Los tubos fueron cerrados herméticamente y se colocaron en baño de agua a

100°C por 1 hora, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 460nm. Esto mismo se realizó con los extractos de cáscara de nuez. Dicho ensayo fue realizado por duplicado en tres repeticiones.

#### 8.4. Determinación de la actividad antibacteriana del extracto acuoso de las cáscaras de nuez mediante difusión en pozo.

Se ajustó una suspensión bacteriana en solución salina estéril (0.85%) conteniendo  $1-2 \times 10^8$  UFC/ml. Se colocaron 100µl de este inóculo en placas de agar Mueller-Hinton, se estriaron con un asa de Digralsky y se realizaron pozos 5mm de diámetro. Se colocaron 150µl del extracto en cada pozo, se dejó difundir a temperatura ambiente por 15 minutos y se incubó en condiciones estáticas por 24 horas a  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , al cabo de lo cual se midieron los halos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los pozos. Dicho ensayo fue realizado por duplicado en tres repeticiones. Como controles positivos se utilizaron diferentes concentraciones de ácido gálico (0-500ppm) y catequina (0-1gr/L) en forma pura, obtenidos comercialmente.

#### 8.5. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) *In vitro* del extracto de cáscaras de nuez (Alarcón, 2000).

Se ajustó una suspensión bacteriana en solución salina (0.85%) estéril conteniendo  $1-2 \times 10^8$  UFC/ml y se inocularon (1%). Se emplearon tubos conteniendo 5 ml de caldo Mueller-Hinton. Se agitó el contenido de los tubos y se incubaron por 24 horas a  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ . Posteriormente, se tomaron 100µl de cada tubo y se transfirió a cajas Petri con agar Mueller-Hinton y Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), se sembraron por difusión. Las placas se incubaron en por 24 horas a  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ . Se determinó como CMB la concentración del tubo que inhibió completamente el crecimiento bacteriano. Dicho ensayo fue realizado por duplicado en tres repeticiones. Como controles positivos se utilizó ácido gálico (0-500ppm) y catequina (0-1gr/L), obtenidos comercialmente.

8.6. Determinación del efecto bactericida del extracto de cáscaras de nuez sobre el modelo alimenticio contra *Salmonella* sp. (Ukuku and Fett, 2003)

Se prepararon 1.5 litros de inóculo ( $1-2 \times 10^8$  UFC/ml) a partir del cultivo puro transferido un par de veces en caldo Infusión Cerebro Corazón, De este cultivo se tomó una asada para inocular tubos con 20ml de caldo ICC y se incubaron por 24hrs a 35°C. Estos cultivos fueron concentrados por centrifugación (15 min a 8 500 rpm). El paquete celular fue lavado con agua peptonada 0.1% y se transfirió al inóculo, se midió su densidad óptica a 600nm hasta obtener una absorbancia de 0.43 que equivalía aproximadamente a  $1-2 \times 10^8$  UFC/ml.

Un total de 12 melones Cantaloupe frescos y enteros fueron comprados en un supermercado (1,314 – 1,671 g). Estos melones se encontraban exentos de magulladuras, heridas y mohos y visualmente similares en su grado de madurez.

Estos melones fueron inoculados por inmersión en el inóculo con agitación y rotación manual constante por 10 min. Una vez inoculados se dejaron secar por 1 h en una cabina de bioseguridad y aislados a temperatura ambiente por 12 h para su posterior tratamiento.

Se preparó una cuba de inmersión alcanzando una concentración de 4.3mg/ml de extracto acuoso de cáscara de nuez, capaz de inhibir completamente el crecimiento *In vitro*, donde posteriormente fueron colocados individualmente los melones inoculados. Se sumergieron los melones durante 2 y 5 minutos con constante frotación y rotación. A su vez, se preparó una cuba de inmersión conteniendo solamente agua destilada estéril como control negativo. Se dejaron secar por 1 h en la cabina de bioseguridad antes de continuar con el procedimiento.



Fig. 4. Tubos con una muestra de extracto acuoso de cáscara de nuez, a la izquierda; extracto crudo. A la derecha, concentración ajustada a la CMB *In vitro*.

Se realizaron ranuras circulares en la superficie del melón con un sacabocados de 2.5mm de diámetro esterilizado por inmersión en alcohol etílico al 95% y flameo, los círculos obtenidos fueron cortados con cuchillas de acero inoxidable estériles, retirando el excedente de la superficie (pulpa). Se pesaron 25 g de esta muestra (aproximadamente 11 piezas circulares) y fueron homogenizados con 75ml de agua peptonada (0.1%) en una licuadora por 1 minuto a velocidad alta.

Se realizaron diluciones decimales seriadas de la muestra y se plaqueó 1ml en agar Entérico Hektoen (EH). Se analizaron muestras de diferentes melones antes de ser inoculados por la NOM-114.SSA1 para determinar cualitativamente la presencia/ausencia de *Salmonella* spp en las muestras. Se incubaron en condiciones estáticas por 48 hrs a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### 8.7. Efecto del extracto de cáscaras de nuez sobre la calidad sensorial del modelo alimenticio (Meilgaard *et al.*, 2007)

Se realizó una prueba triangular para determinar si el tratamiento con el extracto afectó a los aspectos sensoriales del melón. Se realizó el ensayo con 48 personas (30 mujeres y 18 hombres) con edades oscilando entre 20 y 60 años.

Tabla 2. Medidas de tendencia central de las edades de los consumidores en la prueba triangular.

Media	23 años
Moda	22 años
Mediana	22.5 años

La prueba consistió en tratar un melón y combinarlo aleatoriamente con dos melones sin tratar, todos ellos debidamente codificados (MT1, MT2 y MT3), posteriormente presentarlos ante cada persona por separado e indicarle que dos de las muestras están exentas de tratamiento y una se encuentra tratada, se le pidió señalara la muestra tratada. La hipótesis planteada;  $H_0 =$  Existe diferencia aparente entre un melón tratado con extracto acuoso de cáscaras de nuez y un melón sin tratar.



Fig. 5. A la izquierda puede observarse un melón con tratamiento, a la derecha un melón no tratado.



Fig. 6. Muestras para la prueba triangular, al centro la muestra tratada con el extracto acuoso de cáscaras de nuez por 5 min, rotación y agitación constante.

Se contaron el número de respuestas correctas y el número de respuestas totales. Se determinó si el número de respuestas correctas fue igual o mayor que el número tabulado.

Prueba Triangular
Edad _____ Sexo _____ Fecha _____
Instrucciones: Dos de las muestras son idénticas, determine cuál es la muestra extraña basándose en su aspecto, olor y textura.
¿Cuál es la muestra extraña?
_____

Fig. 7. Cuestionario aplicado en la prueba triangular.

Se realizó una prueba descriptiva cuantitativa comparativa para determinar los parámetros organolépticos que pudieron ser alterados al poner en contacto al melón con el extracto. Se aplicó el tratamiento a la mitad de cada melón a probar para evitar la variación en cuanto a los parámetros organolépticos de un melón a otro. El melón fue cortado en trozos de una pulgada de largo.

Se aplicó a 43 consumidores, alumnos de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila. Se les dio una explicación para delimitar los parámetros a analizar y evitar ambigüedades, además un cuestionario con el siguiente formato:



### Prueba Descriptiva Cualitativa Comparativa

Nombre: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Se dará una muestra de melón (tratado), la cual será comparada con un control (sin tratar). Se marcará con una cruz una sola casilla en cada parámetro a comparar, tomando en cuenta las diferencias o similitudes entre las muestras y se añadirán observaciones al final del cuestionario (opcional) de acuerdo a los parámetros percibidos.

Parámetro	-3 Much o menos	-2 Mmte menos	-1 Lgmte menos	0 Igual	1 Lgmte mas	2 Mmte mas	3 Much o mas
Color							
Consistencia al gusto							
Sabor característico							
Dulzura							
Acidez							
Astringencia/Resabi o							
Frescura							
Palatabilidad							
Jugosidad							

Observaciones:

---

Parámetro	-3 Much o menos	-2 Mmte menos	-1 Lgmte menos	0 Igual	1 Lgmte mas	2 Mmte mas	3 Much o mas
Aspecto característico							
Partículas extrañas							
Olor							
Pigmentación al tacto							
Humedad							

Observaciones:

---

Fig. 8. Cuestionario para el análisis sensorial del melón tratado vs. un melón sin tratar.

#### 8.8. Aislamiento y caracterización de *Salmonella* en melones Cantaloupe de distintos puntos de venta (Según la NOM-114-SSA1).

Se analizaron un total de 44 melones Cantaloupe (999.8 – 1, 671 g) de diversa calidad, generalmente de un estado de madurez aceptable, sin magulladuras ni golpeaduras. Estos melones fueron obtenidos de Abril a Agosto de 2008 de seis supermercados, dos fruterías, dos proveedores a gran escala de la central de abastos y un local sobre ruedas de diferentes puntos de la Ciudad de Saltillo, Coahuila. Las muestras analizadas provenían, principalmente de La Laguna, Jalisco, Michoacán y Nuevo León.

Para su análisis se siguió la metodología descrita en la NOM-114-SSA1-1994, se cortaron y pesaron 25 g de la superficie de cada melón y se homogenizaron con 225 ml de caldo lactosado (caldo de pre-enriquecimiento) en una licuadora a velocidad alta por 1 min. Esta mezcla fue transferida a un recipiente estéril de boca ancha con tapón de rosca para ser incubada en condiciones estáticas durante 24 h a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Al transcurrir dicho periodo, se agitó el caldo de pre-enriquecimiento y se transfirió 1 ml de esta mezcla a un tubo de cultivo que contenía 10 ml de caldo Vassiliadis-Rappaport, se incubó durante 24 h a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en condiciones estáticas. Se tomó una asada y fue estriada sobre 3 medios de cultivo, Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), Entérico Hektoen (EH) y Verde Brillante (VB), estas placas fueron incubadas por 48 h a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en condiciones estáticas.

