

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**VALIDACIÓN DE LA ETAPA DE DESINFECCIÓN EN EL PROCESO DE EMPAQUE
DE MELÓN FRESCO (*CUCUMIS MELO*) EN LA PLANTA PROCESADORA DE
FINCA LA CUEVA, LIBERIA, GUANACASTE.**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en
Ciencias de Alimentos para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencia de
Alimentos.

MARIANELA MAYORGA VARGAS

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2016

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a mis padres Roberto y Lupita, por su apoyo incondicional a lo largo de todos mis años de formación; ustedes han sido mi baluarte y mi roca.

Dedicarlo también a mi esposo Fernando Gómez, gracias amor por emprender este camino junto a mí, por no dejarme desfallecer cuando el ánimo y las fuerzas flaquearon, por apoyarme cada día. Gracias por creer en mí, en mis sueños y metas, gracias por hacerlos tuyos y luchar junto a mí para lograrlo. ¡Lo logramos!

Además, lo dedico especialmente a mis sobrinos José Mauro, Ariel y Constanza, mis ángeles en el cielo y en la tierra.

Agradecimiento

Agradecerle primero a Dios, por darme la vida y la oportunidad de alcanzar esta meta. A mis padres Roberto y Lupita, a mis hermanas Alejandra, Nayudel y Lariza, a mis cuñados y especialmente a mis esposo, gracias por el apoyo y la confianza, son los mejores.

Agradezco muy especialmente a mi director PhD. Eric Wong González, por todo el tiempo y la paciencia que me tuvo, sin su ayuda profe no hubiese podido, gracias sinceras por creer en mí. Gracias también a mis asesores M.Sc. Mónica Lois y M.Sc. Carlos Rodríguez, este trabajo también es de ustedes.

Gracias a la Gerencia de Investigación y Calidad de Productos Especiales Del Monte por el apoyo al proyecto y a quienes fueron mis compañeros de trabajo: Carmen González, José López, Fabrizio Arguedas, Alejandra Ruiz, Marisela Salas y Marlem Rojas.

A los colaboradores de la Escuela de Tecnología de Alimentos, del CITA y de la Maestría en Ciencias de Alimentos, que me ayudaron de una u otra forma.

Gracias finalmente a mis amigas Bertalicia Arguedas y Adriana Villafuerte, pues ambas velaron para que no me rindiera y concluyera este trabajo, son parte fundamental de este logro.

A todos, muchas gracias!

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencia de Alimentos.”



M.Sc. Marta Bustamante

Representante del Decano Sistema de Estudios de Posgrado



Ph.D. Eric Wong González

Director de Tesis



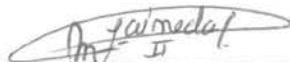
M.Sc. Mónica Lois Martínez

Asesora



M.Sc. Carlos Luis Rodríguez Valverde

Asesor



M.Sc. María Lourdes Pineda Castro

Directora del Programa de Posgrado en Ciencia de Alimentos



Ing. Marianela Mayorga Vargas

Candidata

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|--|----------|
| DEDICATORIA..... | ii |
| AGRADECIMIENTO | iii |
| HOJA DE APROBACIÓN..... | iv |
| TABLA DE CONTENIDOS..... | v |
| RESUMEN | ix |
| INDICE DE CUADROS | x |
| INDICE DE FIGURAS..... | xi |
| INDICE DE ABREVIATURAS..... | xii |
| 1. JUSTIFICACIÓN | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 8 |
| 2.1. Objetivo general..... | 8 |
| 2.2. Objetivos específicos | 8 |
| 3. MARCO TEORICO..... | 9 |
| 3.1. Cultivo y producción de melón | 10 |
| 3.1.1. <i>Situación de mercado</i> | 12 |
| 3.1.2. <i>Anatomía del melón Cantaloupe</i> | 13 |
| 3.1.2.1. Infiltración e internalización | 15 |
| 3.1.2.2. Formación de biopelículas..... | 16 |
| 3.2. Inocuidad de Alimentos | 18 |
| 3.2.1. <i>Enfermedades transmitidas por alimentos</i> | 21 |
| 3.2.1.1. Escherichia coli | 23 |
| 3.2.1.2. Salmonella spp..... | 25 |
| 3.2.2. <i>Brotos de enfermedades asociados con el consumo de melón</i> | 27 |
| 3.2.2.1. Casos de <i>Salmonmella spp</i> | 27 |
| 3.2.2.2. Casos de <i>Escherichia coli</i> | 29 |
| 3.2.2.3. Casos de <i>Listeria monocytogenes</i> | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3. Programas de inocuidad | 29 |
| 3.3.1. Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control | 30 |
| 3.3.2. HACCP para melón | 32 |
| 3.3.2.1. Establecimiento del análisis de peligros | 33 |
| 3.3.2.2. Identificación de Puntos Críticos de Control | 33 |
| 3.3.2.3. Establecimiento de los Límites Críticos de Control | 35 |
| 3.3.2.4. Establecimiento de la frecuencia de monitoreo..... | 35 |
| 3.3.2.5. Establecimiento de acciones correctivas, registro y sistema de verificación.. | 36 |
| 3.3.3. Validación de Medidas Preventivas | 36 |
| 3.3.3.1. Métodos de Análisis..... | 38 |
| 3.4. Lavado y desinfección de frutas y vegetales..... | 39 |
| 3.4.1. Situaciones que hacen inefectiva la desinfección | 42 |
| 3.4.2. Desinfectante | 43 |
| 3.4.3. Cloro..... | 44 |
| 3.4.4. Alternativas al cloro..... | 52 |
| 3.4.4.1. Dióxido de cloro..... | 53 |
| 3.4.4.2. Clorito de sodio acidificado | 54 |
| 3.4.4.3. Peróxido de hidrógeno | 55 |
| 3.4.4.4. Ácido peracético | 57 |
| 3.4.4.5. Ácido peroxiacético | 57 |
| 3.4.4.6. Compuestos de amonio cuaternario | 58 |
| 3.4.4.7. Compuestos yodados | 59 |
| 3.4.4.8. Ozono..... | 60 |
| 3.4.4.9. Ácidos orgánicos..... | 61 |
| 3.4.4.10. Métodos físicos de desinfección | 62 |
| 4. MATERIALES Y METODOS | 64 |
| 4.1. Localización de proyecto..... | 64 |
| 4.2. Empresa donde se realizó el proyecto | 64 |
| 4.3. Materiales..... | 64 |
| 4.3.1. Pruebas de registro | 64 |
| 4.3.2. Pruebas de laboratorio..... | 65 |

