

Universidad de Costa Rica

Facultad de Microbiología

**Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de
Licenciatura en Microbiología y Química Clínica**

Microbiología de la pulpa de mango procesada industrialmente

Silvia Cristina Flores Angulo

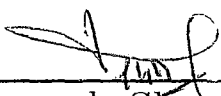
Tutor: Dr. José Gené

**Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
Julio 2010**

ARTICULO 5

El presidente del Tribunal comunica a la Postulante el resultado de la deliberación y la declara acreedora al grado de **Licenciada en Microbiología y Química Clínica** y al título profesional de **Doctora en Microbiología y Química Clínica**.

Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación al que será oportunamente convocada. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y a la Postulante, a las _____ horas.



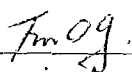
Dr. Fernando Chaves Mora
Presidente



Dra. Gabriela Davidovich Your



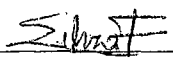
Dr. José Antonio Gené Valverde



Dra. Florencia Antillón Guerre



Dra. Mariela Rojas



Silvia Flores Angulo
Postulante

Dedicatoria

*-A mis padres, Carlos y Maribel por su apoyo incondicional durante toda la
carrera-*

Agradecimientos

Al Dr. Jose Gené y la Dra. Florencia Antillón por su guía y gran ayuda brindada.

Al Laboratorio Microtec S.A. por el financiamiento del proyecto.

Y sobre todo a Dios.

Índice general

Acta Declaratoria.....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Índice general.....	iv
Índice de cuadros.....	vi
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Justificación.....	5
Objetivos	6
Marco teórico.....	7
Capítulo 1. Generalidades de las frutas tropicales.....	7
1.1 Piña, fresa y naranja	8
1.2 Melón, papaya y banano	10
1.3 Mango.....	11
1.3.1. Generalidades	11
1.3.2. Composición.....	13
1.3.3. Importancia nutritiva.....	13

1.3.4. Cosecha y maduración.....	14
1.3.5. Conservación.....	15
1.3.5.1. Tratamiento térmico.....	15
1.3.6. Control poscosecha	15
Capítulo 2. Flora microbiana de las frutas.....	17
2.1 Flora microbiana normal.....	17
2.2 Flora microbiana de deterioro.....	18
2.2.1 Mohos y levaduras.....	18
2.2.2 Bacterias acidúricas.....	19
Capítulo 3. Microorganismos patógenos.....	20
3.1. Bacterias patógenas.....	21
3.2. Protozoarios.....	22
3.3. Virus	23
3.4. Microorganismos indicadores de contaminación fecal.....	24
Capítulo 4. Inocuidad de las frutas y buenas prácticas agrícolas.....	25
Materiales y métodos.....	27
Resultados.....	31
Discusión.....	33
Conclusiones.....	36
Anexos	38
Referencias.....	40

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del mango (Mora, 2002).....	12
Cuadro II. Componentes nutricionales del mango fresco.....	14
Cuadro III. Recuentos y pH para pulpa cruda de mango	31
Cuadro IV. Recuentos y pH para pulpa pasteurizada de mango.....	32
Cuadro V. Características de algunos patógenos que han sido asociados a brotes por alimentos (FDA, 2009).....	38
Cuadro VI. Patógenos causantes de brotes asociados a frutas frescas y congeladas (Pouch & Ito,2001).....	39

Resumen

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la calidad microbiológica de la pulpa cruda y pasteurizada de mango, procesada industrialmente, como proyecto piloto en Costa Rica. El consumo de frutas tropicales se ha incrementado en los últimos 20 años al mismo tiempo que los brotes por enfermedades transmitidas por alimentos asociados a *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Cyclospora* sp, *Cryptosporidium* sp, virus de la hepatitis A y de Norwalk en frutas frescas; jugos, cremogenados, pulpa, etc. Se analizó pulpa cruda y pasteurizada de mango, a la cual se le realizaron recuentos y se obtuvo un recuento aerobio mesófilo para pulpa cruda entre 10^2 y 10^5 UFC/g, el recuento de mohos y levaduras entre 0 y 10^2 UFC/g y el recuento de bacterias acidúricas entre 0 y 10^4 UFC/g. En el caso de la pulpa pasteurizada el recuento total aerobio estuvo entre 0 y 10^3 UFC/g, el de mohos y levaduras entre 0 y 10^4 UFC/g y el de bacterias acidúricas entre 0 y 10^2 UFC/g. Además, el recuento de esporulados aerobios estuvo entre 0 y 10^2 UFC/g. A 23 muestras se les realizó el conteo de coliformes totales, fecales y de *E. coli* y todas resultaron negativas. Además se analizó la presencia de *Salmonella* por PCR tiempo real y por cultivo tradicional encontrándose todas las muestras negativas para este patógeno. La detección de *Salmonella* por la técnica de PCR Bax ® System constituye un método fácil, rápido, sensible y específico para el análisis de pulpa de mango. El conocimiento de la microbiología del mango es de suma importancia ya que a partir de esta se pueden diseñar tratamientos que permiten mejorar y alargar la vida anaquel del producto, de interés a nivel económico e industrial para el país.

Palabras clave: pulpa de mango, microbiología, *Salmonella*.

Introducción

Las frutas tropicales han alcanzado gran valor económico en la industria alimentaria actual, mostrando un gran futuro comercial, ya que son la base a partir de la cual se elabora una amplia gama de productos (Salamanca *et al.*, 2008a). Los estudios dirigidos al aprovechamiento comercial de las frutas, el conocimiento de la composición química y sus componentes volátiles, son factores que contribuyen a las decisiones en el desarrollo de nuevos productos alimenticios (Salamanca *et al.*, 2008b). De igual manera, el perfil microbiológico es de mucha importancia en cuanto a inocuidad y vida útil de estos productos. Entre las diferentes frutas de importancia comercial producidas en nuestro país se encuentran la piña, papaya, banano, naranja, melón, sandía y mango.

A continuación se exponen algunos aspectos relevantes sobre frutas tropicales que forman parte de la dieta del costarricense y que son la base de la economía de nuestro país.

La piña se cultiva principalmente en regiones tropicales y subtropicales (Di Cagno *et al.*, 2010). Los países con mayor producción son Hawaii, México, Costa Rica, Brasil, Kenia, Filipinas, entre otros (Dominguez, 2004). Como fruta tropical, su cultivo es solo superado por el banano y los cítricos. En Costa Rica es un cultivo que ha tenido mucho auge en los últimos años y ha llegado a ser una importante fuente de divisas como fruta de exportación a Estados Unidos y Europa (Referencia electrónica 9). Para el año 2007 ocupó el segundo lugar como uno de los principales productos de exportación del sector agrícola (Referencia electrónica 1).

La papaya es una de las frutas tropicales más conocidas y consumidas a nivel mundial. En las empresas procesadoras de jugos y néctares, se utiliza la pulpa verde como materia prima para la elaboración de estos productos (García *et al.*, 2004). En las exportaciones de productos frescos de Costa Rica, para el 2007 representó un 0.2% de éstas. (Referencia electrónica 1)

Por otra parte la actividad bananera representa para la economía nacional la segunda fuente de divisas, superada únicamente por el café (Referencia electrónica 2). El banano ocupó el primer lugar tanto dentro de los principales productos de exportación del sector

agrícola (35.4%) como en productos frescos exportados (48.5%) para el año 2007 (Referencia electrónica 1).

Con respecto a los cítricos, la FAO publicó que la producción y el consumo mundial de naranjas han aumentado considerablemente desde mediados del decenio de 1980. Los mayores productores de naranja en el mundo son Brasil con 18 millones de tm, Estados Unidos con 11,7 millones de tm y México a mayor distancia con casi 4 millones de tm. (Referencia electrónica 5). Costa Rica produce y exporta concentrados de jugo de naranja, la mayor parte de los cuales provienen de la zona de Guanacaste y San Carlos.

El melón es un importante producto de exportación de Costa Rica. En el año 2007 generó ingresos por 82 millones de dólares. Dentro de los principales productos frescos de Costa Rica, el melón representa el 6% de estas exportaciones en el 2007. Y ocupa el cuarto lugar dentro de los productos de exportación del sector agrícola costarricense en el mismo año (Referencia electrónica 1).

En general, todas las frutas mencionadas anteriormente se encuentran contaminadas tanto por fuentes externas como internas y es por esto que cada alimento dependiendo de su composición físico-química permite el desarrollo de un tipo específico de microorganismos (García *et al.*, 2004). El crecimiento de microorganismos patógenos en las frutas ha sido evaluado en diversos estudios que ponen de manifiesto el riesgo potencial de causar brotes en la población. Se destacan como causantes de enfermedades de origen alimentario *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

La intoxicación por *S. aureus* se debe a la ingestión de exotoxinas, que provocan náuseas, vómito, dolores abdominales y diarrea. En el caso de *E. coli* O157H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella sp.* causan infección provocando desórdenes gastrointestinales. A continuación se revisan algunos reportes realizados en diferentes frutas de interés comercial.

Se ha estudiado el crecimiento de microorganismos patógenos como *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes* en pulpa de melón, sandía y papaya y se confirmó que estas frutas de baja acidez son un buen sustrato para la sobrevivencia y crecimiento de ambas bacterias, y que las temperaturas bajas retrasan pero no detienen el crecimiento de

las mismas (Penteado & Leitao, 2004a y b).

Frutos mínimamente procesados como melón cantaloupe y el mango Keitt proporcionan condiciones tales como pH y fuente de carbono que favorecen la sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. (Castro *et al.*, 2004).

Por otro lado la carga microbiana por organismos no patógenos, causantes de deterioro, se ha evaluado y se ha encontrado que en el caso de la papaya, la pulpa de la variedad Cartagena presentó el valor más alto de recuentos de mohos y levaduras, mientras que la de Maradol presentó un mayor número de coliformes totales y aerobios mesófilos (García *et al.*, 2004).

El melón se puede considerar como una fruta de alta humedad (a_w : 0.985) y baja acidez (pH: 6.55), condiciones que aunadas a su aporte nutricional la caracterizan como un buen sustrato para el crecimiento microbiano (Millán *et al.*, 2001). Al mismo tiempo, es bien conocido el hecho de que frecuentemente hay brotes de *Salmonella* en melón, a tal punto que su producción ha sido inclusive eliminada por compañías americanas en el área centroamérica, como en el caso de un brote por *Salmonella* en melón proveniente de honduras en el año 2008.