Las colonias presuntivas de *Salmonella* spp. fueron analizadas bioquímicamente según indica la NOM-114-SSA1-1994 (TSI, LIA, Urea) para confirmar la presencia de *Salmonella* spp. en los melones Cantaloupe de los diversos puntos de venta.

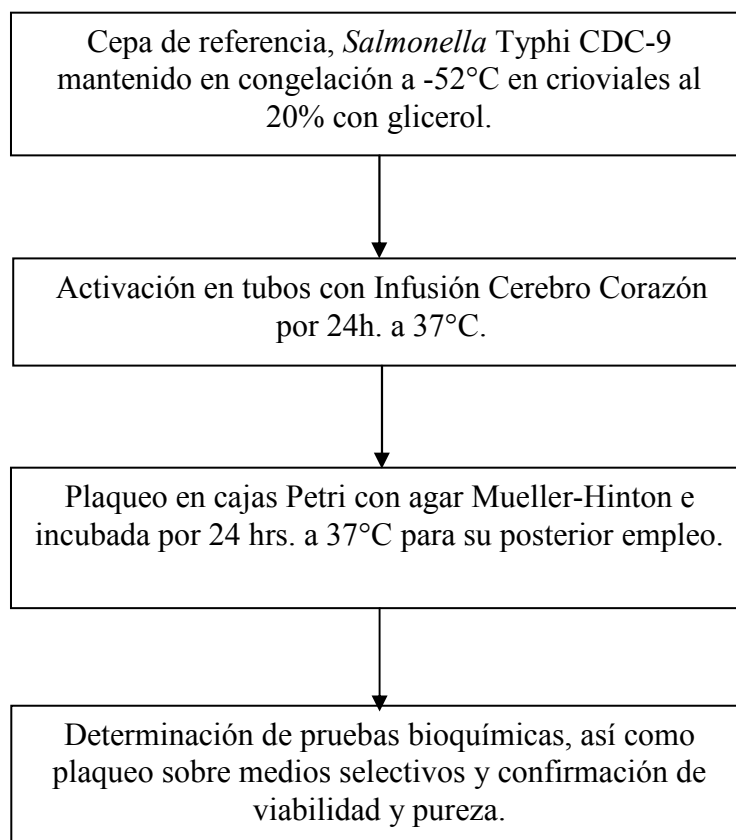
#### 8.9. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) sobre rangos, prueba de Kruskal-Wallis, a través del paquete estadístico SigmaStat.

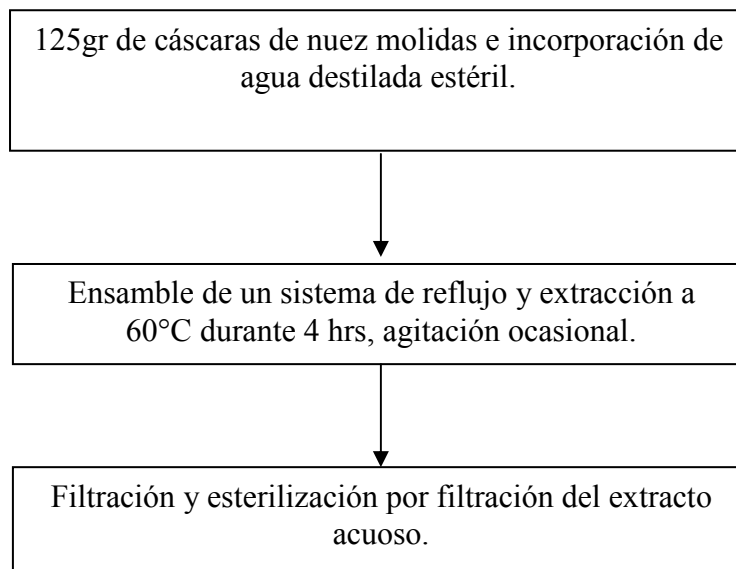
En cuanto a la prueba triangular se empleó una prueba del tipo Chi-cuadrada, Número Crítico de Respuestas Correctas.

**DIAGRAMA DE FLUJO DE LOS MÉTODOS UTILIZADOS:**

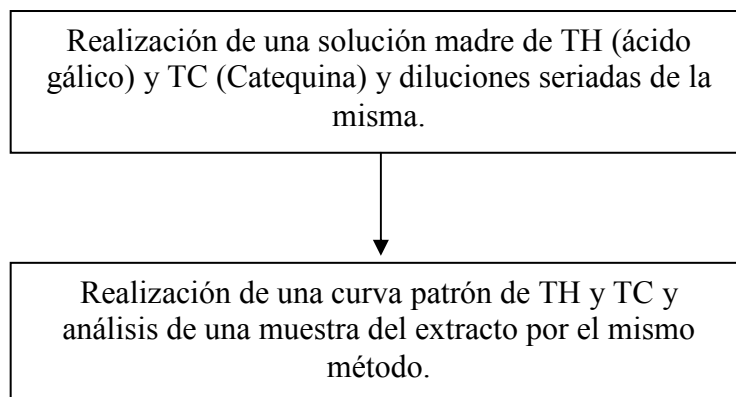
Cultivos bacterianos.



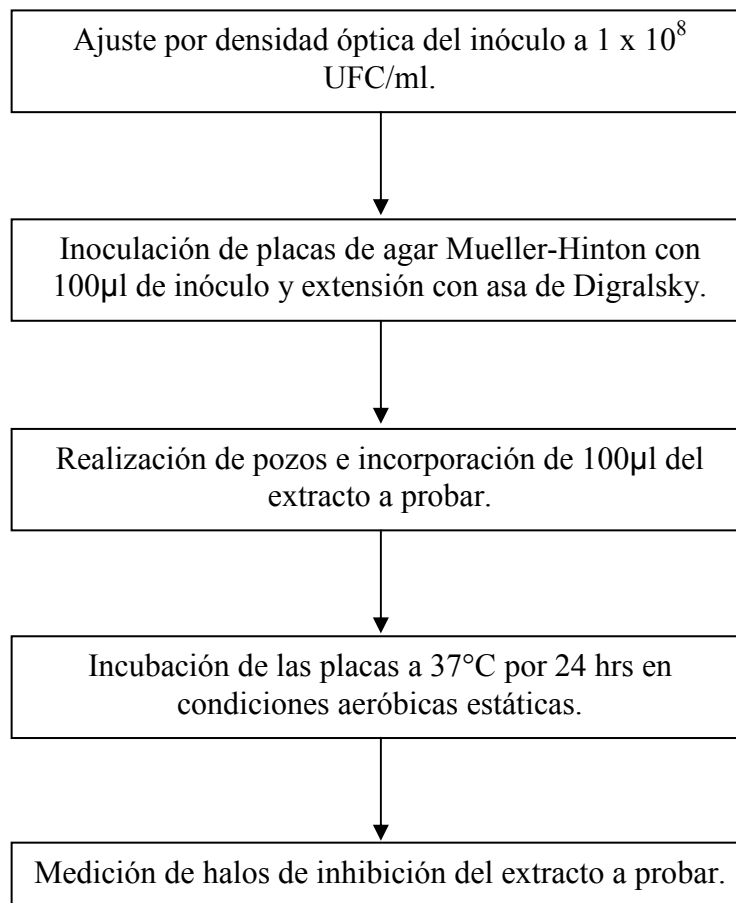
Extracción química de los compuestos de interés y determinación del peso seco del extracto acuoso de las cáscaras de nuez.



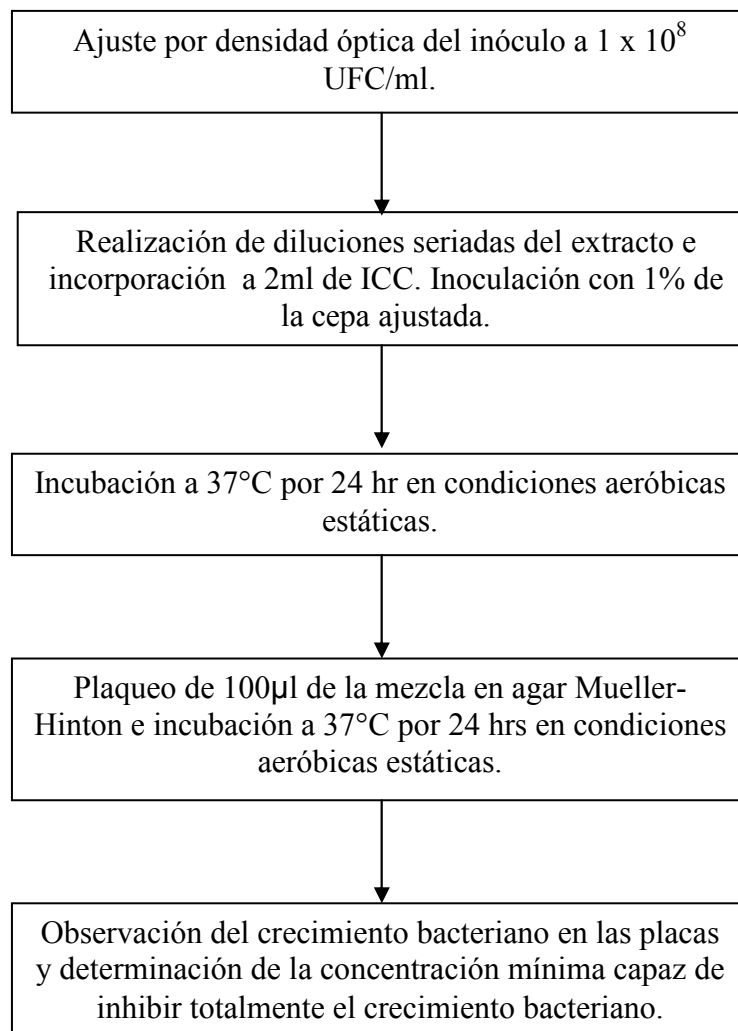
## Determinación cuantitativa de los compuestos de interés (TH y TC)



Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto acuoso de cáscaras de nuez  
contra *Salmonella Typhi*

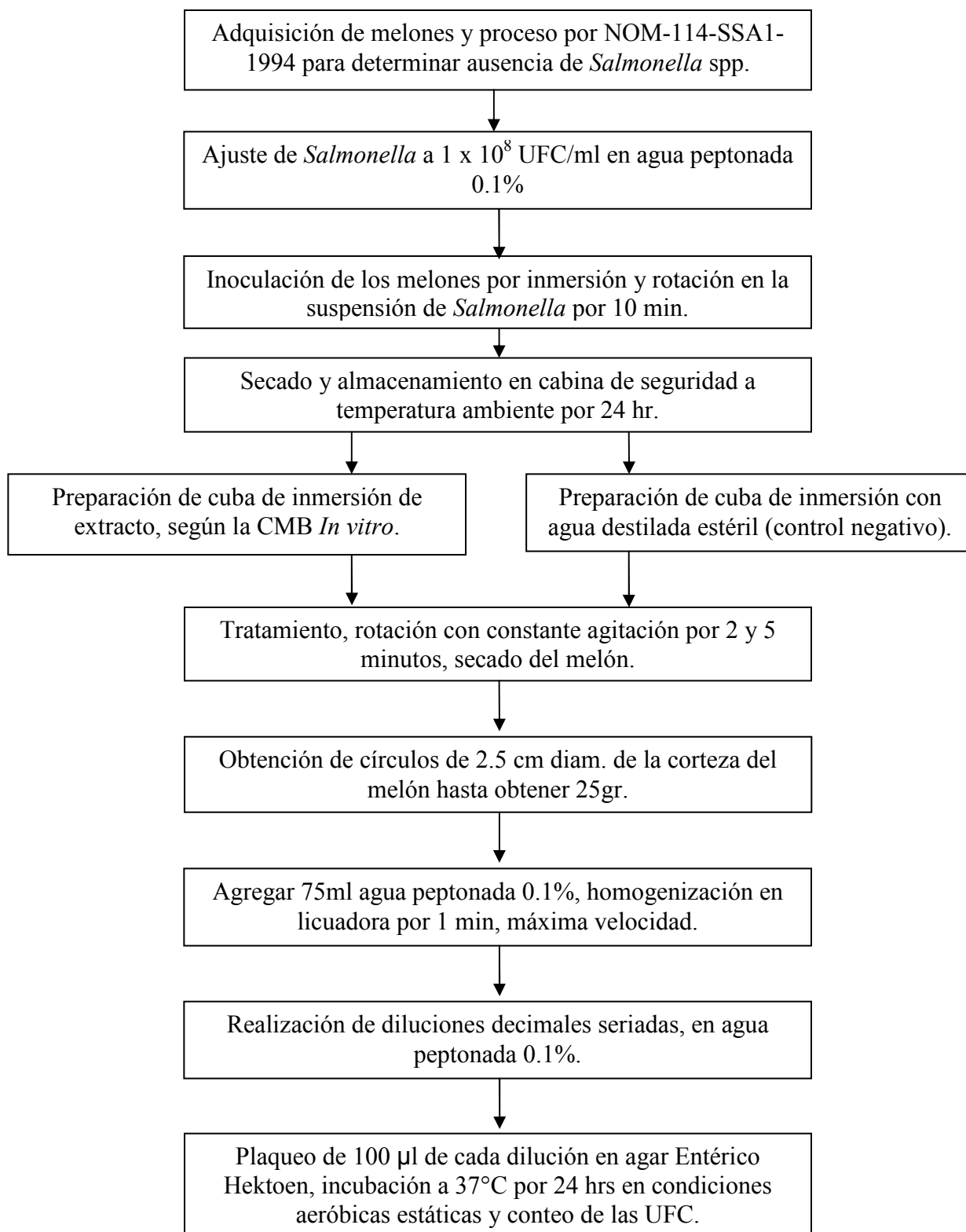


Determinación de la CMB *In vitro* del extracto acuoso de cáscaras de nuez contra  
*Salmonella Typhi*