| | |
|---|-----------|
| 4.4. Metodología..... | 66 |
| 4.4.1. Determinación del límite crítico de temperatura en la etapa de lavado | 66 |
| 4.4.2. Determinación cualitativa de los posibles puntos de infiltración de microorganismos en melón | 68 |
| 4.4.3. Determinación del efecto de la temperatura de la pulpa sobre la infiltración inmediata de <i>Salmonella</i> en melón | 68 |
| 4.4.4. Determinación del efecto de la temperatura de la pulpa sobre la infiltración de <i>Salmonella sp</i> en melón de 48 horas de almacenamiento | 70 |
| 4.4.5. Comparación de la reducción microbiológica de <i>Escherichia coli</i> con 5 productos desinfectantes | 70 |
| 4.4.6. Determinación del límite crítico de concentración de cloro en la etapa de desinfección..... | 72 |
| 4.4.7. Determinación de la frecuencia de monitoreo del cloro libre y de dosificación de cloro... .. | 74 |
| 4.4.8. Determinación de la correlación entre milivoltios medidos con ORP y cloro libre medido con Colorímetro | 75 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 77 |
| 5.1. Determinación del límite crítico de temperatura en la etapa de lavado | 77 |
| 5.2. Determinación cualitativa de los posibles puntos de infiltración de microorganismos en melón..... | 80 |
| 5.3. Determinación del efecto de la temperatura de la pulpa sobre la infiltración de <i>Salmonella sp</i>. Tanto inmediata como después de 48 horas de almacenamiento del melón..... | 84 |
| 5.4. Comparación de la reducción microbiológica de <i>Escherichia coli</i> con 5 productos desinfectantes..... | 87 |
| 5.5. Determinación del límite crítico de concentración de cloro en la etapa de desinfección..... | 91 |
| 5.6. Determinación de la frecuencia de monitoreo del cloro libre y de dosificación de cloro..... | 95 |
| 5.7. Determinación de la correlación entre milivoltios medidos con ORP y cloro libre medido con Colorímetro..... | 97 |

| | |
|--|-----|
| 5.8. Consideraciones finales..... | 100 |
| 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 102 |
| 7. BIBLIOGRAFIA CITADA | 105 |

RESUMEN

La etapa de lavado y desinfección se considera crítica en los procesos de producción de productos frescos, dentro de los programas de gestión de la inocuidad en las empresas productoras y exportadoras. En el caso de melón fresco, validar el tratamiento de desinfección aplicado es fundamental para el mantenimiento de su programa HACCP.

Por este motivo se plantea una investigación que pretende validar dicha etapa desde los diferentes factores que pueden afectarla, a saber: temperatura de pulpa, tipo y dosis del desinfectante, frecuencia de monitoreo y equipos de medición. Los objetivos se plantean en torno al riesgo de infiltración y capacidad de reducción de la carga microbiana inoculada en el producto; de igual manera se evalúan algunas opciones alternativas al cloro (desinfectante tradicionalmente utilizado en el proceso).

Una vez realizados los experimentos es posible establecer varias conclusiones en torno a la temperatura crítica tanto de la pulpa de melón como del agua de lavado, el mes crítico para esa variable y las implicaciones que podría tener. De igual manera, se confirma el riesgo de infiltración e internalización de macroorganismos patógenos hacia la pulpa del melón.

En cuanto a la concentración del desinfectante se logra demostrar que es necesario aplicar al menos 200 ppm de cloro libre para lograr una reducción de al menos 2 Log₁₀ UFC/cm², tanto para *Escherichia coli* como para *Salmonella sp.* De igual manera, las alternativas evaluadas pueden considerarse una opción viable, pero estadísticamente no resultaron diferentes al cloro.

Además, se evaluó la frecuencia de monitoreo de la concentración de cloro libre y la posibilidad de establecer una correlación entre dos equipos utilizados para medir el cloro libre en la solución de lavado y desinfección. La frecuencia de monitoreo debe mantenerse cada hora y no es posible establecer una correlación confiable entre cloro libre medido con un colorímetro y los milivoltios medidos con un medidor de potencial de óxido reducción.