En los últimos años el mercado para mango está creciendo (Referencia electrónica 8) y constituye un producto de gran relevancia a nivel nacional. Para el 2007 el mango ocupó un 0.3% de las exportaciones de productos frescos costarricenses (Referencia electrónica 1). El cultivo de mango se ha convertido en una fuente de empleo en las zonas rurales de Alajuela, Guanacaste y San José (Referencia electrónica 2). Se han realizado estudios sobre agentes microbiológicos asociados a cremogenados de mango encontrándose recuentos aerobios mesófilos de 580 UFC/g, 40 UFC/g para los mohos y 520 UFC/g para levaduras y un valor promedio de pH de 3.98 ± 0.12 (Salamanca & Abril, 2008).

Justificación

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, es evidente la importancia económica de las frutas tropicales para la economía de los países del área. El mango particularmente se exporta desde hace pocos años y ha cobrado cada vez más relevancia. Por lo tanto, es importante la aplicación de los conocimientos microbiológicos para garantizar la inocuidad y la calidad del producto y su procesamiento. El efecto de los microorganismos en productos derivados de frutas es una causa importante de deterioro y genera pérdidas económicas para las empresas exportadoras. La enumeración y caracterización de los microorganismos presentes, tanto en la fruta fresca como en los productos derivados, permitirán definir claramente las causas microbiológicas del deterioro, lo cual será de gran ayuda para establecer las medidas necesarias para evitarlo o retardarlo, generando un producto de mejor calidad y una vida útil mayor (Pouch & Ito, 2001).

El objetivo de este proyecto es determinar la calidad microbiológica de la pulpa cruda y pasteurizada de mango procesada industrialmente. Esta información será utilizada para obtener el diseño de procesos y estudios similares en el futuro.

Actualmente hay pocos estudios dedicados a este tema y estos se centran sobre todo en el área de inocuidad y no en la calidad de los productos, por lo que la presente investigación puede aportar información valiosa en este tema de gran importancia económica.

Objetivo General

Determinar la microbiología de la pulpa cruda de mango y la pulpa pasteurizada de mango, procesada industrialmente en Costa Rica como proyecto piloto.

Objetivos específicos

- Realizar ensayos microbiológicos en pulpa de mango, recuento total aerobio mesófilo, recuento de esporulados aerobios, recuento de mohos y levaduras, y recuento de bacterias acidúricas.
- Determinar la presencia de *Salmonella* por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Bax ® System en las muestras de pulpa cruda y pasteurizada de mango procesada.

Capítulo 1

Generalidades de las frutas tropicales

Las frutas tropicales como el mango, papaya, fresa, banano, melón, sandía y piña forman parte importante del mercado debido a su alta preferencia por parte del consumidor y su disponibilidad. Además de su atractivo color y olor, las frutas tropicales poseen cantidades importantes de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante, tales como las vitaminas C y E, carotenoides y polifenoles, especialmente flavonoides. Estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de frutas tiene un efecto benéfico en la salud y contribuye a la prevención de procesos degenerativos, particularmente aterosclerosis y cáncer (Robles *et al.*, 2007). Se pueden consumir como fruta fresca o industrializada en jugos, néctares, vinos, vinagres, mermeladas, pastas, siropes, confites, trozos en almíbar y otros (González, 1997). El procesamiento mínimo de los frutos puede afectar el contenido, composición, actividad y biodisponibilidad de los antioxidantes presentes en ellas (Robles *et al.*, 2007). Un incremento en las ventas de frutas frescas en EU en aprox 3,3 billones de dólares en 1994 a 15 billones de dólares en el 2005 demuestran la popularidad de estos productos (Strawn & Danyluk, 2010).

La carga inicial de microorganismos está determinada por diversos factores, dentro de los cuales se pueden mencionar, la calidad microbiológica del agua utilizada para riego, la presencia de animales en las zonas aledañas al cultivo, la técnica a la hora de cosecharlas, entre otros (Pouch & Ito, 2001; Izquierdo *et al.*, 2007). Dentro de las causas de pérdida de calidad de estas se encuentran, el deterioro de origen microbiano, la sobremaduración y la gran sensibilidad a bajas temperaturas por ser frutas de clima tropical (Yahia *et al.*, 1991).

Las frutas tropicales usualmente se consumen frescas y sin ningún tratamiento que prevenga el crecimiento de microorganismos. Por esta razón pueden convertirse fácilmente en vehículo de transmisión de microorganismos patógenos (Pouch & Ito, 2001).

1.1. Piña, fresa y naranja

Dentro de las frutas tropicales que poseen un pH ácido se encuentran la piña, fresa y naranja, el valor de pH depende de las características intrínsecas de cada una pero generalmente se encuentran en un rango de 3-6.

En el caso de la piña, esta pertenece a la familia Bromeliaceae. Las condiciones óptimas para la siembra de esta fruta son una altitud entre 300 y 900 metros sobre el nivel del mar, una temperatura de 25 °C, además requiere suelos con pH ácido. El rango de temperaturas óptimas de almacenamiento que se recomienda es de 7.5 a 12 °C, con humedades relativas de 70 a 95%. Los nutrientes principales de la piña son los carbohidratos simples. Las proteínas y grasas están presentes en cantidades sumamente bajas. En cuanto a minerales destaca su contenido de potasio, magnesio, cobre y manganeso. Las vitaminas más abundantes son la vitamina C y en menor cantidad la vitamina B1 y B6. Contiene ácidos cítrico y málico, responsables de la acidez del fruto. La piña es rica en carotenos y azúcares (Dominguez, 2004). En muchos países la piña se consume principalmente en forma de jugo. Las industrias procesadoras de esta fruta enfrentan el reto de mantener el aroma y sabor exótico del producto por lo que deben optimizar y mejorar el procesamiento del producto para alcanzar un jugo de mejor calidad (De Vasconcelos *et al.*, 2010). Las piñas frescas y congeladas son vectores potenciales para la transmisión de *E. coli* 0157:H7 y *Salmonella* por lo que Strawn señala que se deben implementar procedimientos preventivos durante la producción y procesamiento post cosecha (Strawn *et al.*, 2010).

La fresa es una planta que pertenece a la familia de las Rosaceas (Cárdenas & Solano, 2003) y su desarrollo también se ve influido por la temperatura, la luminosidad y la duración del día. En Costa Rica las zonas de producción están entre los 1300 y 2000 m sobre el nivel del mar. La temperatura óptima es de 14°C y necesita 12 horas de luz para producir (Matamoros, 1986). La fresa crece bien en una amplia variedad de suelos. El rango de pH anda ente 3.5 y 5.8 y el suelo debe ser rico en materia orgánica (Barahona, 1992). La mejor forma para cultivarla es utilizando plástico negro, ya que se ha

comprobado que se obtienen frutos de mejor calidad, se controlan en forma eficiente las malezas y conserva la humedad del suelo (Matamoros, 1986). El contenido nutricional cambia de acuerdo con la variedad, fertilidad del suelo y las condiciones climáticas. Es rica en vitamina A y C. Contiene ácido cítrico, málico, tartárico, etc. (Matamoros, 1986; Barahona, 1992). Las fresas normalmente contienen un gran número de microorganismos, sus recuentos oscilan entre 10^5 y 10^6 UFC/g y debido a su alta acidez, son las levaduras y hongos filamentosos los grupos predominantes. Estas poblaciones se multiplican dramáticamente durante el almacenaje del producto, produciendo eventualmente su deterioro (Cárdenas & Solano, 2003). *E. coli* O157: H7 puede sobrevivir bien en jugos de frutas ácidas, como es el caso de las fresas, en ambas temperaturas de incubación (4°C y temperatura ambiente) y también podría crecer en jugos con valores de pH (> 5,7) más alto (Mutaku *et al.*, 2005).

La naranja pertenece a la familia de las Rutáceas. Se desarrollan entre los 400-1200 m sobre el nivel del mar. La mejor calidad se obtiene a temperaturas entre los 18°C y los 34°C. Necesita más de cinco horas de luz al día. Se pueden cultivar con precipitaciones desde 900 hasta 2500 mm. El suelo para sembrar debe ser de textura franca, bien drenado y con una profundidad de 1 a 2 metros (Referencia electrónica 2), poseen la capacidad inherente de soportar pH ácidos entre 5,5 a 6,8. El aumento de las bacterias lácticas provoca el deterioro organoléptico del jugo (Vanderzant & Splittstoesser, 1992). En un estudio de Araya se encontró que el jugo concentrado de naranja presenta alta estabilidad (los conteos microbiológicos resultaron menores a 10 UFC/ml), esto lo atribuyen a la alta acidez del producto (3,77). Además la estabilidad se vio favorecida por las temperaturas de congelación empleadas (-12 y -20,5°C) ya que esto ayuda a retardar las reacciones químicas y la actividad de las enzimas y de los microorganismos existentes. Gran cantidad de brotes de salmonelosis asociados a jugo de naranja para el año 2001 llevaron al estudio de la sobrevivencia de *Salmonella* aislada de diferentes fuentes (humanos, animales y brotes de productos) en jugo de naranja suplementado con calcio y se encontró que este afecta significativamente la sobrevivencia de este patógeno. (Sharma *et al.*, 2001).

1.2. Melón, banano y papaya

El banano, el melón y la papaya se caracterizan por ser frutas tropicales con una acidez semejante, de manera que podrían clasificarse como relativamente ácidas, ya que poseen un pH promedio de 4 a 6.

El melón pertenece a la familia Cucurbitaceae (Morales, 1999). El deterioro del producto se da porque la fruta cosechada es un sistema biológico independiente que ha perdido el suministro de agua y nutrientes de la planta (Yahia & Rivera, 1991). Los microorganismos causantes de enfermedades en el melón son: *Botrytis cinérea*, que produce una podredumbre gris. *Geotrichum candidum* produce una podredumbre blanca acuosa (Morales, 1999). El crecimiento de microorganismos patógenos en las superficies intactas de las frutas no es común, sin embargo, existen reportes de crecimiento de *E.coli* O157:H7 en la superficie de la sandía y el melón. El melón es considerado un alimento potencialmente peligroso en el Código Alimentario de la FDA debido a que es capaz de soportar el crecimiento de patógenos debido a la baja acidez (pH 5,2-6,7) y a la actividad de agua alta (0,97-0,99). En un estudio realizado por Sharma y colaboradores en el 2005 se encontró que *Salmonella* y *E. coli* O157:H7, quienes se encuentran adaptadas a ambientes ácidos, pueden aumentar su tolerancia térmica en jugo de melón y sandía, por lo que esto es importante para el desarrollo de nuevos procesos de pasteurización.