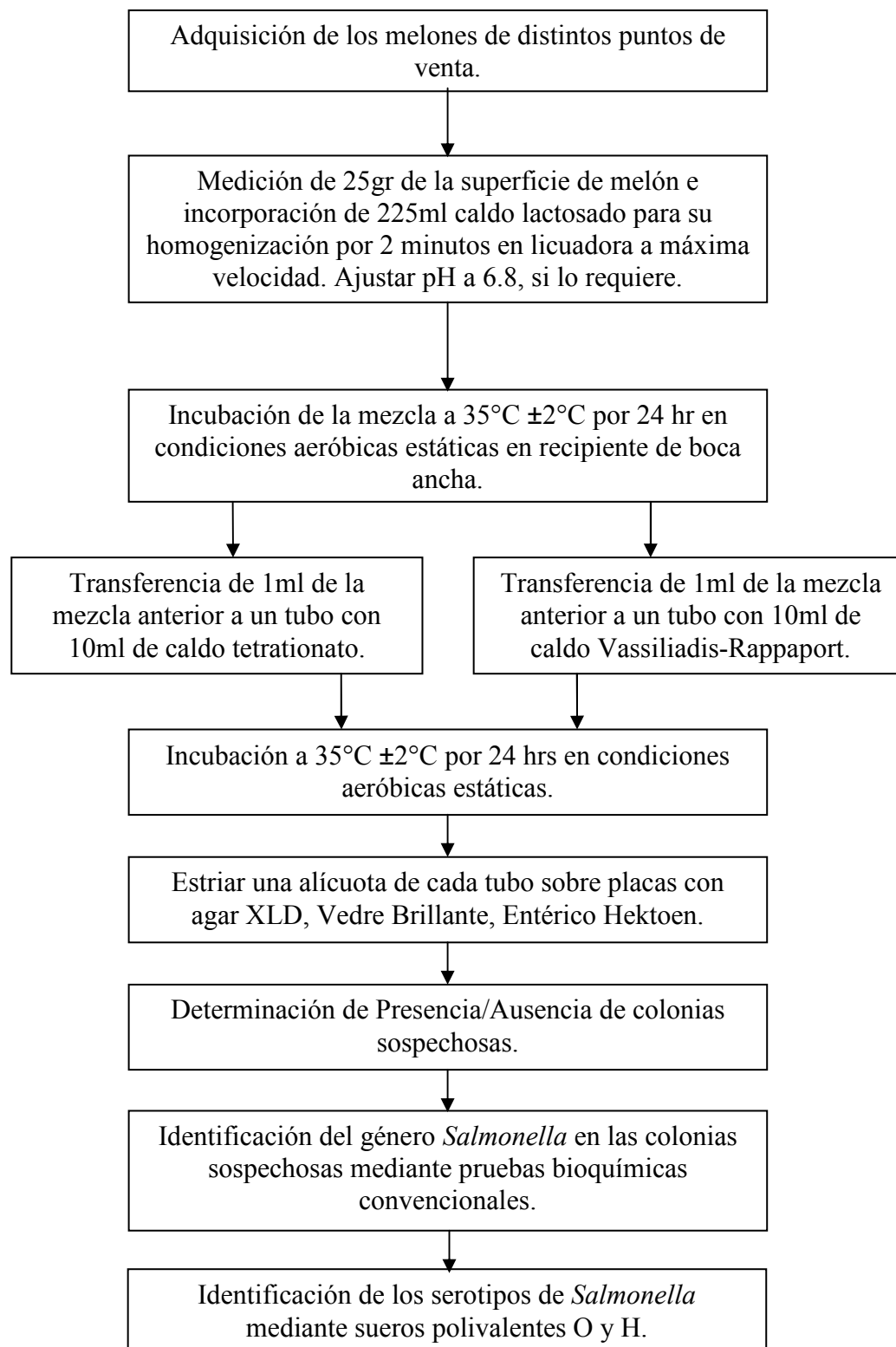




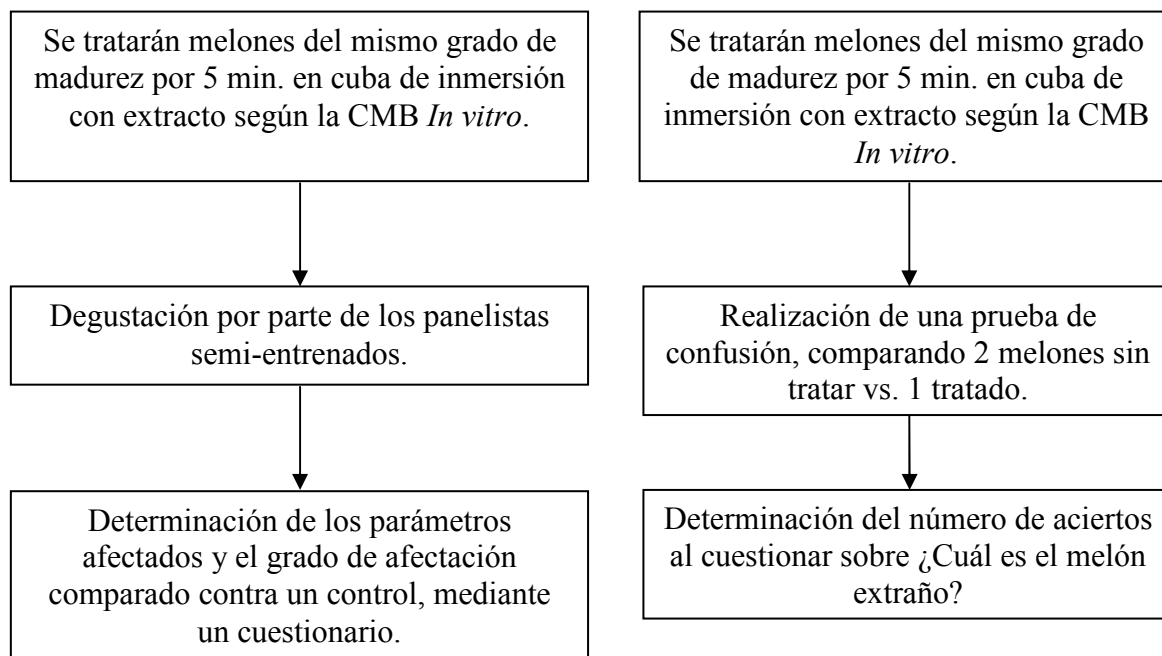
Determinación del efecto del extracto acuoso de cáscaras de nuez contra *Salmonella*  
Typhi aplicado en el modelo alimenticio



Aislamiento y caracterización de *Salmonella* en melones Cantaloupe de distintos puntos de venta.



Efecto del extracto de cáscaras de nuez sobre la calidad del modelo alimenticio, análisis sensorial.



## RESULTADOS:

9.1. Extracción química de los compuestos polifenólicos y determinación del peso seco del extracto acuoso de las cáscaras de nuez.

El extracto obtenido químicamente a las 4 horas de reflujo fue filtrado y esterilizado por filtración. El pH del extracto fue de 4.98 y presentó un color café rojizo intenso y un olor *sui generis*, no presentaba sedimentos y fue contenido en un frasco ámbar en refrigeración a 4°C para su empleo *a posteriori* (Figura 9). El peso seco del extracto fue 17 mg/ml, a partir de estos datos, el porcentaje de tt del peso seco del extracto fue igual a 1.46%.



Fig. 9. Muestra del extracto acuoso de cáscaras de nuez.

## 9.2 Determinación cuantitativa de los compuestos de interés, Taninos Hidrolizables (Follin) y Taninos Condensados (HCl/Butanol).

En las determinaciones cuantitativas basadas en las curvas patrón para taninos hidrolizables ( $r^2= 0.999$ ) y taninos condensados ( $r^2= 0.989$ ), se obtuvo una concentración de 188.23 ( $\pm 7.02$ ) mg de taninos totales (tt) por litro de extracto acuoso de cáscara de nuez, de los cuales, 90.32 ( $\pm 13.05$ ) mg fueron taninos hidrolizables y 98.62 ( $\pm 6.08$ ) mg correspondieron a taninos condensados (Tabla 3).

	Taninos Hidrolizables (mg/L extracto)	Taninos Condensados (mg/L extracto)	Taninos Totales (mg/L extracto)
Lectura I	78.45	104.78	183.23
Lectura II	84.00	100.75	184.75
Lectura III	108.50	90.33	198.83
Promedio	90.32	98.62	188.93

Tabla 3. Determinación cuantitativa del contenido de taninos hidrolizables, condensados y totales en el extracto acuoso de cáscaras de nuez.

## 9.2. Determinación de la actividad antibacteriana del extracto de cáscaras de nuez contra *Salmonella* sp.

Se Obtuvieron halos de inhibición de 22 ( $\pm 2.44$ ) mm de diámetro como resultado de la inhibición aparente del crecimiento de *Salmonella* Typhi *In vitro*.

Los ensayos realizados como controles (ácido gálico y catequina) no presentaron actividad antibacteriana a las concentraciones empleadas, 0-500ppm ácido gálico y 0- 1 g/L de catequina, el crecimiento de la cepa de referencia fue uniforme en toda el área.

### 9.3. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) *In vitro* del extracto de cáscaras de nuez.

Se realizaron diluciones seriadas (tubo 1- 11) para dicho ensayo:

Tubo	Concentración (mg/ml) extracto.	Resultado
1	5.66	No hubo crecimiento
2	5.1	No hubo crecimiento
3	4.53	No hubo crecimiento
4	3.96	16 UFC
5	3.4	>300 UFC
6	2.83	Incontable
7	2.26	Incontable
8	1.7	Incontable
9	1.13	Incontable
10	.56	Incontable
11	0	Incontable

Tabla 4. Concentraciones probadas contra *Salmonella* Typhi *In vitro* para la determinación de la CMB.

La concentración mínima bactericida se determinó como la concentración capaz de inhibir el crecimiento bacteriano al estar incubado por 24 hrs a 35°C en condiciones aeróbicas estáticas y al ser inoculada una alícuota de esta mezcla por difusión en las cajas con agar Mueller-Hinton y XLD para confirmar mediante la morfología característica de *Salmonella* en el medio. La concentración capaz de inhibir el crecimiento resultó 4.3 ( $\pm 0.34$ ) mg/ml (tabla 4).

### 9.4. Determinación del efecto bactericida del extracto de cáscara de nuez aplicado en el modelo alimenticio contra *Salmonella* sp.

La figura 8 muestra el efecto del extracto acuoso de cáscaras de nuez al ser aplicado al melón en tres diferentes tiempos de exposición (0, 2 y 5 minutos) y a una concentración

de 4.3 mg/ml. Se encontró que la población bacteriana se redujo un logaritmo al exponer el fruto por 5 minutos al extracto de cáscara de nuez, lo cual no sucedió con nuestro control de agua destilada estéril.

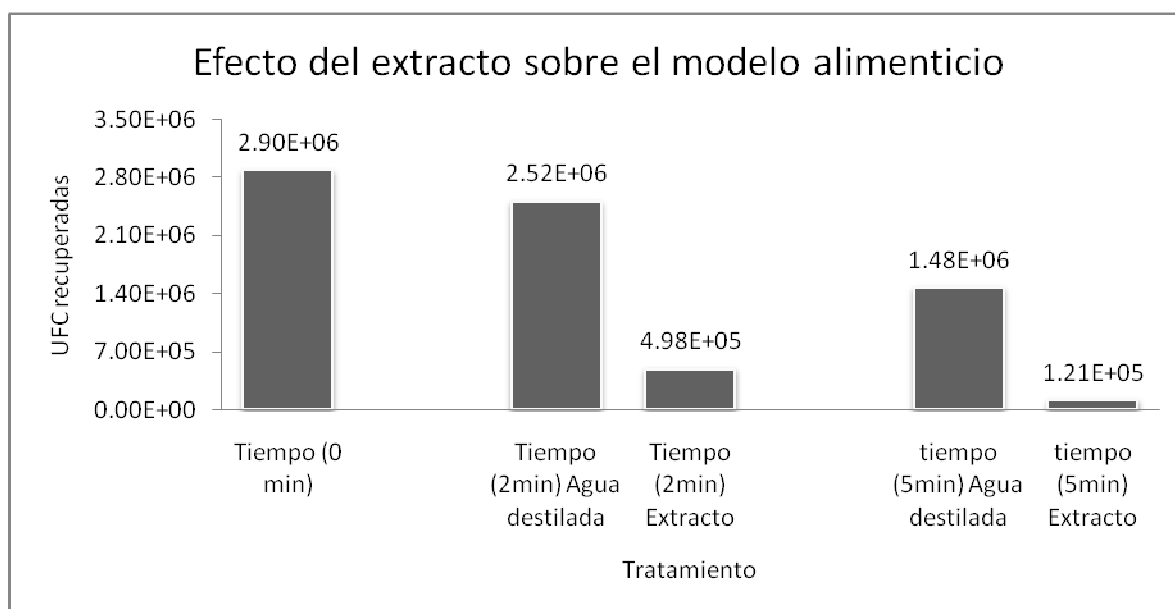


Fig. 10 Efecto del tratamiento y control negativo sobre la población de *Salmonella* Typhi inoculadas artificialmente.

#### 9.5. Efecto del extracto de cáscaras de nuez sobre la calidad del modelo alimenticio.

Al realizar la prueba triangular a 48 voluntarios, 18 hombres y 30 mujeres, en el papel de consumidor y tratar de encontrar la muestra tratada con extracto entre 3 muestras, se obtuvieron los siguientes resultados:

	Respuestas correctas	Respuestas incorrectas	Total
Consumidores	13	35	48

Tabla 5. Respuestas de la prueba triangular.

El 27% de las respuestas fueron correctas, el 73% restante no identificó correctamente la muestra extraña. De las respuestas correctas, el 77% fueron mujeres, mientras que el 23% restante fueron hombres.

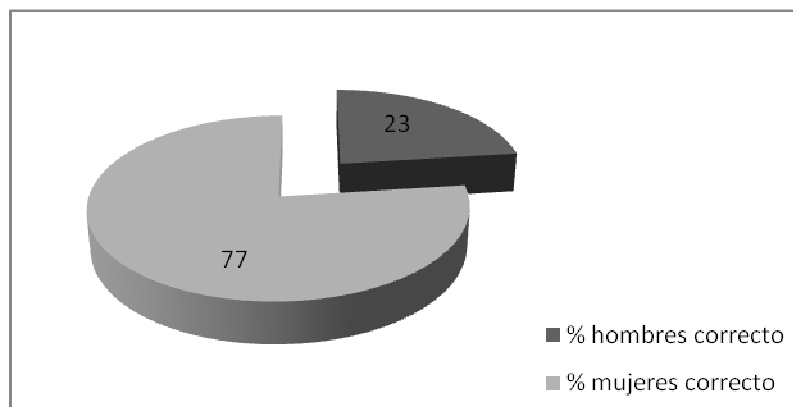


Fig. 11. Análisis genérico de las respuestas correctas en la prueba triangular.