INDICE DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Descripción de los desinfectantes utilizados | 65 |
| Cuadro 2. Tratamientos a evaluar como desinfectantes alternativos | 72 |
| Cuadro 3. Temperaturas máximas, promedio y mínima de pulpa y agua de lavado, registradas in situ entre 2006 – 2014. Finca La Cueva, Liberia, Guanacaste..... | 77 |
| Cuadro 4. Promedio mensual de temperatura de pulpa, para melón tipo Cantaloupe en Finca La Cueva, Liberia, Guanacaste; entre 2006-2014..... | 79 |
| Cuadro 5. Recuento logarítmico (UFC/cm ²) de <i>Salmonella</i> Typhimurium infiltrada inmediatamente y 48 horas después de almacenamiento. | 85 |
| Cuadro 6. Reducción logarítmica (UFC/cm ²) de <i>Escherichia coli</i> obtenida para diferentes desinfectantes evaluados en melones tipo Cantaloupe..... | 88 |
| Cuadro 7. Reducción logarítmica (UFC/cm ²) de <i>Escherichia coli</i> obtenida para diferentes concentraciones de Cloro libre evaluadas en melones tipo Cantaloupe. | 92 |
| Cuadro 8. Reducción logarítmica (UFC/cm ²) de <i>Salmonella</i> Typhimurium obtenida para diferentes concentraciones de Cloro libre evaluadas en melones tipo Cantaloupe..... | 93 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de empaque de melón | 34 |
| Figura 2. Histograma de frecuencia, para distribución de la temperatura de pula del melón, tipo Cantaloupe, cosechado en Finca La Cueva, Liberia, Guanacaste entre 2006-2014..... | 78 |
| Figura 3. Promedio mensual de temperatura de pulpa, melones tipo Cantaloupe cosechados en Finca La Cueva, Liberia, Guanacaste; entre 2006 - 2014 | 78 |
| Figura 4. Temperatura máxima mensual para la zona de Liberia, reportada por el Instituto Meterológico Nacional. Estación meteorológica del Aeropuerto Internacional Daniel Oduber Quirós: 10°35 N; 85°32 O y altitud 80msnm. Liberia, Guanacaste | 80 |
| Figura 5. Melón después de la inmersión en agua con azul de metileno | 82 |
| Figura 6. Penetración de azul de metileno a través del pedúnculo en melón con cracking..... | 82 |
| Figura 7. Descripción de tres diferentes grados de cracking. | 83 |
| Figura 8. Regresión y ajuste para la variación en el tiempo de la concentración de cloro libre (ppm) en el agua de lavado de melones tipo Cantaloupe en Finca La Cueva, Liberia, Guanacaste | 96 |
| Figura 9. Correlación entre los parámetros: cloro libre y potencial de óxido-reducción, medido en el agua de lavado de los melones tipo Cantaloupe, en Finca La Cueva, Liberia, Guanacaste | 97 |
| Figura 10. Correlación entre los parámetros: cloro libre y potencial de óxido-reducción; segmentación de los valores inferiores a 40 ppm, medidos en el agua de lavado de los melones tipo Cantaloupe, en Finca La Cueva, Liberia, Guanacaste | 98 |
| Figura 11. Correlación entre los parámetros: cloro libre y potencial de óxido-reducción; segmentación de los valores superiores a 40 ppm, medidos en el agua de lavado de los melones tipo Cantaloupe, en Finca La Cueva, Liberia, Guanacaste | 99 |

LISTA DE ABREVIATURAS

BPA: Buenas Prácticas Agrícolas

BPM: Buenas Prácticas de Manufactura

CDC: Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades

CITA: Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos

FCL: Cloro Libre

HACCP: Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control

NMP: Número más probable

ORP: Potencial de Óxido Reducción

PCC: Punto Crítico de Control

PPM: Partes por millón

UFC: Unidades formadoras de colonias

1. JUSTIFICACIÓN

El consumo de frutas y hortalizas ha aumentado en las últimas décadas, en la mayor parte de los países desarrollados. Este incremento se debe al crecimiento en la preocupación de la población por mantener estilos de vida saludables. Por ejemplo, se sabe que una dieta rica en frutas y hortalizas protege contra numerosos tipos de cáncer y disminuye la incidencia de las cardiopatías coronarias (CODEX ALIMENTARIUS, 2003a).

El reconocimiento de la importancia del consumo habitual de frutas y hortalizas frescas, unido a un notable aumento de la disponibilidad de estos productos durante todo el año en el mercado mundial, ha contribuido a un incremento importante del consumo de estos productos. Por tanto, los países en desarrollo se han visto obligados a aumentar y mejorar su tecnología y sistemas de producción para satisfacer la demanda de los consumidores, de la Unión Europea y Estados Unidos, que son los principales importadores de la producción de países como Costa Rica (Araya Rodríguez *et al.* 2008).

Costa Rica es uno de esos países que ha tenido que mejorar su capacidad productiva para satisfacer las necesidades de calidad e inocuidad que demanda el mercado mundial. En el campo agrícola el país es proveedor de diferentes frutas, hortalizas y tubérculos, a saber: banano, piña, yuca, chayote, ñame, plátano, malanga, sandía y melón (SEPSA, 2014).

El melón es una planta herbácea que produce frutos de tamaño y características variables, dependiendo de su clase y cultivar. Pertenece a la familia Cucurbitácea y su nombre científico es *Cucumis melo* (Infoagro Systems S.L, s.f.). Es fuente de vitamina C, β -carotenos, potasio, ácido fólico, hierro, algo de fibra dietética y calcio (Suslow, 2004a).

En Costa Rica la producción de melón es principalmente para exportación y se concentra en las regiones Pacífico Norte y Pacífico Central. Es un cultivo que se desarrolla por temporada; esta inicia generalmente a finales de octubre y se extiende hasta mediados de mayo. Según datos de la Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria (2014), para el año

2013, la producción de melón representó un 1,1% del total de exportaciones nacionales, que se traduce en 125.682 toneladas métricas. Por otra parte, el Ministerio de Comercio Exterior (2015), que coloca al país entre los principales proveedores para la Unión Europea, según la información más reciente el producto nacional representa un 25,5% de los melones y sandías consumidos en esa región y que provienen del continente americano.

El aumento en el número de casos confirmados de enfermedades transmitidas por alimentos, asociadas con el consumo de frutas y hortalizas frescas, ha suscitado preocupación entre los organismos de salud pública y los consumidores, acerca de la inocuidad de estos productos (CODEX ALIMENTARIUS, 2003a; Leaman & Wetherington, 2013). En una recopilación de datos de incidencia de enfermedades en EE.UU. para el período 1990-2005, los productos frescos se habían convertido en uno de los vehículos más dominantes en la transmisión de brotes de origen alimenticio (alrededor de un 13%) (Doyle & Erickson, 2008). Diferentes frutas y hortalizas han sido relacionadas con el desarrollo de enfermedades transmitidas por alimentos, entre ellas manzana, brotes de alfalfa, sandía, tomate y melón (Liao & Sapers, 2000; ONU, 2007).