El banano pertenece a la familia Musaceae (González, 2001). La temperatura adecuada para su cultivo va desde los 18,5°C a 35,5°C. La pluviosidad necesaria varía de 120 a 150 mm de lluvia mensual. La principal enfermedad que afecta al banano es la sigatoka amarilla (*Mycosphaella musicola*) y la principal plaga es el picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) que produce la muerte de las raíces. Entre los nematodos el más importante es barrenador (*Radopholus similis*) el cual produce necrosis en las raíces (Referencia electrónica 2).

La papaya es una planta perteneciente a la familia Caricaceae, originaria de centro y suramérica, por lo cual, se desarrolla de manera óptima en Costa Rica. Su cultivo es muy delicado y las plantas deben ser protegidas contra el viento y deben ser sembradas en suelos

permeables y con buen drenaje, aireados, fértiles, ricos en materia orgánica, con un pH neutro (6-7), y sobre topografías planas (González, 1997). Está compuesta de un 85% de agua, 10% azúcares y 5% fibras y otras sustancias (Durán, 1985). Las principales enfermedades que atacan a la papaya en el campo son fungosas. Pueden ser del tipo de pudriciones superficiales, basales o infecciones internas. La más importante de ellas es la antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. En cuanto a plagas que atacan al cultivo, se puede mencionar que las principales son la mosca de la fruta, *Ceratitidis capitata*, la cual causa pudrición en frutos a la madurez y la mosca *Toxotripa curvicauda*, la cual causa un aborto de frutos o daños en éstos (González, 1997)

1.3 Mango

1.3.1 Generalidades del mango

El mango es una fruta popular y conocida como el rey de las frutas. Se cree que es una de las frutas más antiguas cultivadas, su origen es encontrado en la región de Indo-Burma. Es un cultivo de clima tropical y subtropical, por lo que su distribución geográfica se encuentra entre los trópicos de Cáncer y Capricornio. Crece en zonas tropicales a alturas de 4000 m sobre el nivel del mar, y a 2000 m en zonas donde las estaciones estén muy marcadas. Las condiciones de clima que requiere para un buen desarrollo y alta producción son: una época seca de por lo menos tres meses de floración, una temperatura óptima considerada entre 24 a 27°C, suelos cuyo pH esté alrededor de 5.5-5.7 y una altitud máxima de 600 metros; para su buen desarrollo se prefieren los suelos bien drenados, profundos y fértiles (Salamanca & Abril, 2008). En su mayor parte, este fruto es consumido fresco, pero también puede consumirse en forma procesada, ya sea como enlatados, congelados, deshidratados.

Es una fruta climatérica que en estado de maduración, ideal para consumo, dura pocos días. El tamaño del fruto varía de 2,5-30 cm de largo. Su forma es ovalada o redonda. El color depende de la zona donde esté cultivado, pero abarca mezclas de verde, amarillo y

rojo. Es considerado uno de los frutos tropicales más importantes por su sabor, coloración y aroma característicos y atractivos (Reis *et al.*, 2006).

Es una planta dicotiledónea que pertenece a la familia Anacardiaceae (Referencia electrónica 2) que incluye alrededor de 600 miembros y que de acuerdo a su clasificación taxonómica se ubica de la siguiente manera:

Cuadro I. Clasificación taxonómica del mango

Clase	Dicotiledóneas
Subclase	Rosidae
Orden	Sapindales
Suborden	Anacardiineae
Familia	Anacardiaceae
Género	Mangifera
Especie	indica

Tomado de Mora & Gamboa, 2002

En el mundo se producen aproximadamente 14 millones de toneladas por año, proveniente de los 111 países que producen mango, pero su mayor parte se consume en los países productores. Las exportaciones son hechas entre otros por Haití, Kenia, India, Burkina Faso, Pakistán, Filipinas, Tailandia, México y Brasil; los dos últimos son los mayores exportadores en el mundo y ambos exportan a Estados Unidos de América, principalmente. Los países importadores son Estados Unidos, Francia e Inglaterra y en los últimos años también los holandeses y alemanes aumentaron el consumo (Referencia electrónica 8).

1.3.2 Composición

La semilla del mango abarca del 9 al 27% aproximadamente del peso total de la fruta. El color del pellejo y la pulpa varía con la madurez y el cultivo. La parte comestible del fruto total corresponde entre el 60 y 75%. El componente mayoritario es el agua en un 84%. El contenido de azúcar varía de 10-20% y las proteínas en un 0,5%. El ácido predominante es el ácido cítrico, aunque también se encuentran el ácido málico, succínico, urónico, tartárico y oxálico en cantidades menores (Referencia electrónica 10).

1.3.3 Importancia nutritiva

Representa un valioso suplemento dietético, pues es rico en vitaminas A y C, minerales, fibras, antioxidantes, pequeñas cantidades de vitaminas del complejo B, además, es bajo en calorías, grasas y sodio (Reis *et al.*, 2006). Su composición depende de la variedad, así como del estado de madurez que tenga. El contenido de ácido ascórbico y la acidez total disminuyen durante el desarrollo del fruto, mientras que los carotenoides y azúcares totales aumentan. A continuación se exponen los componentes nutricionales que han sido reportados en la literatura que revelan su importancia en la dieta.

Cuadro II. Componentes nutricionales del mango fresco

Componentes	Valor medio
Agua (g)	81.8
Carbohidratos (g)	16.4
Fibra	0.7
Vitamina A (U.I)	1100
Proteínas (g)	0.5
Acido ascórbico (mg)	80
Fósforo (mg)	14
Calcio (mg)	10
Hierro (mg)	0.4
Grasa (mg)	0.1
Niacina (mg)	0.04
Tiamina (mg)	0.04

Disponible en http://www.abcagro.com/frutas/frutas_tropicales/mango4.asp

1.3.4 Cosecha y maduración

Una maduración adecuada al momento de recolección es indispensable ya sea para la venta del producto fresco o para su procesamiento. Esta fruta si se recolecta demasiado verde se produce una maduración anormal y desarrolla arrugamiento del pellejo, sabor, color y aroma pobres aún si se usan maduradores artificiales como el acetileno o etileno, los cuales solo mejoran el color. Si se cosecha sobremadurado tampoco es bueno, ya que no se pueden almacenar satisfactoriamente y se puede desarrollar una pulpa muy suave (Referencia electrónica 10).

1.3.5 Conservación

El propósito de la conservación de alimentos es alargar la vida anaquel. Se debe de considerar que el proceso de preservación puede no retener todas las características deseables de la fruta. Las principales formas de conservar las frutas son: mínimamente procesadas, enlatadas, congeladas, deshidratadas, irradiadas, cristalizadas y deshidratadas osmóticamente o sometidas a altas presiones, entre otras (Referencia electrónica 10).

1.3.5.1 Tratamiento térmico

Las altas temperaturas pueden traer cambios deseables, como la muerte de microorganismos e inactivación de enzimas; o indeseables, como son la pérdida de factores de calidad y degradación de nutrientes; como las vitaminas. El proceso depende del tipo de alimento, composición química y tipo de microorganismos que puedan dañar al alimento o a la salud de los seres humanos. Para obtener un producto de calidad, se debe optimizar el tratamiento basándose en las diferencias existentes de la dependencia de la temperatura, entre la inactivación de microorganismos y los cambios sensoriales (Referencia electrónica 10). Para determinar el tratamiento térmico de un producto, se debe de conocer la velocidad de destrucción de microorganismos, enzimas o parámetro de calidad de interés, historial de temperaturas del producto (Referencia electrónica 10).

1.3.6 Control poscosecha

Uno de los desafíos para la comercialización exitosa de mangos es su vida útil limitada (típicamente 14 a 28 días en la etapa verde madura y hasta una semana en la etapa madura). La tecnología poscosecha que extiende la vida anaquel de los mangos sin afectar por el contrario su calidad al momento del consumo es de valor considerable para la industria (Yahia, 2006). El manejo poscosecha del mango es importante para su comercialización exitosa. El factor más crítico que afecta la vida poscosecha del mango es

el manejo de su temperatura. El rango de temperaturas entre 20 a 23 °C resulta en la fruta de mejor aspecto y buen sabor. Los mangos se pueden sostener entre 10 a 13 °C para ampliar su vida útil. El mantenimiento de los mangos fuera de este rango de temperaturas da lugar a una fruta de menor calidad, y puede dañar la fruta. La tasa de maduración se puede acelerar con el tratamiento de mangos verde maduros con 100 ppm de etileno durante 24 horas. La humedad relativa se debe mantener entre 90 y 95% durante todos los puntos de la cadena postcosecha para reducir al mínimo las pérdidas de agua y el desecamiento de los mangos (Yahia, 2006). Varios métodos se han evaluado para alargar la vida postcosecha de los mangos, estos métodos generalmente se basan en el control de la disponibilidad o acción del O₂, el CO₂ y el etileno durante la maduración. Los estudios de investigación en estas técnicas demuestran generalmente un retraso en la maduración (y así una extensión en la vida útil) en un rango de entre 2 y 10 días (Yahia, 2006).

Capítulo 2.

Flora microbiana de las frutas

2.1 Flora microbiana normal

Las fuentes de flora microbiana normal de frutas y vegetales son muy amplias. Fuentes importantes de contaminación incluyen las plantas, animales, suelo, agua, polvo. Además, las actividades llevadas a cabo durante la cosecha como el contacto con las manos de los trabajadores y el equipo utilizado durante la misma (Pouch & Ito, 2001).

El pH es el factor más importante que determina el tipo de microorganismos que colonizan y deterioran las frutas. Muchas bacterias se inhiben por estos valores bajos de pH encontrados de manera natural en las frutas. Por lo que sólo los microorganismos capaces de tolerar esas condiciones ($\text{pH} < 5.4$) como mohos, levaduras y bacterias acidúricas son los que predominan (Pouch & Ito, 2001).