Al comparar el número de respuestas obtenidas, contra el valor dado en la tabla para Número Crítico de Respuestas Correctas en una prueba triangular ( $X_{\alpha,n}$ )  $\alpha=0.001$ , se encontró la hipótesis **no fue aceptada**, el número de respuestas correctas (13) es menor al número mínimo tabulado (27 respuestas correctas), por lo tanto, no hay diferencia significativa entre el melón tratado y los melones sin tratar, en cuanto a los consumidores se refiere.

Al realizar la prueba descriptiva cualitativa comparativa a 48 consumidores, se encontró que el 14% de los encuestados ( $n=6$ ) no encontró diferencia en cuanto al aspecto en general (aspecto característico, desprendimiento de partículas extrañas, olor, desprendimiento de pigmentos y humedad) comparando un melón entero sin tratar contra un melón entero tratado en el extracto acuoso por 5 minutos en agitación y frotación constante. El 86% restante ( $n=37$ ) encontró diferencias en uno o más de los parámetros descritos en cuanto al aspecto en general del melón entero. El 58% de los encuestados ( $n=25$ ) afirmó que la muestra tratada presentaba mayor olor característico que el control.

En cuanto a los cambios al consumir el melón sin tratar y posteriormente la muestra tratada se encontró que, el 100% de los encuestados ( $n=43$ ) encontraron cambio en al



menos uno de los parámetros analizados. Siendo la jugosidad el parámetro mayormente alterado puesto que el 40% de los encuestados (n= 17) argumentaron que el melón tratado presentaba más jugosidad. El 23% de los encuestados (n=10) afirmó que el melón tratado fue más fresco que el control.

Por el contrario, el 14% de los consumidores encuestados (n= 6) percibió un aumento ligero en cuanto a la astringencia en la muestra tratada. El 9% de los consumidores (n= 4) percibió un aumento ligero en cuanto a la acidez de la muestra tratada.

9.6. Aislamiento y caracterización de *Salmonella* en melones Cantaloupe de distintos puntos de venta (Según la NOM-114-SSA1-1994).

De las 44 muestras analizadas solamente se encontraron 2 muestras presuntivas, procedentes de dos melones adquiridos en dos autoservicios diferentes, al realizarles las pruebas bioquímicas convencionales fueron descartadas por no cumplir con el perfil bioquímico genérico. Del total de muestras analizadas no se reportaron aislados positivos para *Salmonella* spp.

## DISCUSIÓN:

*Salmonella* Typhi es considerada como la causa de 21.6 millones de casos de infecciones ocasionadas por estas bacterias (fiebre tifoidea y salmonelosis) anualmente alrededor del mundo (CDC), con una incidencia de hasta 1000 casos por cada 100 000 habitantes y su índice de mortalidad se estima hasta en 600 000 muertes por año (Calva, 2001). En nuestros ensayos utilizamos una cepa de referencia (*S. Typhi* CDC-9) como control.

Para el control de microorganismos han sido empleados compuestos químicos desde hace aproximadamente 100 años, ya sea para eliminar la contaminación con este patógeno del producto o para retardar la fase lag de otros microorganismos detractores de la calidad. Estos agentes son llamados “conservadores”. Los más empleados son benzoatos, lactatos, nitritos y nitratos. Recientemente se han encontrado cepas de levaduras (*Candida krusei*, *Hansenula anomala*) capaces de sobrevivir al ser expuestas a altas concentraciones de ácido benzoico. Algunas bacterias como *Pseudomonas*, poseen resistencia innata contra el ácido ascórbico, otro conservador frecuentemente usado (Davidson y Harrison, 2002). Sin embargo, los compuestos químicos pueden traer consigo reacciones adversas por lo que se debe considerar el uso de otros agentes para controlar la contaminación de alimentos con microorganismos patógenos.

La resistencia a los agentes antimicrobianos tiene como resultado un incremento en la morbilidad y mortalidad de las infecciones bacterianas debido a que no se prescriben oportunamente los antibióticos adecuados para el tratamiento, incrementando además los costos del cuidado de la salud (Lalitha, 2004). Se dice que el aumento en la resistencia a los antibióticos de los aislados de vegetales se debe a cambios en las prácticas de agricultura y en proceso de comercialización de los mismos (Singh *et al.*, 2006). Debido a la resistencia desarrollada por este patógeno a los agentes químicos y

antibióticos, se optó por emplear agentes naturales provenientes de cáscaras de nuez para evaluar la capacidad de inhibir o eliminar completamente a esta bacteria *In vitro* y en el melón.

Las formulaciones basadas en extractos de plantas han sido empleadas desde la antigüedad como remedios contra enfermedades animales y humanas. En los últimos 20 años, el interés por la medicina tradicional se ha incrementado considerablemente en muchas partes del mundo, donde el cambio en el estilo de vida, incluyendo aspectos dietarios, ha tenido un gran efecto en el incremento de riesgos para la salud. Existe un sinnúmero de estudios científicos que atribuyen al consumo de plantas algunas propiedades benéficas a la salud y terapéuticas, contra enfermedades emergentes. Dichas propiedades son atribuidas a metabolitos secundarios, tales como los polifenoles (Singh *et al.*, 2003).

En este trabajo se emplearon extractos de cáscaras de nuez como fuente de compuestos polifenólicos basando en el posible uso de la cáscara de nuez que actualmente es un desecho. El nogal es una especie de buen crecimiento, libre de enfermedades y productiva, en su estado de madurez y buenas condiciones de cultivo, puede llegar a producir hasta 40Kg de fruto (Lemus, 2004). México es el segundo productor de nuez, únicamente superado por los Estados Unidos (Lemus, 2004), la comarca Lagunera aporta a la producción nacional alrededor del 12% (Orona-Castillo *et al.*, 2005). La producción total de nuez, a nivel nacional en 2006 fue de 68,359.68 toneladas, y en la Comarca Lagunera de 11,145.42 toneladas en ese mismo año (SAGARPA). Considerando que alrededor del 50% del fruto del nogal es cáscara, la cual es considerada desperdicio, este producto posee un uso potencial poco explotado como fuente de antioxidantes (Villarreal-Lozoya *et al.*, 2006).

Según la Alianza de Alergias y Anafilaxis debida a Alimentos (Food Allergy & Anaphylaxis Alliance), los cacahuates, nueces, soya, leche, huevo, algunos cereales y los mariscos son considerados los alimentos alergénicos más comunes en países como Alemania, Australia, Canadá, Estados Unidos, Italia, Nueva Zelanda, Países Bajos y el

Reino Unido. Alrededor del 2% de la población presenta reacciones alérgicas a los compuestos presentes en las nueces (nuez, almendras, castañas, avellanas) (2002). Estos compuestos son la mayoría de las veces proteínas o sus derivados en los alimentos que causan respuestas inmunológicas anormales (Allergen Bureau, 2008; Bannon, G. 2004). Debido a la naturaleza acuosa del extracto de cáscaras de nuez empleado para el tratamiento, el cual contiene únicamente compuestos solubles, tales como carbohidratos y compuestos fenólicos, entre otros, lo cual determina que el extracto puede no presentar los alérgenos que son frecuentemente encontrados en la nuez como tal.

Los antioxidantes (taninos) fueron extraídos químicamente mediante un sistema de reflujo o soxhlet, el agente extraente varía dependiendo la polaridad de los compuestos a extraer y la finalidad de los mismos. Medina-Morales en 2007 determinó la eficacia de diversos agentes extraentes; que pueden incluir metanol al 70%, acetona al 70% y agua, además del tiempo de extracción, concluyendo que la mayor obtención de polifenoles totales a partir de cáscaras de nuez se da a las 12 horas con acetona al 70% obteniéndose 245.5 mg tt/g de cáscara. Sin embargo en este trabajo no pueden ser empleados el metanol al 70% ni la acetona al 70% ya que el uso potencial del extracto será aplicándolo sobre alimentos por lo que se optó por el empleo de agua como agente extraente.

Existen estudios con extractos vegetales, que le adjudican la actividad antibacteriana y antifúngica a compuestos fenólicos, estos estudios mostraron halos de inhibición de hasta 19 mm contra *Bacillus subtilis* y de hasta 12.5 mm contra *Enterococcus faecalis* (Kosalec *et al.* 2005, Raybaudi-Massilia *et al.* 2006). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, mostraron que el extracto acuoso de cáscaras de nuez fue muy efectivo para inhibir a *Salmonella Typhi*, alcanzando halos de inhibición de hasta 22 ( $\pm 2.44$ ) mm de diámetro. A la fecha no existen reportes de la actividad del extracto acuoso de cáscara de nuez por el método de difusión en placa contra algún otro microorganismo, patógeno o deteriorante.

Al emplear ácido gálico y catequina obtenidos comercialmente como controles positivos, tuvimos resultados inesperados, ya que no presentaron actividad en contra de *Salmonella* Typhi, Neurath *et al.* en 2004 reportaron el uso de ácido caféico, ursélico, catequina y quercetina puros obtenidos comercialmente para bloquear la unión de los linfocitos T, proteína CD4 con la proteína gp120 del VIH, en cambio, al emplear estos extractos obtenidos a partir del jugo de granada (*Punica granatum*) si se vio bloqueada la unión entre ambas proteínas, este comportamiento podría deberse al efecto sinérgico de diversos compuestos presentes y sus concentraciones en los extractos probados, tales como carbohidratos, polifenoles monoméricos y poliméricos, entre otros.