Tanto el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de América (CDC), como Kader (2002) y otros autores, afirman que bacterias como *Salmonella entérica* y *Escherichia coli*, al igual que algunos casos del virus Norwalk, podrían relacionarse directamente con el consumo de melón contaminado. En Estados Unidos se ha reportado brotes de *Salmonella entérica* asociados con el consumo de melón fresco. En ellos se han visto involucrados diferentes serotipos de esta bacteria, entre ellos Chester, Poona, Saphra y Oranienburg (Barak *et al.* 2003) (Annous *et al.* 2004) (Annous *et al.* 2005b). La principal forma de contaminación del melón ocurre a través del arrastre del microorganismo de la cáscara a la pulpa, al momento del corte o pelado (PMA, 2005).

Entre los posibles focos de contaminación están el uso de estiércol para fertilizar (sin el debido compostaje), el ingreso a las áreas meloneras de ganado que proviene de áreas

vecinas, el uso de aguas contaminadas para riego, mala higiene en el personal, falta de limpieza y desinfección de equipos, poco control en la calidad de frutas (frutos deteriorados o dañados) y un incorrecto o deficiente lavado de la fruta antes del empaque (Deza *et al.* 2004; Mari *et al.* 2004; Ukuku, 2006).

Ante este panorama, la producción de alimentos lleva consigo una alta responsabilidad, tanto social como de seguridad, principalmente en el tema de inocuidad (Umaña & Sáenz, 2004). El término inocuidad se define como la garantía de que los alimentos no causarán daño al consumidor cuando se preparen y/o consuman de acuerdo con el uso a que se destinan (CODEX ALIMENTARIUS, 2003b).

A medida que la producción y el consumo de frutas y hortalizas frescas aumenta, crece también la importancia de ofrecer al consumidor la seguridad de que el alimento que consume es inocuo y, en el caso de la producción de melón fresco, esta condición se ha convertido en una necesidad inminente. El creciente aumento en los reportes de brotes asociados con su consumo se traduce actualmente en una mayor atención sobre los mecanismos o métodos disponibles para eliminar los patógenos presentes en la fruta (Sapers, 2001; Chaidez Quiroz, 2002; Araya *et al.* 2008).

Los productores han tenido que introducir nuevas técnicas que aseguren calidad, inocuidad y alto valor nutricional de los productos de una forma sostenible y segura, especialmente en lo referente a los procesos de desinfección (Artés *et al.* 2009). El desarrollo de normativas para describir las Buenas Prácticas Agrícolas, como GLOBALGAP y SQF, junto a normas que ayudan a la gestión de la inocuidad como ISO 22000 y el Sistema HACCP o a asegurar las Buenas Prácticas de Manufactura, como BRC o SQF, entre otros, han venido a facilitar el acceso a los mercados internacionales con productos más seguros (ONU, 2007).

Dentro del proceso de manipulación de productos frescos la etapa de desinfección de la fruta es quizás la medida más importante para controlar la contaminación microbiológica

del alimento, siendo considerada, en algunas plantas y para algunas frutas, un Punto Crítico de Control (PPC) del Sistema HACCP (Umaña & Sáenz, 2004; Walton *et al.* 2008).

El cloro es el desinfectante más utilizado para frutas y hortalizas frescas. Su utilización debe ser gestionada, de manera que se consiga utilizar la dosis mínima eficaz. Normalmente se trabaja con concentraciones entre 50-200 ppm en productos vegetales como apio, brócoli, camote, chile, espárrago, espinaca, lechuga, maíz dulce, melón, ñame, tomate y zanahoria. El cloro presenta limitaciones debido a una serie de factores que afectan su efectividad, como el pH, la temperatura y el contenido de materia orgánica. Además, el uso de desinfectantes a base de cloro tiene como riesgo la producción de compuestos orgánicos clorados que podrían ser cancerígenos, de manera que podrían afectar la salud humana y el ambiente (Suslow, 2001; Suslow, 2002; Selma *et al.* 2008; Umaña & Sáenz, 2004).

Para melón, la desinfección se realiza aplicando hipoclorito de calcio en el agua de las pilas de lavado o desinfección (en esta se controla la concentración del desinfectante), esto con el fin de disminuir la carga microbiológica del producto y reducir el riesgo de una infección alimentaria. Se utiliza cloro debido a que por su poder oxidante es eficaz y puede ser medido mediante diferentes métodos como: kits de papel tornasol, medidores de potencial de oxidación/reducción y más recientemente con equipos colorimétricos (Suslow, 1998a; Suslow, 2002; Suslow, 2001; Suslow, 2004b).

Cada una de las empresas productoras de melón trabaja con valores límite aceptable de cloro libre (límite crítico, cuando se ha identificado la desinfección como un Punto Crítico de Control). Estos límites deben validarse, determinando cuál es la concentración de cloro más efectiva para reducir los peligros microbiológicos identificados en el melón a niveles aceptables. Además, debe definirse la frecuencia con la que se monitorea este punto crítico, para mantener esta etapa del proceso bajo control. Como forma de monitoreo se cuenta con las lecturas de los equipos que se utilizan para controlar la efectividad del desinfectante, a saber: milivoltios medidos con ORP, cloro libre medido con colorímetro y el pH del agua,

debido a que éste afecta la concentración de cloro libre en la solución. El pH debe mantenerse en un rango entre 6,5 y 7,5 para favorecer la presencia de ácido hipocloroso, que es la forma del cloro más efectiva para la desinfección (Umaña & Sáenz, 2004).