Los recuentos aerobios reportados en productos frescos como las frutas pueden ser tan altos como 10^9 UFC/g, pero normalmente se encuentran en el rango de 10^4 - 10^6 UFC/g. Existen muchos factores que influyen sobre estos recuentos, como las condiciones climáticas, pluviosidad, presencia de animales en los alrededores, daño físico en los frutos, entre otros. Normalmente los recuentos altos de microorganismos se asocian con deterioro, pero en muchos casos podemos observar recuentos altos en el rango de 10^6 - 10^7 UFC/g en ausencia de deterioro (Pouch & Ito, 2001).

Luego de ser cosechadas y durante el almacenamiento, las poblaciones de microorganismos tienden a incrementar, el grado de aumento depende de las condiciones de almacenamiento como temperatura y humedad. Además, los mismos procedimientos durante el proceso van a afectar el tipo de los microorganismos presentes. Ejemplos de estos procedimientos son el lavado, cortado o picado, extracción, congelado, entre otros. Si se realizan correctamente, siguiendo las buenas prácticas de manufactura, algunos de estos procesos lograrán bajar la carga microbiana, pero por el contrario, si no se realizan de la

manera adecuada pueden más bien ser fuente de contaminación extra, aumentando los recuentos microbianos (Pouch & Ito, 2001).

2.2 Flora microbiana de deterioro

Las pérdidas postcosecha de frutas tropicales son un serio problema debido al rápido deterioro durante el manejo, transporte y almacenamiento, los procesamientos de las mismas agravan el problema, ya que, se incrementa la actividad metabólica y descompartimentalización de enzimas y sustratos, causando oscurecimiento, ablandamiento, deterioro microbiológico y desarrollo de sabores y olores indeseables. El procesamiento mínimo da como resultado el incremento en la tasa de respiración y producción de etileno del producto en minutos y puede reducir la vida media de 1-2 semanas a solo 1-3 días, aún cuando las temperaturas sean las óptimas (Robles *et al.*, 2007).

2.2.1. Mohos y levaduras

Los hongos son agentes microbianos preferentemente aerobios, el pH asociado a su actividad óptima, es ligeramente ácido (en un rango de 2 a 9). Estos microorganismos son capaces de crecer a valores de actividad de agua reducida, condiciones que le permiten adaptarse a las condiciones de hábitat que ofrecen los cremogenados de frutas, como es un agente aerobio, su actividad metabólica queda restringida y por ello actúa sobre la superficie exterior de los concentrados. Los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, son osmotolerantes y soportan altas concentraciones de azúcares disueltos y entornos viscosos, así como reducidos valores de pH (Salamanca *et al.*, 2008 a). Muchos hongos pueden cambiar las condiciones iniciales de pH del sustrato a unas más favorables para su crecimiento: usualmente en un pH de 4-6.5. La temperatura de crecimiento varía de los 5-35°C; con algunas excepciones que pueden crecer arriba o debajo de este rango. Tanto las condiciones cálidas como la humedad favorecen el crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas (Vanderzant, 1992).

El recuento de mohos y levaduras en los alimentos es útil para evaluar la calidad de los alimentos y el grado de deterioro, y se está convirtiendo en un componente esencial para los programas de garantía microbiológica. El desarrollo de medios de cultivo para aislar los hongos de los alimentos ha mejorado y nuevas técnicas para la detección de hongos en los alimentos se han desarrollado (Taniwaki, 2001).

2.2.2. Bacterias acidúricas

Son bacterias que tienen la capacidad de sobrevivir en presencia de considerables cantidades de ácido. Dentro de este grupo se encuentran las bacterias ácido lácticas constituyen un grupo bacteriano heterogéneo formado por bacilos y cocos gram positivos, que tienen en común la habilidad de fermentar azúcares, formando ácidos (entre ellos el ácido láctico) que lleva a la acidificación del medio pudiendo alcanzar un pH de 3,5. Estas bacterias tienen un metabolismo anaerobio facultativo y no tienen actividad catalasa. Por otro lado, estas bacterias contribuyen al desarrollo de características organolépticas; sabor, olor, textura (Charlier *et al.*, 2009). También se pueden encontrar bacterias pertenecientes a los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Zymomonas*. Algunos géneros de importancia en el grupo de acidolácticas son *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, pues se consideran muy termoresistentes. Otros acidúricos que se pueden encontrar son *Bacillus coagulans*, *Clostridium pasteurianum* y *Alicylobacillus acidoterrestis* de gran importancia en productos ácidos (Pouch & Ito, 2001).

Capítulo 3

Microorganismos patógenos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) han sido consideradas como un grave problema de salud pública a escala mundial. En el continente americano, las ETA figuran entre las primeras cinco causas de muerte en menores de 5 años. Cada año aumenta el número de personas afectadas por ETA, causadas por la ingestión de alimentos mal procesados o pobremente manipulados o preparados. Las ETA se ponen de manifiesto por diversos síntomas entre los que se pueden incluir: vómitos, diarrea, cólicos, dolores intestinales, fiebre y postración. Se considera por lo tanto, que la mayoría de los alimentos son peligros potenciales para el consumidor, cuando no se siguen las buenas prácticas de fabricación y por lo tanto no hay una manipulación adecuada de los alimentos (De Curtis *et al.*, 2000).

El aislamiento de microorganismos patógenos en alimentos es una tarea difícil si se toma en cuenta que éstos se encuentran en muy bajas concentraciones, son lábiles y pueden ser inhibidos por la flora de competencia. Esto también depende mucho de la sensibilidad de las técnicas utilizadas. Existe una correlación entre la presencia de *E. coli* en los alimentos y la presencia de agentes etiológicos productores de enfermedades (Vanderzant, 1992).

Los brotes de enfermedades asociadas al consumo de jugo de frutas han sido un problema de salud pública que ha ido en aumento desde inicios de los 90's. De 1995 al 2005, se reportaron al centro de control de enfermedades (CDC) 21 brotes asociados a jugos; 10 implicaban jugo de manzana o sidra, 6 se relacionaban al jugo de naranja, y 3 a otros tipos de jugo de fruta. Estos brotes causaron 1366 enfermedades, con una media de 21 casos por brote. Entre los 13 brotes de etiología conocida, 5 fueron causados por *Salmonella*, 5 por *Escherichia coli* 0157:H7 y 3 por *Cryptosporidium*. Se ha encontrado que menos brotes han sido asociados a jugos desde que se implementó la regulación HACCP para jugos (Vojdani *et al.*, 2008).

Dentro de los patógenos de alimentos asociados con el consumo de frutas y hortalizas frescas se encuentran los siguientes: *Cyclospora cayentanensis*, *Escherichia coli* O157:H7, el virus de la hepatitis A, *Listeria monocytogenes*, *Norovirus*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. (Referencia electrónica 6). A continuación se exponen algunos de los más importantes.

3.1. Bacterias patógenas

El consumo de frutas tropicales per capita se ha incrementado en un 33% en los últimos 20 años. En los últimos 20 años los brotes por enfermedades transmitidas por alimentos asociadas a *E coli* O157:H7 y *Salmonella* en frutas y jugos se ha incrementado. Brotes de salmonelosis han sido relacionados al consumo de mango y papaya. Se han documentado 4 brotes de Salmonelosis en EU, estos ocurrieron en 1998, 1999, 2001 y 2003, en todos los casos se trataba de mango importado. *Salmonella* puede internalizarse en la pulpa del mango intacto durante los tratamientos postcosecha. En el caso de *E. coli* O157:H7 puede sobrevivir en la pulpa de mango por 13 días a 6°C o 10°C y en jugo de mango 8 días a 7°C y 6 días a 25°C. *E coli* O157:H7 puede crecer en jugo de papaya a 4 y 20°C (Strawn & Danyluk, 2010).

E. coli O157: H7 es una bacteria potencialmente mortal que produce grandes cantidades de potentes toxinas que pueden causar graves daños en el revestimiento de los intestinos. Enfermedades humanas asociadas con *E. coli* O157: H7 pueden incluir diarrea sin sangre, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y púrpura trombótica trombocitopénica. *E. coli* O157: H7 se ha asociado con carne, productos frescos, leche cruda, zumo de manzana y agua contaminada (Referencia electrónica 6).

Salmonella es la segunda causa más común de enfermedades transmitidas por alimentos en los Estados Unidos y es responsable de millones de casos de enfermedades cada año (Referencia electrónica 6). Su dosis infectante varía de 10^5 y 10^9 /g y según el tipo de alimento y el huésped puede llegar a ser tan baja como 6×10^1 /g (Vanderzant, 1992).

Los síntomas típicos de la salmonelosis son náuseas, vómitos, calambres abdominales, fiebre, diarrea leve, y dolor de cabeza, estos síntomas generalmente duran 6-48 horas. Los brotes de *Salmonella* se han asociado con el consumo de huevos crudos y cocidos, carne mal cocida, productos lácteos elaborados con leche sin pasteurizar, camarones, productos frescos, chocolates, jugos de frutas no pasteurizados y además contaminación de aguas (Referencia electrónica 6 y referencia electrónica 4). La recuperación de *Salmonella* de frutas homogenizadas con un pH menor a 4,53 es significativamente menor que aquellas con un pH entre 5,53 y 5,99, por lo que se demuestra que la acidez en una fruta puede ser un factor protector, ya que es letal para la bacteria este tipo de ambiente (Burnett & Beuchat, 2001).

3.2. Protozoarios

Recientemente *Cyclospora cayetanensis* y *Cryptosporidium* sp. han emergido como importantes patógenos vinculados con el consumo de frutas frescas (Calvo *et al.*, 2004).

Las infecciones por *Cyclospora* (ciclosporiasis) son causadas por el protozoario *Cyclospora cayetanensis*. La infección se transmite por la ingestión de alimentos o de agua contaminados con heces infectadas. El huésped natural de este parásito no ha sido identificado, sin embargo, el agua contaminada para el riego y la aplicación de plaguicidas y la higiene de los trabajadores se ha sugerido que son las rutas más probables de contaminación. El cuadro clínico se caracteriza por diarrea acuosa, pérdida de apetito, pérdida de peso, distensión abdominal y cólicos, fiebre baja, náuseas, vómitos y fatiga. Los brotes de ciclosporiasis se han relacionado con frambuesas frescas, lechuga y albahaca. Frambuesas y moras se han implicado en al menos cinco brotes, dos relacionados con numerosos estados y provincias de Canadá (Referencia electrónica 6). En 1996 ocurrió un gran brote de ciclosporidiosis en América del Norte, se reportaron 1465 casos, de los cuales 66,8% fueron confirmados por laboratorio. El consumo de frambuesas provenientes de Guatemala fueron las causantes del brote (Herwaldt & Ackers, 1997).