En el presente trabajo se obtuvo una CMB con el extracto acuoso de cáscaras de nuez de 4.3 ( $\pm 0.34$ ) mg/ml contra *Salmonella* Typhi. Ciraj *et al.* reportaron en 2001 la actividad antimicrobiana de un extractos alcohólico de hojas de té negro (*Camelia sinensis*) contra 27 aislados de *S. Typhi*, pero a la fecha no existen reportes con respecto al uso de cáscaras de nuez como agente bactericida en contra de esta bacteria. Osorio en 2007 reportó la actividad de extractos metanólicos de cáscaras de nuez y otras plantas del semi-desierto mexicano en contra de microorganismos fitopatógenos, obteniendo buena actividad contra *Fusarium oxysporum*.

El efecto bactericida de algunos compuestos, ya sean químicos o físicos, se basa en la interacción “agente bactericida-bacteria” a nivel de pared celular o ambiente intracelular. La cloración es de las alternativas empleadas para el control microbiano en alimentos (Ukuku *et al.*, 2006). Dicha eficacia es atribuida al alto potencial oxidante que posee, sin embargo, para que dicho agente tenga un buen efecto debe administrarse en altas concentraciones (hasta 200ppm), lo cual incrementa el riesgo de formar productos secundarios potencialmente peligrosos, al interaccionar con la materia orgánica, o cambiar las características organolépticas. A la fecha, el mecanismo real para la actividad bactericida del cloro sigue siendo estudiado (Virto *et al.* 2005).

La actividad antimicrobiana de los compuestos polifenólicos (taninos) puede deberse a las diferentes propiedades químicas que poseen, tales como formar complejos

con enzimas y otras proteínas microbianas, inhibiendo o alterando su función; inhibir la cadena transportadora de electrones en las membranas celulares y formar complejos con hierro y cobre. Se puede decir que la actividad de los taninos es un proceso multifactorial que va a depender de los compuestos fenólicos presentes en los extractos y del microorganismo a inhibir (Guevara-González *et al.*, 2005).

Vadlamudi (2004) reportó que al sanitizar melones enteros, sumergiéndolos en agua o en una solución conteniendo 200 mg/L de cloro no fueron efectivos en la reducción de *Salmonella* Poona, reportando reducciones menores a 1 log UFC/cm<sup>2</sup>. Sin embargo, al emplear una solución de ácido láctico al 2% u ozono (30 mg/l), se encontraron reducciones significativas en la reducción de esta bacteria, de 2.5 log UFC/cm<sup>2</sup> y 2.3 log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Barak y cols. (2003) reportaron el efecto que ejerce el combinar el lavado de melones enteros con una solución de jabón antibacterial, frotación con un cepillo para frutas en una cuba de inmersión y la final inmersión en una solución con 150 ppm de hipoclorito de sodio, contra *S. Poona*, encontrando una reducción del 99.8% de las bacterias inoculadas. En base a los resultados obtenidos, en donde no encontramos reducciones importantes al aplicar; ellos sugieren incrementar las concentraciones, pero sin rebasar las concentraciones encontradas originalmente en las cáscaras de nuez, ya que concentraciones mayores podrían resultar nocivas para la salud (Padilla-Zakour, 2008) o alterar las características organolépticas del alimento.

En este trabajo se empleó como objeto alimenticio al melón Cantaloupe en donde determinamos la prevalencia de *Salmonella* spp. Esto debido a que históricamente esta fruta ha estado involucrada en brotes por este microorganismo. En los estados Unidos y Canadá, en 2002 se reportó la contaminación con *Salmonella* Poona de melones de origen mexicano y recientemente, en marzo de 2008, estuvieron involucrados melones hondureños en un brote de *Salmonella* Litchfield que afectó a 59 personas en 16 estados de la Unión Americana y 5 provincias de Canadá (FDA, 2008; Medheadlines, 2008), dejando pérdidas de 7mdd para la empresa involucrada en tan solo 3 días después de anunciada dicha alerta (CNN en español, 2008). En general, se han visto involucrados

diversos serotipos en brotes debidos a melones cantaloupe, tales como Safra, Poona, Hadar, Oranienburg, (Mohle-Boetani *et al.* 1999, Hammack *et al.* 2003, Ukuku y Fett, 2006).

Debido a que a la fecha no existen estudios acerca de la calidad y seguridad de los melones expendidos en la ciudad de Saltillo, Coahuila, es importante considerar el análisis en cuanto a la calidad microbiológica, no sólo de melón Cantaloupe, sino de otros productos que podrían estar implicados en la transmisión de patógenos o deteriorantes.

De las 44 muestras analizadas de melón Cantaloupe de diversos locales de la ciudad de Saltillo, Coah., no se encontraron aislados positivos para *Salmonella*. Resultados similares fueron reportados por Gómez-Govea *et al.* en 2008, al analizar la calidad microbiológica de melón Cantaloupe y otros vegetales en el área metropolitana de la ciudad de Monterrey, Nuevo León, no sólo en cuanto a *Salmonella*, sino además, coliformes totales y fecales, *Shigella* spp, *E. coli*, *Listeria Monocytogenes* y *Campylobacter jejuni* /*coli*.

Debido a que a la fecha no existen estudios acerca de la calidad y seguridad de los melones expendidos en la ciudad de Saltillo, Coahuila, es importante considerar el análisis en cuanto a la calidad microbiológica, no sólo de melón Cantaloupe, sino de otros productos que podrían estar implicados en la transmisión de patógenos o deteriorantes.

Aún y cuando los melones Cantaloupe analizados en la ciudad de Saltillo no fueron encontrados positivos en cuanto a *Salmonella*, no deben pasarse por alto medidas preventivas para asegurar la seguridad e inocuidad de este producto, por ejemplo: Lavar las manos antes de manipular este, o cualquier alimento, lavar la superficie del melón usando un cepillo y agua corriente para eliminar residuos de suciedad, lavar los utensilios para cortar el melón, eliminar la cáscara del melón inmediatamente después de

lavado, refrigerar el melón a 4°C o menos, etiquetar el contenedor indicando la fecha y consumirlo antes de 7 días (Simonne, 2006).



## CONCLUSIONES:

De acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos, se pueden derivar las siguientes conclusiones.

- Las cáscaras de nuez pueden ser empleadas como una fuente redituable de compuestos fenólicos (taninos), obteniéndose, en agua como solvente 188.23 ( $\pm 7.02$ ) mg/l de extracto.
- El extracto acuoso de cáscaras de nuez presenta una excelente actividad antibacteriana contra *Salmonella* Typhi al ser probado mediante el método de difusión en pozo, obteniendo halos de inhibición de 22 ( $\pm 2.44$ ) mm de diámetro.
- La CMB *In vitro* del extracto acuoso de cáscaras de nuez contra *Salmonella* Typhi fue de 4.3 ( $\pm 0.34$ ) mg/ml.
- El extracto de cáscaras de nuez empleado a una concentración de 4.3 mg/ml, alcanzó reducir en un log a la población de *Salmonella* Typhi en melón.
- El extracto no altera significativamente las características organolépticas del producto cuando este es presentado al consumidor para su adquisición.
- El extracto no altera las características físicas del modelo alimenticio en cuanto al aroma, sabores agregados, consistencia y palatabilidad del producto al ser consumido. Modificó el aspecto y el aroma del producto entero al ser inspeccionado, mejorándolo.
- De 44 muestras de melón analizadas, no se encontró ninguna muestra positiva para *Salmonella*.

### **PERSPECTIVAS:**

El presente trabajo fue dirigido hacia la solución de un problema reciente y de gran importancia en materia de inocuidad alimentaria y salud pública, abriendo la posibilidad a nuevas investigaciones, considerando:

- La purificación y aislamiento del principio activo de los extractos de las cáscaras de nuez que presentan la actividad antibacteriana contra *Salmonella* spp.
- Probar diferentes concentraciones del formulado en contra de *Salmonella* en el modelo alimenticio, siempre y cuando las concentraciones no alteren negativamente las características organolépticas del modelo.
- Probar el formulado en contra de una cepa nativa, aislada de melón Cantaloupe contaminado.
- El efecto que ejerce el formulado sobre la microbiota común del modelo alimenticio y su vida de anaquel.
- El efecto que ejerce el formulado sobre otros microorganismos deteriorantes de la calidad del producto.