El proceso de lavado y desinfección de melón permite reducir los recuentos de varios microorganismos responsables del deterioro de la fruta. Algunos investigadores aseguran que el sistema actual de lavado y desinfección de melón es poco eficaz en la reducción del recuento de mesófilos aerobios, mohos y levaduras de la fruta (Araya *et al.* 2008; Annous, 2007). Desde el punto de vista de la inocuidad del producto, los desinfectantes deben asegurar que son capaces de conseguir una reducción significativa de células vegetativas de patógenos humanos, tales como *Escherichia coli* O157: H7 o *Salmonella spp.* (Garrett *et al.* 2003). Por ello, los estudios de validación se hacen necesarios para confirmar que las medidas establecidas para mitigar un peligro son efectivas.

La validación se concentra en la recolección y la evaluación de información científica, técnica y de observación, para determinar si las medidas de control son o no capaces de lograr su propósito específico en función del control de peligros (CODEX ALIMENTARIUS, 2008). Los estudios de validación pueden ser realizados por laboratorios contratados, las universidades, los fabricantes de equipos o aditivos o por el personal de la empresa. La mayoría de los estudios de validación resultan de la asociación de empresas y entes comerciales, empresas y universidades o empresas y proveedores (Scott, 2005).

Los resultados de una validación demostrarán que una o varias medidas de control son capaces de controlar un peligro y si se aplica debidamente, o demostrará que no es capaz de controlar el peligro y, por tanto, no debería implementarse (CODEX ALIMENTARIUS, 2008).

Para validar la etapa de desinfección en melones se puede probar diferentes concentraciones de cloro en frutas inoculadas con *Escherichia coli* (indicador de contaminación). Normalmente se suelen inocular frutas con un patógeno humano o

sustituto, determinando la población que sobrevive antes y después de la desinfección (Annous *et al.* 2005a). Así, se podrán correlacionar dichas mediciones y asociarlas con los límites críticos y operacionales que se definan, al igual que para definir la frecuencia de monitoreo en el punto crítico.

Por otro lado, la preocupación que surge a raíz de la posibilidad de que el uso de cloro acarree la producción de compuestos potencialmente peligrosos ha estimulado el interés internacional en el desarrollo de productos o sistemas alternativos de desinfección. Algunas de estas alternativas son: ácido peroxiacético, el ozono, peróxidos, ácidos orgánicos y otros. Sin embargo, las investigaciones han demostrado que, en el caso de melón, estos productos son efectivos en la reducción del número de microorganismos, pero ninguno puede eliminar completamente la contaminación microbiana (Suslow, 2004a; Selma *et al.* 2008).

De igual manera, se ha demostrado en una serie de frutas y verduras que el agua de lavado se puede infiltrar en frutas intactas. Cuando la temperatura del producto es mucho mayor que la temperatura del agua, hay un diferencial de presión suficiente para hacer penetrar agua en el fruto (Bartz, 1988; Suslow, 1998b; Sapers, 2001; FDA/CFSAN, 2001; Kader, 2002; Parish *et al.* 2003; Ibarra *et al.* 2004; Eblen *et al.* 2004; Penteado *et al.* 2004; Branquinho Bordini *et al.* 2007).

Para el caso de melón, los cambios anatómicos e histoquímicos que ocurren en poscosecha podrían afectar la infiltración de células bacterianas. Irregularidades, tales como abrasiones, grietas y huecos en la superficie del melón facilitan la adhesión de células bacterianas e interfieren con su eliminación, al igual que las aberturas naturales, daños por las plagas o la cosecha y las heridas, particularmente si se trabaja con agua sin el adecuado tratamiento desinfectante (Richards & Beuchat, 2004; Suslow, 2004a).

Por lo anterior, se considera importante determinar, bajo las condiciones de operación de la Planta Procesadora de Finca la Cueva, si la infiltración de microorganismos es probable. Dado que la *Salmonella* es el patógeno que más brotes ha causado en melón fresco, se

estudiaría este patógeno. Para ello se plantea determinar, con los melones de la planta, y considerando las temperaturas de la fruta que viene del campo y la temperatura de las pilas de lavado, si la infiltración es posible. Esta información sería de gran beneficio para la empresa pues permitiría establecer los límites críticos de temperatura para la operación de lavado y complementar los resultados del resto de los objetivos planteados en la investigación.

Estas razones, principalmente la necesidad que tienen los productores de melón de acceder a los mercados internacionales con productos seguros y de calidad, hacen necesaria y urgente la realización de investigaciones que permitan validar los puntos críticos del proceso. El mercado ha obligado a las empresas meloneras a asumir diferentes certificaciones que sirven de respaldo para sus productos. Estos programas exigen confirmar la eficiencia y efectividad de toda medida que se tome con el fin de mitigar, reducir o eliminar un potencial riesgo para la salud de los consumidores.

Actualmente, a nivel nacional y debido a problemas climáticos y económicos, la producción de melón se ha visto reducida en área y volumen, por lo que llevar a cabo esta investigación significaría la optimización de un proceso, la reducción de costos (al determinar una dosis mínima efectiva), la minimización de la generación de vapores de cloro (molestos para los trabajadores), pero lo más importante es que se aseguraría la calidad microbiológica del melón de exportación.

Validando el proceso de desinfección, será posible competir a nivel mundial con el valor agregado de ofrecer productos inocuos, amparados en certificaciones y sistemas de proceso que así lo avalan. De esta forma, se incrementan las opciones de exportación para las empresas del país y su crecimiento siempre se traducirá en más y mejores opciones de trabajo para las personas que dependen de la producción melonera en el país.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Validar el punto crítico de control en el proceso de empaque de melón fresco, mediante la determinación de los límites críticos de la etapa de desinfección y el procedimiento de monitoreo asociado.