La criptosporidiosis intestinal se caracteriza por producir diarrea acuosa. La dosis infecciosa es inferior a 10 organismos y presumiblemente, un organismo puede iniciar una infección. Los ooquistes se desprenden en las heces del individuo infectado. La incidencia es mayor en los centros de atención infantil diurna donde se sirve comida. Fuentes de contaminación pueden ser por manipulación directa o por uso de fertilizantes a base de estiércol. Se han asociado grandes brotes relacionados con el suministro de agua contaminada que sugiere que el agua de riego contaminada puede ser otra vía de contaminación (Referencia electrónica 7). Además, se han reportado brotes por consumo de jugo de manzana no pasteurizado (Pouch & Ito, 2001).

3.3. Virus

Los virus son responsables de diversas epidemias de origen alimentario. La investigación de la presencia de virus en los alimentos se convirtió en una necesidad de salud pública como consecuencia de la aparición de epidemias víricas que comenzaron en los años cuarenta y se intensificaron en los ochenta, claramente relacionadas con el consumo de frutas y vegetales, leche, carnes, agua y pescados contaminados (Ferrari & Torres, 1998).

El virus de la hepatitis A puede causar una enfermedad que se caracteriza por la aparición repentina de fiebre, malestar general, náuseas, anorexia y malestar abdominal, seguidos en pocos días de ictericia. El virus de la hepatitis A se excreta en la materia fecal y se transmite por vía fecal-oral. Por lo que los alimentos y el agua pueden transmitir el virus (Referencia electrónica 6).

Los norovirus son un grupo de virus de cadena simple de ARN, sin envoltura, que causan gastroenteritis aguda en humanos. Los Norovirus se transmiten por vía fecal-oral, más comúnmente a través de agua o alimentos contaminados (Referencia electrónica 6). Se han asociado a brotes por consumo de melón (Pouch & Ito, 2001).

3.4. Microorganismos indicadores de contaminación fecal

Los indicadores de contaminación son importantes en salud pública. Los coliformes, que pertenecen al grupo de las enterobacterias, se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, oxidasa negativos y fermentadores de lactosa con producción de ácido y gas. Incluye los géneros *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Escherichia*. Los tres primeros géneros están asociados a vegetales, polvo, ambiente, etc; mientras que *Escherichia* está asociado a contaminación de origen fecal (Vanderzant, 1992), debido a que su hábitat natural es el intestino de los animales de sangre caliente. De esta forma la presencia de coliformes totales y fecales en frutas y vegetales no se asocia con agentes productores de enfermedad, pero sí con la presencia de *E. coli*.

Capítulo 4

Inocuidad de las frutas y buenas prácticas agrícolas

Como ya se mencionó, entre los grupos de alimentos implicados con mayor frecuencia, en años recientes con enfermedades entéricas en el ser humano, están las frutas y vegetales crudos. Resultado de esto se han producido brotes importantes que afectan la salud del ser humano, por lo que se diversos grupos interesados en el bienestar de la población han tratado de establecer parámetros que permitan evitar al máximo las enfermedades por estas causas (Beuchat, 2006).

La reducción al mínimo del riesgo microbiano asociado al consumo de alimentos, frutas y vegetales, involucra el análisis de riesgo microbiano por agua, estiércol animal y desechos orgánicos municipales sólidos, la salud e higiene de los trabajadores, las instalaciones sanitarias, la sanidad en el campo, la limpieza de las instalaciones, de empaque y el transporte de los productos que se venden al consumidor sin procesar o con un procesamiento mínimo (Referencia electrónica 6). Todos estos aspectos forman parte de las buenas prácticas agrícolas, ya que como su definición lo indica, son un conjunto de principios, normas y recomendaciones técnicas aplicables a la producción, procesamiento y transporte de alimentos, orientadas a cuidar la salud humana, proteger el medio ambiente y mejorar las condiciones de los trabajadores y su familia (Izquierdo *et al*, 2007).

El agua puede transmitir una gran variedad de patógenos como, *E. coli*, especies de *Salmonella* sp., *Vibrio cholerae*, especies de *Shigella* sp., así como *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Cyclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii* y los virus Norwalk y de la hepatitis A. Incluso pequeñas cantidades de estos microorganismos en los alimentos pueden causar enfermedades (Referencia electrónica 7).

La materia fecal humana y animal constituye una importante fuente de microorganismos patógenos para el ser humano dentro de los cuales se encuentran *E. coli* O157:H7, *Salmonella* y *Cryptosporidium* (Referencia electrónica 7).

Las enfermedades infecciosas acompañadas de diarrea o lesiones abiertas (furúnculos, llagas, heridas infectadas) constituyen asimismo una fuente de microorganismos patógenos (Referencia electrónica 7).

Las operaciones que carezcan de suficiente control en el manejo de las aguas de desechos, ya sean en los campos o en las instalaciones de empaque, pueden aumentar considerablemente el riesgo de contaminación del producto (Referencia electrónica 6).

La contaminación directa o indirecta de las frutas antes, durante y después de la recolección puede ocurrir como resultado del contacto con la tierra, los fertilizantes del agua, los trabajadores o el equipo de recolección (Referencia electrónica 6).

La falta de limpieza en las operaciones en el lugar de empaque puede aumentar considerablemente el riesgo de contaminación de las frutas y el agua que se use con las mismas, ya que pueden existir microorganismos patógenos en el suelo, desagües y superficies del equipo que se esté utilizando (Referencia electrónica 6).

Por último, las operaciones de carga, descarga, almacenaje y transporte pueden dar lugar a contaminación indirecta por contacto con otros productos, ya sean alimentos o no, y con superficies contaminadas (Referencia electrónica 6).

Materiales y métodos

Se utilizaron dos tipos de muestras: pulpa cruda y pulpa pasteurizada de mango. Las muestras se generaron como plan piloto en una planta procesadora de frutas de la provincia de Guanacaste. Después de la recolección en envases asépticos fueron transportadas en hielo hasta el laboratorio donde se mantuvieron a 3.5°C hasta su análisis. Se analizaron un total de 51 muestras de pulpa de mango procesadas industrialmente, 25 de pulpa cruda y 26 de pulpa pasteurizada. A cada muestra se le midió el pH y se le realizaron los siguientes análisis microbiológicos: recuento total aerobio mesófilo, recuento de mohos y levaduras, recuento de bacterias acidúricas, recuento de esporulados aerobios, recuento o número más probable por gramo (NMP/g) de coliformes totales, fecales y de *E. coli* y presencia de *Salmonella* sp. por técnica de PCR y cultivo tradicional. Se utilizaron los métodos descritos en Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (Pouch & Ito, 2001). Para la detección de *Salmonella*, se siguió la metodología descrita en el BAM (Referencia electrónica 3) y la prueba de reacción en cadena de la polimerasa utilizando el Bax ® System (Referencia electrónica 11). A continuación se describen brevemente los métodos.

Recuento total aerobio mesófilo (RTAM)

Se preparó una dilución madre de 10g en 90ml de agua peptonada estéril 0,1% (APE), se sembró 1 ml de la muestra y se hizo una dilución 10^{-2} de la cual también se sembró 1 ml en placa de agar estándar con 0,5% de cloruro de trifenil tetrazolio (TTC). Se incubó a 35°C por 48h y se realizó el conteo de las colonias.

Recuento de mohos y levaduras (RML)

A partir de la dilución madre de 1/10 se preparó una dilución de 10^{-2} en APE 0,1%. Se sembró por vaciado 1ml de cada dilución en placas de Petrifilm para hongos (3M,

Microbiology). Se incubó a temperatura ambiente por 5 días y se realizó el conteo de las colonias.

Recuento de bacterias acidúricas (RBA)

A partir de la dilución madre de 1/10 se preparó una dilución de 10^{-2} en APE 0,1%. Se sembró 1 ml por vaciado de las dos diluciones en placa de agar jugo de naranja. Se incubó a 35°C por 48h y se realizó el conteo de las colonias.

Recuento de esporulados aerobios (REA)

Se tomaron 10 ml de la dilución madre y se puso en un baño maría a 80°C por 10 minutos. Se dejó enfriar y se sembró 1 ml por vaciado en placa de agar estándar con 0,5% TTC. Se incubó a 35°C por 48h y se realizó el conteo de las colonias.

Conteo de coliformes totales y *E. coli*

A partir de la dilución madre de la pulpa cruda de mango se realizaron diluciones seriadas que se inocularon en petri-film de *E. coli* que también cuantifica coliformes totales. Se incubaron las placas de *E. coli* por 24 h a 44,5°C y los coliformes totales a 35°C.

Para la pulpa pasteurizada de mango se cuantificó por medio del Número Más Probable/gramo (NMP/g), de manera que se realizaron diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} y cada una se inoculó en 3 tubos de caldo lauril simple con campana Durham, se incubó 48h a 35°C, se leyó por turbiedad y los tubos que presentaron gas se inocularon en caldo bilis verde brillante y se incubaron a 35°C para confirmar los coliformes totales y se inocularon en caldo EC a 44,5 ° C para confirmar la *E. coli*. Los tubos que presentaron gas se cuantificaron según la tabla de NMP para los coliformes totales y para *E. coli*. En caso donde la lectura de los 3 tubos fuera 0,0 y 0 se reportaba como < 3 NMP/g.