**LITERATURA CITADA:**

- Akins, E.D., Harrison, M.A., Hurst, W. 2008 Washing practices on the microflora on Georgia-grown Cantaloupes. *J. Food Prot.* 71 (1) 46-51
- Alarcón G. 2000. Análisis de la actividad antimicrobiana de 48 plantas medicinales o comestibles contra bacterias de importancia en alimentos. Tesis [Licenciatura] Universidad Autónoma de Nuevo León
- Allergen Bureau 2008 What are food allergens? [Internet] Disponible en el sitio: <http://www.allergenbureau.net/what-are-food-allergens/>
- Andrews, W.H, Flowers, R.S., Silliker, J., Bailey, S.J. 2001 *Salmonella* In Pouch-Downes, F., Ito, K. Compendium of methods for the microbiological examinations of foods 4<sup>th</sup> Ed. American Public Health Associations p. 357
- Arrizabalaga, A., Torre, I., *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834) Atlas y libro rojo de los mamíferos terrestres de España. 445-448
- Bannon, G.A. 2004 What makes a food protein an allergen? *Current allergy and Asthma Reports* 4 (1) pp 43-46
- Barak, J.D., Chue, B., Mills, D.C. 2003 Recovery of surface bacteria from and surface sanitization of cantaloupes. *J. of Food Prot.* 66 (10) 1805-1810

- Borrego, F., López, A., Fernández, J., Murillo, M., Rodríguez, A., Reyes, A., Martínez, J. 2001 Evaluación agronómica de melón (*Cucumis melo* L) bajo condiciones de campo. *Agronomía mesoamericana* 12 (1) 57-63
- Brackett, R.E., Splittstoesser, D.F. 2001 Fruits and vegetables In Pouch-Downes, F., Ito, K. Compendium of methods for the microbiological examinations of foods 4<sup>th</sup> Ed. American Public Health Associations p. 515
- Brandl, M., Mandrell, R.E. 2002 Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (7) 3614-3621
- Caldwell, K.N., Anderson, G.L., Williams, P.L., Beuchat, L.R. 2003 Attraction of a free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*, to foodborne pathogenic bacteria and its potential as a vector of *Salmonella* Poona for preharvest contamination of Cantaloupe. *J. Food Prot.* 66 (11) 1964-1971
- Castañé, F.X. 2002 Control de calidad sensorial en un grupo cervecero multifactoría. *Aplicaciones industriales y control de calidad.* 2-5
- Castillo, A., Mercado, I., Lucia, L.M., Martínez-Ruiz, Y., Ponce de León, J., Murano, E.A., Acuff, G.R. 2004 *Salmonella* Contamination during production of Cantaloupe: A binational study. *J. Food Prot.* 67 (4) 713-720
- Center for Disease Control and Prevention 2005 Outbreaks of *Salmonella* Infections associated with eating Roma tomatoes-United States and Canada, 2004. *JAMA*, American Medical Association. 293 (23) 2852-2856
- Ciraj, A.M., Sulaim, J., Mamatha, B., Gopalkrishna, B.K., Shivananda, P.G. 2001 Antibacterial activity of black tea (*Camelia sinensis*) extract against *Salmonella* serotypes causing enteric fever. *J. of Med. Sci* 55 (7): 376:381

CONABIO 2005 Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM).  
Proyecto GEF-CIBIOGEM 2005 Melón

CNN en español 2008 [Internet] Disponible en el sitio:  
[http://edition.cnn.com/2008/WORLD/americas/03/25/honduran.melon/index.htm](http://edition.cnn.com/2008/WORLD/americas/03/25/honduran.melon/index.html)  
l [Revisado el 25 de Marzo de 2008]

Contreras, I., Toro, C.S., Troncoso, G., Mora, G.C. 1997 *Salmonella* Typhi mutants defective in anaerobic respiration are implied in their ability to replicate within epithelial cells. *Microbiol.* 143 2665-2672

Davidson, P.M., Harrison, M.A. 2002 Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Tech.* 56 (11) 69-78

De la Presa-Owens, C., 2002 Aplicaciones del análisis sensorial en la industria vitivinícola. *Aplicaciones industriales y control de calidad.* 6-8

Dimsey, R. 1995 Post harvest handling of melons. *Agricultural notes*, Department of Primary Industries.

Dong-Bae, H., McAllister T., Yanke, J., Cheng, K-J, Muir, A.D. 1993 Effects of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. And Environ. Microbiol.* 59 (7) 2132-2138

Espinoza-Arellano, J.J., Orona-Castillo, I., Cano-Rios, P. 2005 Situación y tendencias en las actividades de producción y comercialización del melón (*Cucumis melo* L.) en la comarca Lagunera, México. *Agrofaz* 5 (1) 801-811

Figueroa, G., González, M., Molina, A., Yáñez, R., Navarrete, J., Serna, M., Madrigal, J. 2005 Identificación de *Salmonella* spp en agua, melones Cantaloupe y heces

- fecales de iguanas en una huerta melonera. *Medicina interna de México*, 21 (4) 255-258
- Fleming, H.P., McFeeters, R.F., Breidt, F. 2001 Fermented and acidified vegetables In Pouch-Downes, F., Ito, K. *Compendium of methods for the microbiological examinations of foods* 4<sup>th</sup> Ed. American Public Health Associations p. 524
- Food Allergy & Anaphylaxis Alliance 2002 Food allergy around the world. [Internet] Disponible en el sitio: <http://www.foodallergyalliance.org/foa.html>
- Fukuda, T., Ito, H., Yoshida, T., 2003 Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.) *Phytochem.* 63 795-801
- García, R. 2000 Especies y sub-especies de *Erwinia*, causantes de pudrición blanda y pierna negra en la papa cultivada, en el estado Mérida-Venezuela. *Rev. Forest. Venez.* 44 (1) 107-114
- Garro-Galvez, J.M., Riedls, B, Conner, A.H. 2001 Analytical studies on Tara tannins
- Gilman, E.F., Watson, D. G., 1993 *Carya illinoensis* Pecan. Fact sheet ST-122
- Gómez-Govea M., García-Alvarado, J.S., Heredia-Rojas, N. 2008 Evaluación microbiológica de frutas y vegetales que se expenden en Monterrey, N.L. y su área metropolitana. Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria 2008
- Guevara-González, R.G., Guzmán-Maldonado, S.H., Veloz-Rodríguez, R., Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, G., Veloz-García, R.A., Marín-Martínez, R., Guevara-Olvera, L., Torres-Pacheco, I., Miranda-López, R., Villaseñor-Ortega, F., González-Chavarría, M.M. 2005 Antimicrobial, antimutagenic and antioxidant properties of tannins from mexican “Casalote” tree (*Caesalpinia cacalaco*) *Recent Progress in Medicinal Plants* 14

- Guillier, I., Nazer, A.I., Dubois-Brissonnet, F. 2007. Growth response of *Salmonella* Typhimurium in the presence of natural and synthetic antimicrobials: Estimation of MICs from three different models. *J. Food Prot.* 70 (10) 2243-2250
- Gutierrez-Cogco, L., Montiel-Vázquez, E., Aguilera-Pérez, P., González-Andrade, M.C. 2000 Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública de México* 42 (6) 490-495
- Haggerman, A. 2002 Tannin chemistry.
- Hammack, T.S., Valentin-Bon, I.E., Jacobson, A.P., Andrews, W.H., 2003 Relative effectiveness of the bacteriological analytical manual method for the recovery of *Salmonella* from whole Cantaloupes and Cantaloupe rinses with selected preenrichment media and rapid methods. *J. Food Prot.* 67 (5) 870-877
- Hernández-Martínez, J., García-Salazar, J., Mora-Flores, S., García-Mata, R., Valdivia-Alcalá, R y Portillo-Vázquez, M. 2006 Efectos de la eliminación de aranceles sobre las exportaciones de melón (*Cucumis melo* L.) de México a los Estados Unidos. *Agrociencia* 40 395-407
- Ito, H., Miyake, M., Nishitani, E., Mori, K., Hatano, T., Okuda, T., Knoshima, T., Takasaki, M., Kozuka, M., Mukainaka, T., Tokuda, H., Nishino, H., Yoshida, T., 1999 Anti-tumor promoting activity of polyphenols from *Cowania mexicana* and *Coleogyne ramosissima*. *Cancer letters* 143 5-13
- Izquierdo, L. 2002 Relación entre características sensoriales y aceptación de los consumidores. *Aplicaciones industriales y control de calidad.* 9-12
- Keinath, D.A., Beauvis, G. 2006 Wyoming pocket gopher (*Thomomys clusius*): A technical conservation assessment. Prepared for the USDA forest service, rocky mountain region, species conservation project.

- Kolodziej, H., Kayser, O., Kiderlen, A.F., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T., Foo, L.Y. 2001 Antileishamian activity of hydrolysable tannins and their modulatory effects on nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  release in macrophages *in Vitro Planta Med* 67 : 825-832
- Kosalec, I., Pepeljnjak, S., Bakmaz, M., Vladimir.Knezevic, S. 2005 Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharm.* 55 423-430
- Lalitha, M.K. 2004 Manual on antimicrobial susceptibility testing. Indian Association of Med Microbiologists.
- Lei, Z. 2002 Monomeric ellagitannins in oaks and sweetgum. Tesis [Doctorado] Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Lemus, G. 2004 El cultivo del pecano (*Carya illinoensis*). Proyecto de la Fundación para la Innovación Agraria.
- Leverentz, B., Conway, W.S., Janisiewicz, W., Abadias, M., Kurtzman, C.P., Camp, M.J. 2006 Biocontrol of the food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Serovar Poona on fresh-cut apples with naturally occurring bacterial and yeast antagonists. *Appl. Environ Microbiol* 72 (2) 1135-1140
- Makkar, H.P.S, Blümmel, M., Borrowy, N., Becker, K. 1992 Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agr.* 1 (2) 161-165
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. 2004 Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79 727-747



- McEachern, G.R, Stein, L.A. 1990 Texas pecan profitability handbook. Texas A&M Agricultural Extension Service.
- Meilgaard M.C., Civille G.V., Carr B.T. 2007. Sensory evaluation techniques. CRC Press (eds), pp. 173-6, 194-212
- Medheadlines [internet] 2008 Disponible en el sitio web <http://medheadlines.com/2008/03/23/cantaloupes-may-be-the-cause-of-salmonella-outbreak-fda-warns/>
- Medina-Morales, M.A. 2007 Producción de antioxidantes fenólicos a partir de la fermentación de residuos de nuez pecan. Tesis [Licenciatura] Universidad Autónoma de Coahuila
- Mohle-Boetani, J.C., Reporter, R., Benson, S., Abbott, S., Farrar, J., Waterman, S.H., Vugia, D.J. 1999 An outbreak of *Salmonella* serogroup Safra due to Cantaloupes from Mexico. J. Infectious Diseases 180: 1361-1364
- Mueller.Harvey, I., 2001 Analysis of hydrolysable tannins. Animal Feed Science and Tech. 91 3-20
- Naczk, M., Oickle, D., Pink, D., Shahidi, F. 1996 Protein precipitating capacity of crude Canola tannins: Effect of pH, tannin and protein concentrations. J. Agric. Food Chem. 44 2144-2148
- Nascimento, G.F., Locatelli, J., Freitas, P.C., Silva, G. L. 2000 Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic.resistant bacteria. Brazilian J. Microbiol. 31:247-256