2.2. Objetivos específicos

- Establecer el límite crítico de temperatura en las etapas de lavado y desinfección del melón.
- Evaluar cualitativamente los posibles puntos de infiltración de microorganismos en melón.
- Estudiar el efecto de la temperatura de la pulpa sobre la infiltración inmediata de *Salmonella* en melón y después de 48 horas de almacenamiento a temperatura ambiente.
- Comparar la reducción microbiológica de *Escherichia coli* obtenida con 6 productos desinfectantes utilizados en melón, para seleccionar el producto más eficaz.
- Determinar el límite crítico de concentración de cloro en la desinfección del melón para *Escherichia coli*.
- Establecer la frecuencia requerida de monitoreo del cloro libre y de dosificación de cloro en la pila de desinfección de melón.
- Analizar si existe correlación entre milivoltios medidos con un medidor del Potencial de Oxido Reducción (ORP) y cloro libre medido con colorímetro.

3. MARCO TEORICO

La producción y comercialización de productos frescos es una de las principales actividades generadoras de ingresos para el sector agropecuario y puede considerarse como un proceso de innovación constante y dinámico (Díaz-Sobac & Vernon-Carter, 1999). Esto es especialmente importante para países en desarrollo ya que, como explica la FDA (2001), en países como Estados Unidos hay una tendencia hacia una mayor importación de frutas y hortalizas frescas.

En las últimas décadas el sector de frutas y hortalizas ha experimentado un sólido crecimiento que se demuestra con el aumento en su consumo y las ventas (Garrett *et al.* 2003). Entre 1982 y 1997, el consumo per cápita de productos frescos aumentó y el mercado total de productos frescos tuvo un incremento del 32% en los Estados Unidos (Harris *et al.* 2003; FDA/CFSAN, 2001; Garrett *et al.* 2003; Aruscavage *et al.* 2006).

Quizá, la principal razón en el aumento de la demanda se deba a un mayor consumo de alimentos listos para consumir o mínimamente procesados tanto en Norteamérica como en Europa (Harris *et al.* 2003; FDA, 1998). Este aumento en la demanda de frutas y hortalizas de alta calidad y vida de anaquel prolongada ha generado que la comercialización de productos hortofrutícolas esté dirigida a la conservación del producto por medio de tecnologías de mínimo procesamiento y prácticas que aseguren la inocuidad (Díaz-Sobac & Vernon-Carter, 1999).

Desde la década de los setentas, en los países desarrollados se inició una promoción activa del consumo de frutas y verduras como parte importante de una dieta saludable (Harris *et al.* 2003). Los vegetales son reconocidos por ser fuente de vitaminas y minerales, carbohidratos complejos, antioxidantes y sustancias anticancerígenas, libres de aditivos y con un alto valor nutritivo esencial para el buen funcionamiento del organismo humano (Umaña & Sáenz, 2004). Como ejemplo Ibarra *et al.* (2004) comentan que investigaciones científicas aseguran que el consumo diario de al menos 5 porciones de frutas y vegetales,

se relaciona con el descenso del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y presión alta.

Los nutricionistas destacan la importancia de las frutas y hortalizas para una dieta saludable y recomiendan el consumo de al menos cinco porciones al día (Beuchat *et al.* 2001). Las frutas y verduras juegan un papel importante en la nutrición humana, especialmente como fuentes de vitaminas (C, A, B6, tiamina, niacina), minerales y fibra dietética. Su contribución como grupo se estima en 91% de vitamina C, 48% de vitamina A, el 27% de la vitamina B6, el 17% de la tiamina, y el 15% de la niacina en la dieta de países desarrollados. Además, proporcionan el 26% de magnesio, el 19% de hierro, y el 9% de las calorías consumidas (Kader, 2002; Ukuku *et al.* 2005).

Por otra parte, con el alza en el consumo de frutas y vegetales también se eleva el riesgo de adquirir enfermedades transmitidas por alimentos como las que provocan *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, entre otros (Ibarra *et al.* 2004; Aruscavage *et al.* 2006; Harris *et al.* 2003). La inocuidad constituye una preocupación creciente tanto para organismos reguladores como para productores y consumidores debido al aumento en la incidencia de enfermedades transmitidas por los alimentos (Allende *et al.* 2009).

3.1. Cultivo y producción de melón

El melón pertenece a la familia *Cucurbitaceae* y su nombre científico es *Cucumis melo* L., siendo una planta anual, herbácea de porte rastrero o trepador. Es un cultivo de polinización entomófila que produce frutos de forma variable, el color de la corteza puede variar entre verde, amarillo, naranja, blanco y, puede ser lisa, reticulada o estriada. La pulpa puede ser blanca, amarilla crema, naranja, salmón o verde. En todos los casos estas características dependen del tipo o variedad de melón (Infoagro Systems S.L, s.f; Parnell *et al.*2003). Esta fruta es originaria de África, de ahí fue llevada a Asia e India y luego a Europa (Bolaños, 1998). Es un cultivo de clima cálido y no excesivamente húmedo (Infoagro Systems S.L, s.f; Parnell *et al.*2003).

Existen al menos cuatro grupos de melón que difieren en el tamaño de la planta y en la forma, color, sabor y tamaño de la fruta. Los miembros de estos grupos se entrecruzan con facilidad, lo que da origen a una amplia variabilidad genética. El grupo más grande es el Cantaloupe, el siguiente es Inodorus (Honey Dew) y además existen el grupo Conomon y el Flexuosus que no son muy utilizados comercialmente pero sí para mejoramiento genético (Bolaños, 1998; Parnell *et al.* 2003). Los melones tipo Cantaloupe se caracterizan por la redcilla que presentan las frutas en la cáscara, el pedúnculo se separa fácilmente cuando la fruta está lista para la cosecha, son muy olorosos y la pulpa es de color naranja (salmón) (Bolaños, 1998; Parnell *et al.* 2003).