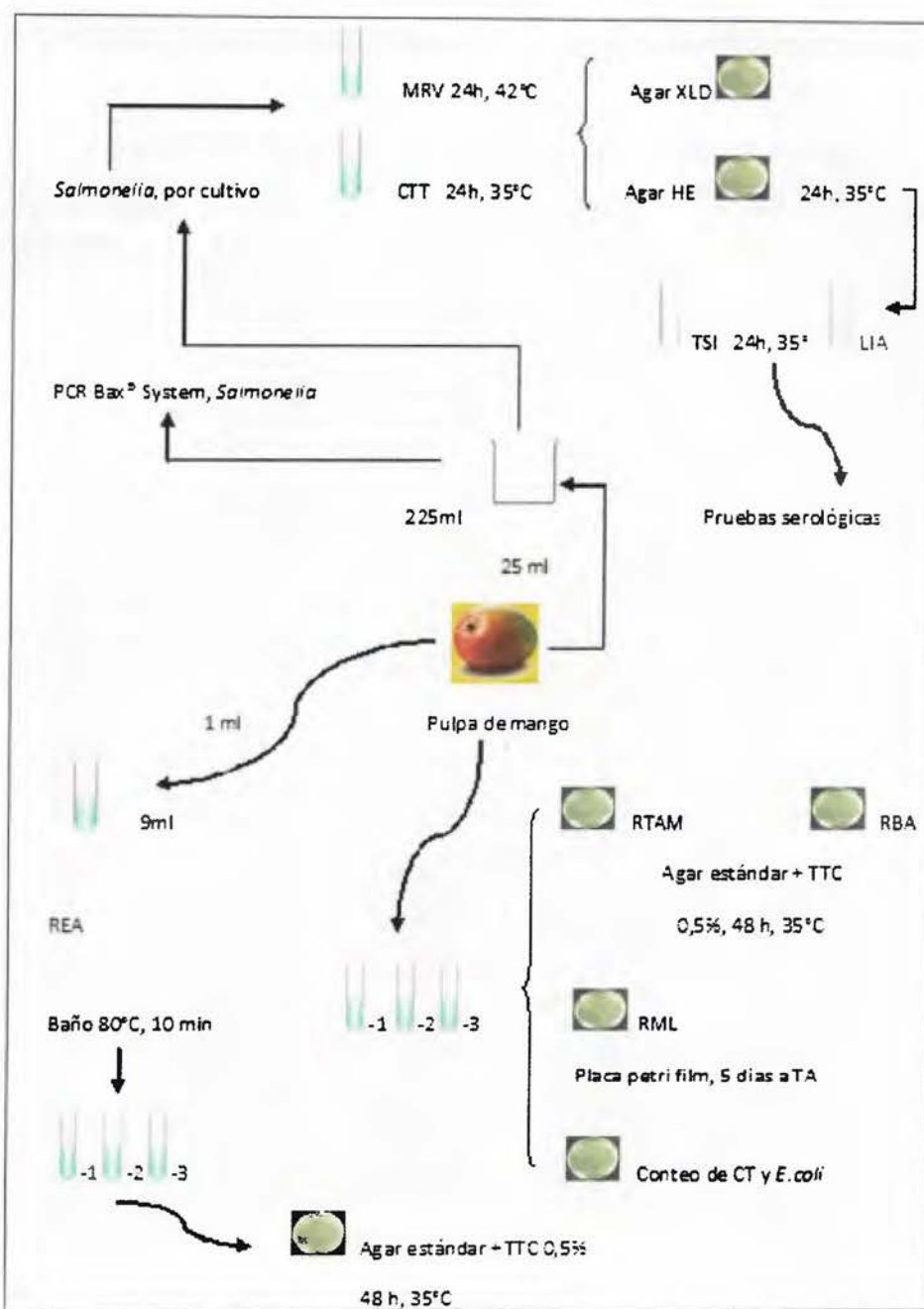
PCR para *Salmonella* sp.

Se preparó una dilución madre de 25 g en 225 ml de agua peptonada buferizada, se ajustó el pH a $6,8 \pm 0,2$ con papel de pH. Se incubó a 35°C por 24h. Posteriormente se tomó 10ul de la dilución madre y se le agregó a 500ul de Caldo Infusión Cerebro Corazón, se incubó a 35°C por 3h. En un recipiente estéril se preparó el reactivo de lisis agregando 150 ul de proteasa más 12 ml de buffer de lisis, se agregó 200ul de reactivo de lisis más 5ul de muestra, se tapó el tubo de lisis y se colocó primero en el bloque que se encuentra a 37°C durante 20 minutos y luego en el bloque a 95°C durante 10 minutos. Se pasó al bloque enfriador, se dejó de 5 a 20 minutos. Se sacaron los tubos de PCR del refrigerador, los cuales se colocaron en otro bloque enfriador, se abrieron las tapas y se le transfirió 50 μ l de cada muestra lisada, y se cerró herméticamente. Finalmente se pusieron los tubos de PCR en el detector/ciclador y se llevó a cabo la amplificación y detección del ADN. En cada determinación se incluyó un control positivo (*Salmonella*) y un control negativo (*E. coli*).

***Salmonella* por cultivo tradicional**

La dilución de 25g en 225 en APB se incubó 24 hora a 35°C, después de este período de preenriquecimiento se inoculó 0.1ml en 10ml de medio Rappaport-Vassiliadis (MRV), se incubó a 42°C por 24 h y 1ml en 10 ml de caldo Tetrionato (CTT), se incubó 24h a 35°C (enriquecimiento selectivo). Se rayaron placas de Agar XLD (AXLD) y de Agar Hektoen entérico (AHE) a partir de la muestra enriquecida en medio Rappaport y se incubaron 24h a 35°C. Colonias sospechosas de *Salmonella* se inocularon en agar TSI y agar LIA para la confirmación bioquímica del aislamiento. A un TSI K/A con H₂S y un agar LIA K/K se les debía realizar la confirmación serológica utilizando sueros polivalentes, además se debía incluir un control con solución salina. De esta manera se confirma la presencia de *Salmonella* en la muestra.

Esquema de trabajo



RTAM: recuento total aerobio mesófilo, RML: recuento mohos y levaduras, RBA: recuento de bacterias acidúricas, REA: recuento esporulados aerobios, CT: coliformes totales

Resultados

Para las 25 muestras de pulpa cruda de mango se obtuvo los siguientes resultados:

Cuadro III. Recuentos y pH para pulpa cruda de mango.

Pulpa cruda de mango	RTAM UFC/g	RML UFC/g	RBA UFC/g	REA UFC/g	pH
1	$6,4 \times 10^3$	$1,3 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$	20	4,16
3	3×10^3	$2,6 \times 10^2$	$2,6 \times 10^2$	10	4,10
5	$4,4 \times 10^2$	60	$3,5 \times 10^2$	0	4,10
7	$3,3 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	0	20	4,14
9	$2,4 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	0	20	3,82
10	90	40	0	0	3,78
11	$4,6 \times 10^3$	$3,7 \times 10^2$	0	30	4,01
12	$7,9 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$	$4,7 \times 10^3$	30	3,90
14	10	50	$1,8 \times 10^2$	0	3,92
15	$3,7 \times 10^3$	80	0	30	4,06
16	$1,2 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$	0	50	4,06
22	$1,8 \times 10^4$	20	$4,5 \times 10^3$	9×10^2	4,27
23	30	0	0	0	4,23
24	3×10^3	$1,1 \times 10^3$	0	$4,5 \times 10^2$	4,43
25	4×10^3	$4,8 \times 10^4$	0	$9,4 \times 10^2$	4,26
26	$3,3 \times 10^4$	$3,8 \times 10^3$	0	$7,6 \times 10^2$	4,42
32	$1,5 \times 10^2$	$9,5 \times 10^3$	$4,3 \times 10^2$	10	4,31
33	$4,8 \times 10^4$	1×10^2	$7,2 \times 10^3$	10	4,45
35	$1,9 \times 10^2$	0	$2,6 \times 10^2$	20	4,55
36	$1,4 \times 10^4$	8×10^3	2×10^3	30	4,45
42	$5,6 \times 10^3$	20	$1,6 \times 10^4$	$6,3 \times 10^2$	4,53
43	$8,8 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$	$1,6 \times 10^4$	$3,9 \times 10^2$	4,60
44	$6,1 \times 10^4$	$1,7 \times 10^2$	$1,4 \times 10^3$	$8,6 \times 10^2$	4,58
45	$7,8 \times 10^3$	$4,4 \times 10^2$	$2,2 \times 10^3$	$5,7 \times 10^2$	4,55
46	$3,1 \times 10^3$	0	$1,6 \times 10^4$	8×10^2	4,56

En el caso de las 26 muestras de pulpa pasteurizada de mango se obtuvo lo siguiente:

Cuadro IV. Recuentos y pH para pulpa pasteurizada de mango.

Pulpa pasteurizada de mango	RTAM UFC/g	RML UFC/g	RBA UFC/g	REA UFC/g	pH
2	1,7 X10 ²	0	70	20	4,22
4	3 0	0	0	0	4,13
6	20	1 X10 ²	0	0	4,09
8	40	0	0	0	4,09
17	50	5 X10 ²	10	0	3,94
18	80	0	0	0	4,02
19	20	0	0	0	4,06
20	10	0	0	0	4,00
21	20	0	0	10	4,01
27	2,6 x10 ³	0	0	40	4,78
28	8,2 x10 ³	0	0	90	4,34
29	7,4 x10 ²	0	1,4 x10 ²	0	4,40
30	2,1 x10 ²	8 x10 ²	40	0	4,31
31	1,3 x10 ³	0	2,8 x10 ²	0	4,28
37	0	0	0	0	4,51
38	0	0	0	0	4,46
39	50	0	0	0	4,49
40	30	20	20	0	4,49
41	20	0	0	0	4,48
47	9,2 x10 ²	0	1,2 x10 ²	20	4,55
48	3,3 x10 ²	0	4,6 x10 ¹	0	4,56
49	0	0	0	0	4,54
50	1,8 x10 ³	0	5,9 x10 ²	0	4,55
51	4,2 x10 ³	0	1,5 x10 ²	0	4,54
52	5,5 x10 ³	1,3 x10 ²	0	20	4,54
53	7,5 x10 ³	1 x10 ²	0	38	4,54

Además todas las muestras de pulpa de mango, crudas y pasteurizadas resultaron negativas para la presencia de *Salmonella*, tanto por el método tradicional como por medio de la técnica de PCR Bax ® System (Referencia electrónica 11). Las 23 muestras a las que se les realizó el conteo coliformes totales y fecales y *E. coli* resultaron negativas.