- Neurath, A.R., Strick, N., Li, Y., Debnath, A. 2004 *Punica granatum* (Pomegranate) juice provides an HIV-I entry inhibitor and candidate topical microbicide. *BMC Infectious Diseases* 4:41
- New Mexico Environment Department. 2008 State reminds people to limit tomato consumption to safe list department of health continues to report rise in *Salmonella* patients.
- Olive, M. and Bean, P. 1999 Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin Microbiol* 37 (6) 1661-1669
- Orona-Castillo, I., Fortis-Hernández, M., Espinoza-Arellano, J.J., González-Cervantes, G., Salazar-Sosa, E., Rivera-González, M. 2005 La comercialización de nuez pecanera (*Carya illinoensis*) en la comarca lagunera.
- Osorio, E. 2007 Actividad antifúngica y antibacteriana de extractos polifenólicos contra microorganismos fitopatógenos. [Tesis de Ingeniería]. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, campus Saltillo.
- Padilla-Zakour, O. 2008 Grape phenols as natural agents for microbial control. [Ponencia] Cong. Inter. Inocuidad Alim. 2008
- Panizzi, L., Caponi, C., Catalano, S., Cioni, P.L., Morelli, I. 2002 In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *J. Ethnopharmacol.* 79 165-168
- Parish, M., Beuchat, L., Suslow, L., Harris, L., Garrett, E., Farber, J., Busta, F. 2003 Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. Vol. 2

- Parnell, T., Suslow, T. and Harris, L. 2003 Cantaloupe: Safe methods to store, preserve, and enjoy. Agriculture and Natural Resources publication 8093
- Prafull-Palekar, M. 2004 Attachment of *Salmonella* on Cantaloupe and effect of electron beam irradiation on quality and safety of sliced Cantaloupe. Tesis [Doctorado] Texas A&M University
- Priyadarsini, K.I., Khopde, S.M., Kumar, S.S., Mohan, H. 2002 Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. J. Agric. Food Chem. 50 : 2200-2206
- Produce Marketing Association y United Fresh Fruit and Vegetables Association. 2005 Lineamientos de inocuidad específicos para la cadena de abastecimiento del melón. 1ª Ed.
- Quirós, F.J., Zarco, P., Carmona, L., Collantes, E., Simón, F. 2007 Artritis reactiva por *Salmonella* Hadar en la epidemia de gastroenteritis asociada al consumo de pollo precocinado en España. Reumatol Clin. 3 (2) 36-38
- Raybaudi-Massilia, R., Soliva, R, Martín, O. 2006 Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frutas cortadas. Desarrollo de tecnologías para la conservación de vegetales frescos cortados p. 15-21
- Reyes-Carrillo, J., Muñoz, R., Cano, P., Nava, U., 2007 La polinización del melón por las abejas melíferas y el uso oportuno y adecuado de las colmenas. El campo avanza, No. 2 Subsecretaría Agropecuaria y de Comercialización p. 10
- Ruibal-Burnet, I.J., Dubed-Echeverría, M., Martínez-Luzardo, F., Noa-Romero, E., Vargas-Guevara, L.M., Santana-Romero, J.L. 2003 Inhibición de la replicación del virus de inmunodeficiencia humana por extractos de taninos de *Pinus caribaea* Morelet. Rev Cubana Farm. 37 (2)

- Ruiz-Cruz, S., Acedo-Félix, E., Díaz-Cinco, M., Islas-Osuna, M., González-Aguilar, G. 2007 Efficacy of sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* populations on fresh-cut carrots.
- Santander, J., Espinoza, J.C., Campano, M.S., Robeson, J. 2003 Infection of *Caenorhabditis elegans* by *Salmonella* Typhi Ty2. Electronic J. Biotech. 6 (2) 148-152
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N. 2001 Analysis of condensed tannins: a review. Animal Feed Science and Tech. 91 21-40
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2003 Proceso de Comercialización. Control de Calidad.
- Secretaría de Agricultura, ganadería, desarrollo Rural, Pesca y Alimentación 2008a Consumo nacional aparente de productos agrícolas seleccionados.
- Secretaría de Agricultura, ganadería, desarrollo Rural, Pesca y Alimentación 2008b Producción Agrícola, cíclicos y perennes 2006.
- Secretaría de Agricultura, ganadería, desarrollo Rural, Pesca y Alimentación 2008c Producción Agrícola, Estado Coahuila 2006.
- Secretaría de Salud 1995 Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera 2002 Análisis respecto al comportamiento de la producción y consumo del melón en México, así como su participación en el comercio internacional.

- Simonne, A. 2006 Melons: Safe handling practices for consumers. University of Florida Publications.
- Singh, B., Bhat, T.K., Singh, B. 2003 Potential therapeutic applications of some antinutritional plant secondary metabolites. *J. Agr. And Food Chem* 51: 5579-5597
- Singh, B.R., Singh, P., Verma, A., Agrawal, S., Babu, N., Chandra, M., Agarawal, R.K. 2006 A study on prevalence of multi-drug-resistant (MDR) *Salmonella* in water sprinkled on fresh vegetables in Bareilly, Moradabad and Kanpur (northern indian cities) *J. Pub. Health* 14: 125-131
- Smith-DeWaal, C. Bhuiya, F. 2006 Outbreaks by the numbers: Fruits and vegetables 1990-2005
- Sperber, W.A., Moorman, M.A., Freier, T.A. 2001 Cultural methods for the enrichment and isolation of microorganisms. In Pouch-Downes, F., Ito, K. Compendium of methods for the microbiological examinations of foods 4<sup>th</sup> Ed. American Public Health Associations p. 45
- Suslow, T. 2004 Minimizing the risk of foodborne illness associated with cantaloupe production and handling in California. California Cantaloupe Advisory Board, University of California.
- Thomson, N.R., Nasser, W., McGowan, S., Sebahia, M., Salmond, G.P.C. 1999 *Erwinia carotovora* has two KdgR-like proteins belonging to the lclR family of transcriptional regulators: identification and characterization of the RexZ and the KdgR repressor of pathogenesis. *Microbiol.* 145 1531-1545

- Ukuku, D.O., Pilizota, V., Sapers, G.M. 2004 Effect of hot water and hydrogen peroxide treatments on survival of *Salmonella* and microbial quality of whole and fresh-cut Cantaloupe. *J. Food Prot.* 67 (3) 432-437
- Ukuku, D.O., Fett, W. 2004 Method of applying sanitizers and simple preparation affects recovery of native microflora and *Salmonella* on whole Cantaloupe surfaces. *J. Food Prot.* 67 (5) 999-1004
- Ukuku, D.O., Fett, W. 2006 Effects of cell surface charge and hydrophobicity on attachment of 16 *Salmonella* serovars to Cantaloupe rind and decontamination with sanitizers. *J. Food Prot.* 69 (8) 1835-1843
- Ukuku, D.O., Fan, X., Kozempel, M., 2006 Effect of vacuum-steam-vacuum treatment on microbial quality of whole and fresh-cut cantaloupe. *J. of Food Prot.* 69 (7) 1623-1629
- United States Department of Agriculture (USDA) Servicio de Inocuidad e Inspección de los Alimentos 2007 *Salmonella* Preguntas y Respuestas.
- United States Department of Agriculture Natural Resources Conservation Service 2006 Pecan *Carya illinoensis* (Wangenh.) Plant Guide
- Uribe, C., Suárez, M.C. 2006 Salmonellosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Colombia médica* 37 (2) 151-158
- Uyanik, M.H., Yazgi, H., Ayyildiz, A. 2008 Survival of *Salmonella* Typhi and *Shigella flexneri* in different water samples and at different temperatures. *Turk J. Med. Sci.* 38 (4) 307-310

- Vadlamudi, S. 2004 Effect of sanitizer treatments on *Salmonella* enteric serotype Poona on the surface of Cantaloupe and cell transfer to the internal tissue during cutting practices. Tesis [Maestría] Texas A&M University
- Villarreal-Lozoya, J. E., Lombardini, L., Cisneros-Zevallos, L. 2007 Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan (*Carya illinoensis* W) cultivars. Food Chemistry. 102 1241-1249
- Virto, R., Mañas, P., Álvarez, I., Condon, S., Raso, J. 2005 Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate. Appl and Environ Microbiol. 71 (9) 5022-5028
- World Health Organization 2005 Drug-Resistant *Salmonella* [Internet] Disponible en la página web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/> [Revisado Abril de 2005]

### **RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO:**

Tesis: Actividad antimicrobiana de compuestos polifenólicos provenientes de extractos de cáscaras de nuez contra *Salmonella* sp. aplicados en el proceso de comercialización de melón (*Cucumis melo*).

Campo de estudio:

Inocuidad alimentaria.

Biografía:

Datos personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, el 7 de Agosto de 1985, hijo de Emilio Carranza Malacara y Laura Ninarth García Sabag.

Educación:

Egresado en 2006 de la Universidad Autónoma de Coahuila, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo.

Experiencia laboral:

Prácticas profesionales en el Laboratorio Arodi, análisis clínicos.