Las variedades de melón, para producción comercial, completan su ciclo de vida en sitios con temperaturas entre los 18 y 24°C, permitiendo temperaturas de hasta 37,5°C sin que haya efectos negativos sobre la floración y cuaje de los frutos (Bolaños, 1998).

Los Cantaloupe se cosechan por madurez y no por tamaño. Idealmente la madurez comercial corresponde al estado firme-maduro o $\frac{3}{4}$ desprendido (fruto se desprende fácilmente). Tienen una tasa de respiración entre 4-5 ml CO₂/kg.h y los frutos maduran después de la cosecha, pero su contenido de azúcar no aumenta (Infoagro Systems S.L, s.f.; Bolaños, 1998; Parnell *et al.* 2003).

Los melones para el consumo en estado fresco, deben proceder de variedades o cultivares legítimos y sanos. El fruto debe ser de cosecha reciente, firme, compacto y bien desarrollado, presentar color, olor y sabor típicos de la variedad o cultivar. Además, no deben presentar daños o lesiones de origen físico o mecánico, que afecte la apariencia del producto (MEC, 1988; Barak *et al.* 2003; Parnell *et al.* 2003).

El melón Cantaloupe es reconocido como una fuente importante de nutrientes, aunque en su mayoría esta fruta es agua, su contenido de humedad promedio es de 90,3g/100g. Además, posee importantes niveles de vitaminas como: niacina, riboflavina, tiamina, ácido

ascórbico y ácido fólico, betacaroteno y minerales entre los que destacan: fósforo, potasio, calcio, magnesio y zinc (Eitenmiller *et al.* 1985).

3.1.1. Situación de mercado

Los melones tipo Cantaloupe son los dominantes y más atractivos para la mayoría de los mercados (Laínez & Krarup, 2008). La importancia de la siembra de melón en Costa Rica, radica en la cantidad de mano de obra que se requiere para su cultivo y el aumento en las divisas que ingresan al país, como producto de su venta en el extranjero (Bolaños, 1998). La Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria, publicó que en el año 2013 la producción de melón representó un 3,3% de las ganancias por exportaciones del sector agropecuario.

Las plantaciones de melón para la exportación, se desarrollan en zonas como: Parrita, Quepos y Caldera en el Pacífico Central, Jicaral, Nicoya, Nandayure y Paquera en la Península de Nicoya y Filadelfia, Sardinal y Liberia en el Valle del Tempisque (Bolaños, 1998). Sin embargo, también es durante la temporada 2006-2007 cuando los productores y exportadores de melón de Costa Rica sufren las consecuencias de un resultado positivo para *Salmonella*. El hallazgo fue hecho durante una prueba de detección microbiológica rutinaria efectuada por las autoridades oficiales en el puerto de arribo y que afectó la fruta exportada al este de los EE.UU y Canadá (Araya Rodríguez *et al.* 2008).

Los principales consumidores de productos tropicales son Estados Unidos y la Unión Europea, los cuales han ido obligando a los productores a mejorar la calidad e inocuidad de los productos que llegan a su mercado (Rocha Bastos *et al.* 2005). En Estados Unidos, el consumo de melones reticulados es 4,5 veces superior al de melones inodoros. La preferencia por estos melones se debe a sus características organolépticas (Laínez & Krarup, 2008; Ukuku *et al.* 2005). Según los datos del Ministerio de Comercio Exterior el melón fresco un 2% de las exportaciones nacionales a la Unión Europea y un 0,7% de las exportaciones nacionales a Estados Unidos (MCE, 2015).

3.1.2. Anatomía del melón Cantaloupe

Los melones Cantaloupe son frutos precoces, esféricos, ligeramente aplastados, de pesos comprendidos entre 700 y 1200 gramos; su pulpa es color naranja (salmón), dulce y aromático y posee un pH entre 6,3 – 6,7 (Infoagro Systems S.L, s.f.; Jay *et al.* 2005)

La superficie del melón está formada por una capa de tejido estriado y ceroso bien desarrollado que puede variar en su espesor pero, generalmente es ajustada y estrecha (Ukuku, 2006). Al microscopio es posible observar cómo la superficie del melón está formada por grandes redes y cavernas que hace imposible calcular su grado de rugosidad (Parnell *et al.* 2005; Wang *et al.* 2009). Esta característica proporciona una rugosidad que favorece la adhesión de microorganismos patógenos y reduce la posibilidad de eliminación. Además de la red característica, la superficie de melón Cantaloupe es altamente hidrofóbica debido a la presencia de ceras, lo que hace el proceso de limpieza y desinfección aún más difícil (Rocha Bastos *et al.* 2005; Ukuku, 2006; Ukuku & Fett, 2002).

La superficie externa de un melón presenta una variedad de superficies sobre las que una bacteria puede unirse. La superficie de la célula epidermal se rompe con una malla de tejido conocida como red. Esta red se compone de lenticelas y células de corcho. Estas células tienen paredes hidrofóbicas suberizadas para reducir la pérdida de agua y proteger contra la entrada de patógenos. También imparten el carácter hidrofóbico de la superficie del melón o sea la cutícula, compuesta por ceras y cutina y que cubre las células epidérmicas (Sapers *et al.* 2001; Ukuku & Fett, 2002; Ukuku & Sapers, 2006).

La histología de la cáscara de melón aumenta la adhesión y penetración de las bacterias y, por tanto, podría reducir la eficacia de los tratamientos de desinfectantes (Richards & Beuchat, 2004; Ukuku & Sapers, 2006; Selma *et al.* 2008). En superficies rugosas muy grandes como la del melón, las bacterias quedan bien protegidas por esta característica que les otorga así una alta resistencia a las fuerzas mecánicas que se le aplican durante las operaciones de lavado (Wang *et al.* 2009; Annous *et al.* 2005b).