Discusión

La población microbiana de frutas se encuentra en el orden de 10^5 y 10^7 UFC/g para el recuento total, mohos y levaduras entre 10^2 y 10^6 UFC/g y bacterias ácido lácticas entre 10^3 y 10^5 UFC/g. Los contaminantes más comunes reportados en literatura son los mohos y levaduras, y esto constituye el principal reto para los productores, ya que estos microorganismos se han relacionado con pérdida de características sensoriales como decoloración, pérdida de sabor y en algunos casos como productores de enfermedad en el ser humano (Di Cagno *et al.*, 2010).

En cualquier proceso industrial la carga inicial y el tipo de microorganismos presentes en la materia prima es fundamental ya que determinan en gran medida la calidad final del producto. En el caso de la pulpa cruda de mango las cargas microbianas iniciales para el recuento total aerobio mesófilo se encuentran entre 10^2 y 10^5 UFC/g, el de mohos y levaduras entre 0 y 10^2 UFC/g y el de bacterias acidúricas entre 0 y 10^4 UFC/g. Para la pulpa pasteurizada se obtuvieron recuentos un poco más bajos tal y como se esperaba debido a que la pulpa recibe un proceso térmico superior a 74°C . Para la pulpa pasteurizada el recuento total aerobio mesófilo se encuentra entre 0 y 10^3 UFC/g, para el de mohos y levaduras entre 0 y 10^2 UFC/g y para el de bacterias acidúricas entre 0 y 10^2 UFC/g. Estos resultados concuerdan con los reportados en literatura (Reyes & Osorio, 2008; Salamanca *et al.*, 2008b) excepto para los recuentos totales aerobios, en los cuales se obtuvieron recuentos de 2-3 logaritmos más altos, esto podría explicarse por el tipo de tratamiento al que es sometida la fruta y a las buenas prácticas agrícolas y a condiciones climáticas de nuestro país. El pH del mango y la presencia de ácidos orgánicos son propiedades antibacterianas que restringen el crecimiento de muchas bacterias por lo que la flora que domina la pulpa de mango está compuesta principalmente por microorganismos capaces de crecer bajo estas condiciones, es decir, mohos, levaduras y bacterias acidúricas (Pouch & Ito, 2001; Salamanca *et al.*, 2008a; Charlier *et al.*, 2009). Además es importante la madurez, la acidez, la disponibilidad de agua, las condiciones poscosecha, todos estos

factores afectan la vida anaquel del mango (Referencia electrónica 6; Yahia, 2006). En la pulpa de mango estudiada existe una población heterogénea, en la cual, las levaduras y bacterias acidúricas tienen un papel decisivo en la estabilidad del producto, ya que se vio que éstas fueron responsables de la fermentación del producto aún bajo condiciones de refrigeración. Las bacterias acidúricas juegan un papel dual en la calidad de la pulpa de mango ya que por un lado pueden promover la conservación del producto al disminuir el pH, principalmente por producción de ácido láctico, ya que limita la proliferación de microorganismos indeseables como agentes de deterioro y patógenos. Por otro lado puede promover el deterioro del producto cuando éstas se encuentran en grandes cantidades y provocan su fermentación (Charlier *et al.*, 2009; Salamanca *et al.*, 2008a). En cuanto al conteo de coliformes los resultados negativos concuerdan con los reportados por varios investigadores (Reyes & Osorio 2008, Salamanca *et al.*, 2008b), estos resultados pueden explicarse considerando que el pH requerido para el crecimiento de los coliformes debe estar entre 7-7.2 (Cárdenas & Solano, 2003) mientras que el rango de pH para la pulpa estudiada estuvo entre 3.78-4.78.

Una manera de minimizar los riesgos microbiológicos en frutas es la aplicación de buenas prácticas agrícolas, por lo que en la producción de pulpa de mango este es un punto importante a considerar ya que podría tener un impacto considerable en la carga inicial de microorganismos y por lo tanto en el producto final.

En cuanto al PCR para *Salmonella* todas las muestras resultaron negativas, esto pudo verse influenciado por el pH de la fruta, ya que se ha reportado que la recuperación de este patógeno es significativamente mayor en pH mayor a 5.53 que en pH menores (Burnett & Beuchat, 2001). Además la mayoría de brotes por *Salmonella* se han asociado a melón, sandía y jugo de naranja sin pasteurizar (Pouch & Ito, 2001). Se han hecho estudios en donde se ha visto que *Salmonella* crece en mango almacenado a 23°C y sobrevive a 4°C, sin embargo, a 23°C crece más rápido que *E. coli* O157:H7, esto provoca un agotamiento de nutrientes y acumulación subproductos. A 12°C *Salmonella* crece mientras *E. coli* O157:H7 solo puede sobrevivir en el mango (Strawn & Danyluk, 2010). La técnica de PCR Bax System constituye un manera fácil y rápida de detección de este patógeno en pulpa de

mango sin dejar de lado la gran especificidad y sensibilidad que posee, ya que la técnica amplifica tres regiones específicas del ADN bacteriano y la técnica de amplificación se lleva a cabo en un sistema cerrado por lo que se evita contaminación con otros ácidos nucleicos, todo esto disminuye la probabilidad de falsos positivos, además incluye un control interno de amplificación lo que disminuye los falsos negativos. En cuanto a sensibilidad el método reporta que es capaz de detectar < de 1 UFC/g (Referencia electrónica 11). Entonces con un resultado negativo se puede tener plena seguridad de que no hay presencia de este patógeno y ante un resultado positivo se procede a la confirmación mediante el método tradicional. Por todo lo anterior, este método de screening del Bax ® System es una importante herramienta para grandes compañías exportadoras, ya que éstas necesitan sacar el producto al mercado lo más rápido posible.

En el caso de otras frutas tropicales como en fresas, se ha reportado que su deterioro se debía principalmente a la presencia de mohos y levaduras, esto explica la corta vida anaquel del producto. El recuento de coliformes fue negativo en el 100% de las muestras analizadas y se encontró un 4% de las mismas positivas para *Salmonella*. (Cárdenas & Solano, 2003). En otros estudios se ha demostrado que la papaya, melón y sandía son un buen medio para el crecimiento de *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli* O157:H7. Además *S. enteritidis* logra crecer tanto a temperatura ambiente como a 10°C en estas tres frutas (Valerio & Ramos, 2005). Para el jugo de piña crudo los recuentos se encuentran en el orden de 10^5 - 10^7 UFC/ml pero pueden disminuir hasta < de 10 UFC/ml después de la pasteurización (Peralta & López, 2009). En jugo de naranja se encontró que a pesar del pH de 3,76 las muestras fueron positivas en el 66,7 % para coliformes totales y en el 53% para coliformes fecales.

Conclusiones

- Condiciones desfavorables para los patógenos, como variaciones de temperatura, humedad, presión de oxígeno, disponibilidad de agua, éstos logran sobrevivir, por lo que existe un riesgo potencial de producir enfermedad.
- No existen coliformes totales en las 23 muestras de pulpa de mango analizadas ni tampoco presencia de *Salmonella* en las 51 muestras de pulpa de mango, esto puede asociarse al pH relativamente ácido que presentan las muestras y probablemente a una adecuada manipulación durante la producción de la pulpa.
- La detección de *Salmonella* por la técnica de PCR Bax ® System constituye un método fácil, rápido, sensible y específico para el análisis de pulpa de mango.
- La fase de preenriquecimiento y enriquecimiento de la muestra es muy importante porque es una forma de disminuir las probabilidades de falsos negativos por presencia de inhibidores.
- La estabilidad de la pulpa de mango está determinada por la cantidad de bacterias acidúricas y de mohos y levaduras presentes.
- La pasteurización aplicada a la pulpa de mango disminuye los recuentos pero ésta podría mejorarse, ya sea aumentando la temperatura o el tiempo de pasteurización, para alargar la vida anaquel de la pulpa de mango.
- Se sugiere que el producto sea mantenido en congelación para disminuir el deterioro y aumentar así la vida útil del producto.
- Se sugiere disminuir el pH de la pulpa como una forma de control microbiológico para evitar el crecimiento de *Salmonella*.
- Se recomienda a la compañía debe establecer buenas prácticas agrícolas con el fin de estandarizar la cosecha y el proceso de producción de la pulpa de mango y así disminuir la carga inicial de microorganismos.

- Se recomienda el estudio de la sobrevivencia de *Salmonella* en muestras de pulpa de mango inoculadas, esto para establecer los parámetros dentro de los cuales es factible su crecimiento.
- Se propone realizar un recuento de bacterias psicrotrofas si el producto se desea almacenar en refrigeración.

Anexos

1. Cuadro V. Características de algunos patógenos que han sido asociados a brotes por alimentos

Microorganismo	Periodo de incubación	Síntomas	Dosis infectante (número de células)
BACTERIA			
<i>Clostridium botulinum</i>	De 12 a 36 h	Nauseas, vómito, fatiga, fatigues, mareos, sequedad en boca, parálisis muscular, etc.	Debe haber crecimiento y producción de la toxina botulínica
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	De 2-5 días	Diarrea con sangre, puede llevar a Síndrome urémico hemolítico e Insuficiencia renal	De 10-1000
<i>Salmonella</i> spp.	De 18 a 72 h	Dolor abdominal, diarrea, fiebre, náuseas y vómito	De 10-10000
<i>Listeria monocytogenes</i>	De 1 día a 5 semanas	Aborto, septicemia y meningitis en neonatos e inmunocomprometidos	Dependiente de cada persona
PARÁSITO			
<i>Cryptosporidium</i> spp.	De 1 a 12 días	Diarrea acuosa, dolor abdominal, vómito	~ 30
<i>Cyclospora</i> spp.	De 1 a 11 días	Diarrea acuosa, náuseas, calambres abdominales	Desconocido, probablemente baja
VIRUS			
Hepatitis A	De 25 a 30 días	Náuseas, dolor abdominal, ictericia, orina color oscuro	De 10 a 50
Norwalk/Norwalk-like virus	De 12 a 48 h	Vómito, diarrea, náuseas, calambres abdominales	Desconocido, probablemente baja

Tomado de Referencia electrónica 7.

2. Cuadro VI. Patógenos causantes de brotes asociados a frutas frescas y congeladas.

<i>Salmonella</i> spp.	Melón, sandía, jugo de naranja sin pasteurizar
<i>E. coli</i> O157:H7	Jugo/cidra de manzana
Virus hepatitis A	Frambuesas, fresas congeladas
Norwalk/Norwalk-like virus	Melón
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Frambuesas
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Cidra de manzana sin pasteurizar

Tomado de Pouch & Ito, 2001

Referencias

- Barahona, M. (1992). Manzana, melocotón, fresa y mora. Fruticultura especial. Editorial Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica, pp. 85-116.
- Beuchat, L. (2006). Vectors and conditions for preharvest contamination of fruits and vegetables with pathogens capable of causing enteric diseases. *British Food Journal*. 1, 38-53.
- Burnett, A. & Beuchat L. (2001). Comparison of sample preparation methods for recovering *Salmonella* from raw fruits, vegetables, and herbs. *Journal of Food Protection*. 10, 1459-1465.
- Calvo, M., Carazo, M., Arias, M., Chaves, C., Monge, R. & Chinchilla, M. (2004). Prevalencia de *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp., microsporidios y determinación de coliformes fecales en frutas y vegetales frescos de consumo crudo en Costa Rica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 4, 428-432.
- Cárdenas, A. & Solano, G. (2003). Tesis: Análisis microbiológico de fresas adquiridas en el área metropolitana. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. San José, Costa Rica.
- Castro, N., Chaidez, C., Rubio, W. & Valdez J. (2004). Sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en frutos mínimamente procesados. *Revista Cubana Salud Pública*. 30: 11-19
- Charlier, C., Cretenet, M., even, S. & Le Loir Y. (2009). Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology* 131, 30-39.

De Curtis, M., Franceschi, O. & De Castro N. (2000). Determinación de la calidad microbiológica de alimentos servidos en comedores de empresas privadas. Archivos latinoamericanos de nutrición (ALAN). 50: 26-31

De Vasconcelos, F., Heliofabia, V., De souza, N., Manoel, A., Maia, G., Narain, N. & Dos Santos G. (2010). Changes in flavor quality of pineapple juice during processing. Journal of Food Processing & Preservation. 3, 508-519.

Di Cagno, R., Cardinali, G., Minervini, G., Antonielli, L., Rizzello, C., Ricciuti, P. & Gobbetti, M. (2010). Taxonomic structure of yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple and use of autochthonous starters for minimally processing. Food microbiology 27, 381-389.

Domínguez, C. (2004). Tesis: Formulación y pasteurización de una bebida con mezclas de jugos no clarificados de piña-guayaba-mango. Universidad de las Américas Puebla. México.

Durán, A. (1985) Tesis: Diagnóstico y aspectos preliminares de la epidemiología de las enfermedades fungosas del fruto de la papaya (*Carica papaya*) en Costa Rica. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. San José, Costa Rica

Ferrari, C. & Torres, E. (1998). Contaminación de los alimentos por virus: un problema de salud pública poco comprendido Revista Panamericana de Salud Pública. 6, 359-366.

García, Y., Osío, I., Isea, F., & Escalante M. (2004). Calidad microbiológica de pulpa de lechosa (*Carica papaya* L.) de las variedades Cartagena, Colombiana y Maradol. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 21, 336-342

González, C. (1997). Tesis: Determinación de los problemas de calidad de la papaya (*Carica papaya*) comercializada por una empresa proveedora de supermercados. Propuesta de solución a los problemas prioritarios.

González, E., (2001). Tesis: Formulación de una confitura a base de banano y otras frutas tropicales, como medio de aprovechamiento de los excedentes y rechazos de frutas frescas de exportación. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. San José, Costa Rica.

Herwaldt, B. & Ackers, M., (1997). An Outbreak in 1996 of Cyclosporiasis Associated with Imported Raspberries. *The New England Journal of Medicine*. 22, 1548-1556.

Izquierdo, J., Rodríguez M., Durán, M., (2007). Manual “Buenas Prácticas Agrícolas para la Agricultura Familiar”. FAO.

Matamoros, G. (1986). La fresa, prácticas de cultivo. Oficina de Publicaciones de la U.C.R., San José, Costa Rica.

Millán, F., López, S., Roa, V. & Soledad M. (2001). Estudio de la estabilidad microbiológica del melón (*Cucumis melo L*) mínimamente procesado por impregnación al vacío. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 51: 21-28

Morales, I., (1999). Tesis: Efecto del empaque en películas flexibles en combinación con tratamientos con agua caliente en la calidad del melón (*Cocumis melo* var. Cantaloupe) y el mango (*Mangifera indica* var. Tommy Atkins) durante el almacenamiento. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. San José, Costa Rica.

Mutaku, I., Woldaregay, E. & Mogessie, A. (2005). Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh tropical fruit juices at ambient and cold temperatures. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2, 133-139

Penteado, A. & Leitao, M. (2004). Growth of *Salmonella enteritidis* in melon, watermelon and papaya pulp stored at different times and temperatures. En: Food Control 15, 369-373

Penteado A. & Leitao M. (2004). Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon and papaya pulp stored at different times and temperatures. International Journal of Food Microbiology 92, 89-94.

Peralta, V. & López, J., (2009) Tesis: Determinación de carga microbiana de piñas y jugos de piña. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. San José, Costa Rica.

Pouch, F. & Ito, K. (2001). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Cuarta Edición. American Public Health Association. Washington DC, Estados Unidos de América.

Reis, R., Ramos, A., Regazzi, A., Minim, V. & Stringueta, P. (2006) Almacenamiento de mango secado: análisis fisicoquímico, microbiológico, color y sensorial. Cienc. Tecnol. Aliment. 5, 214-225

Reyes, G. & Osorio L. (2008). Cremogenados de mango como alternativa alimentaria para productos funcionales de alto valor nutricional. II Congreso Iberoamericano sobre seguridad alimentaria. Barcelona.

Robles, M., Gorinstein, S., Martín, O., Astiazarán, H., González, G. & Cruz R. (2007) Frutos tropicales mínimamente procesados: potencial antioxidante y su impacto en la salud. Interciencia. 32, 227-232

Salamanca G. & Abril J. (2008). Cinética de la degradación térmica del color en cremogenado de mango (*Mangifera indica*. L. Var. Hilacha). En II Congreso Iberoamericano sobre Salud Alimentaria. Barcelona.

Salamanca, G., Osorio, M., Abril, J. & Casp, A. (2008a). Agentes microbiológicos asociados a cremogenados de frutas tropicales. En: II Congreso Iberoamericano sobre Seguridad Alimentaria. Barcelona.

Salamanca, G., Reyes L., Osorio, M. & Casp, A. (2008b). Cremolácteos de mango como alternativa alimentaria para productos funcionales de alto valor nutricional. II Congreso Iberoamericano sobre Seguridad Alimentaria. Barcelona

Sharma, M., Adler, B., Harrison M. & Beuchat, L. (2005). Thermal tolerance of acid-adapted and unadapted *Salmonella*, *Escherichia coli*, and *Listeria monocytogenes* in cantaloupe juice and watermelon juice. Letters in Applied Microbiology. 6, 448-453

Sharma, M., Beuchat, L., Doyle M. & Chen J. (2001). Fate of *Salmonella* in Calcium-supplemented Orange Juice at refrigeration Temperature. Journal of Food Protection. 12, 2053-2057

Strawn, L., & Danyluk, M. (2010). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. On fresh and frozen cut mangoes and papayas. International Journal of Food Microbiology 138, 78-84

Strawn, L. & Danyluk, M. (2010). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on Fresh and Frozen Cut Pineapples. Journal of Food Protection. 3, 418-424

Taniwaki M., Silva N., Banhe, A. & Iamanaka, B. (2001). Comparison of culture media, simplate, and petrifilm for enumeration of yeasts and molds in food. *Journal of Food Protection*. 10,1592-1596

Valerio, V., Ramos, J. (2005) Tesis: Crecimiento y supervivencia de algunas bacterias patógenas en frutas de baja acidez que se expenden en Costa Rica. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. San José, Costa Rica

Vanderzant, C. & Splittstoesser, D. (1992). Compendium of methods microbiological examination of foods. Washington: APHA

Villegas, C. (2007) Tesis: Evaluación microbiológica de Jugos de Naranja que se expenden en el Área Metropolitana de San José, Costa Rica.

Vojdani, J., Beuchat, L. & Tauxe, R. (2008). Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. Journal of Food Protection. 2, 356-364.

Yahia, E.M. (2006). Modified and controlled atmospheres for tropical fruits. Stewart Postharvest Review 2006. 5, 6-10

Yahia, E. & Rivera, M., (1991). Modified atmosphere packing of Muskmelon. Wiss. u. Techno. 25, 38-43.

Referencias electrónicas

1. Análisis de Estadísticas de Exportación Costa Rica (2007). Disponible en http://www.procomer.com/Espanol/docs/PDF/estadisticas/Libro_2007.pdf

2. Atlas agropecuario de CR: El cultivo del mango en CR. 2004. Disponible en <http://books.google.co.cr/books?id=AWQqijADFrIC&printsec=frontcover&dq=Atlas+agropecuario+de+CR:+El+cultivo+del+mango+en+CR#PPA5,M1>

3. Bacteriological Analytical Manual Online. (2007). Disponible en <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>

4. Bacterial Analytical Manual. (2001). Rapid Methods for Detecting Foodborne Pathogens. Disponible en:

<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109652.htm>

5. Curso sobre manejo, producción comercialización de la naranja (*Citrus sinensis*). (2005) Disponible en http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/curso-naranja.pdf

6. Food and Drug Administration. (2008). Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Fresh-cut Fruits and Vegetables. Disponible en <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ProduceandPlantProducts/ucm064458.htm>

7. Food and Drug Administration (2009). Chapter IV. Outbreaks Associated with Fresh and Fresh-Cut Produce. Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. Disponible en <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm091265.htm>

8. Mora, J., & Gamboa, J. (2002). Guía para el cultivo del mango. San José, Costa Rica: MAG. Disponible en http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/tec-mango.pdf

9. Piña. 2009. Disponible en <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/tec-pina.pdf>

10. Slaughter D. (2009). Métodos para el manejo de la maduración en mango: Una revisión bibliográfica. Biological and Agricultural Engineering University of California. Disponible en http://www.mango.org/media/55759/manejo_de_la_maduraci%C3%B3n_del_mango.pdf

11. The Qualicon Bax® System Method for the Detection of Salmonella in a variety of food and environmental samples. 2007. Disponible en <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/research/analy-meth/microbio/volume3/index-eng.php>