Dado que la superficie de la fruta es hidrofóbica y con cargas tanto negativas como positivas se considera que existe una relación con la fuerte adhesión a los tejidos de bacterias como: *Salmonella sp.*, *Escherichia coli O157: H7* y *Listeria monocytogenes* en la corteza de melón (Selma *et al.* 2008). De esta manera se justifican los reportes de supervivencia de *Salmonella spp.* y *Escherichia coli O157:H7* en la red de los melones Cantaloupe citados por Sapers *et al.* (2001), Ukuku & Fett (2002), Richards & Beuchat (2004), Annous *et al.* (2005b) y Leaman & Wetherington (2013).

Además, ciertos tipos de melones desarrollan “cracking,” herida que inicia el desprendimiento natural de la fruta, cuando se acercan a la madurez. Las células vivas debajo de las grietas desarrollan un tejido suberoso o corcho que también favorece la adhesión de bacterias patógenas a la superficie (Sapers, *et al.* 2005).

Debido a todas estas características morfológicas del melón es que microorganismos, como *Salmonella*, pueden transferirse de la cáscara hacia el interior, por el simple acto de cortar, debido a que la bacteria estaría adherida a los tejidos de la cáscara (Ukuku, 2006; Leaman & Wetherington, 2013). De la misma forma muchos de estos microorganismos tienen la capacidad de adherirse a los tejidos del fruto y formar biopelículas sobre esta superficie, reduciendo así la capacidad de los desinfectantes de eliminar la contaminación microbiológica (Rocha Bastos *et al.* 2005).

En general, el control que debe tenerse en el programa de calidad del melón incluye el lavado con cloro y el mantenimiento de la temperatura óptima después de empacado (Mohle-Boetani *et al.* 1999). Sin embargo, las bacterias presentes en el melón tienen una respuesta variable a los tratamientos de desinfección. Es probable que esto se deba a la superficie característica del melón y a la presencia de biopelículas (Sapers *et al.* 2001).

3.1.2.1. Infiltración e internalización

Generalmente se habla de los términos internalización e infiltración como sinónimos y que pueden utilizarse entre sí indistintamente, pero existe una pequeña diferencia entre ellos. Por infiltración debe entenderse el arrastre a través de un medio, principalmente agua, de microorganismos (patógenos o no) a las capas internas de un tejido vegetal. Internalización es la penetración, sin que haya mediación alguna, de microorganismos a través de las aberturas naturales del tejido vegetal, de heridas naturales o causadas por fitopatógenos o durante el proceso (Suslow, 2004a; Sapers, 2003a; Sapers, *et al.* 2005; Bartz, 2006; Selma *et al.* 2008).

Ley general de gases establece que cualquier cambio en la presión en un recipiente cerrado de volumen constante es directamente proporcional a un cambio en la temperatura del gas. Por tanto, el volumen ocupado por el gas es directamente proporcional a la temperatura e inversamente proporcional a la presión. Entonces, una fruta actúa como un recipiente cerrado. En su interior las estructuras morfológicas de los frutos contienen volumen (agua y aire). Una disminución en la temperatura dentro de la fruta da como resultado una disminución de la presión interna del gas. La preocupación que existe, radica en que ante esta disminución de presión, el fruto tiende a captar gas o líquido del medio que lo rodea y esto puede permitir la entrada de bacterias en la fruta (Seeman *et al.* 2002).

La infiltración puede ocurrir por otras razones además del diferencial de temperatura. Depende también del tiempo y la profundidad de inmersión, la magnitud del diferencial de temperatura, la agitación, viscosidad del medio ambiente externo, el tamaño y número de aberturas que lleven hacia el interior del producto, entre otros (Buck *et al.* 2003; Sapers, 2003a; Richards & Beuchat, 2004; Ibarra *et al.* 2004; Sapers, *et al.* 2005; Bartz, 2006).

La internalización de microorganismos, ocurre por su adhesión a los tejidos vegetales y la presencia de grietas, fisuras pequeñas en el producto, aberturas naturales, daños por las plagas o la cosecha (Buck *et al.* 2003; Suslow, 2004a; Sapers, *et al.* 2005; Bartz, 2006; Selma

et al. 2008; Doyle & Erickson, 2008). Especialmente los microorganismos pueden internalizarse a través del pedúnculo, la cicatriz floral o microporos naturales (Seeman *et al.* 2002; Sapers, 2003a; Bartz, 2006).

Los eventos de infiltración bacteriana han dado lugar a brotes de enfermedades (FDA, 1998; FDA/CFSAN, 2001; Parish *et al.* 2003; Eblen *et al.* 2004; Gorny, 2006; Soto *et al.* 2007). Diferentes investigaciones han demostrado este fenómeno en frutas como: tomate (Bartz, 1988; Rushing *et al.* 1996; Ibarra *et al.* 2004; Eblen *et al.* 2004), mango (Penteado *et al.* 2004; Eblen *et al.* 2004) ; Sapers, *et al.* 2005; Branquinho Bordini *et al.* 2007), melón (Richards & Beuchat, 2004; FAO, 2011), naranja y toronja (Branquinho Bordini *et al.* 2007) y manzanas (Seeman *et al.* 2002; Eblen *et al.* 2004).

Distintos estudios han demostrado que *Salmonella* Poona puede adherirse a la cáscara de melón y a la cicatriz de pedúnculo. Inclusive se sabe que hay una diferencia significativamente mayor en la recuperación de *Salmonella* Poona en la superficie de la fruta (Richards & Beuchat, 2004). Por esta razón se recomienda que el agua de lavado se mantenga a temperaturas superiores a la temperatura de la fruta (Suslow, 1998b).

La presencia de alteraciones extensas en la cutícula del melón podrían comprometer su inocuidad (Richards & Beuchat, 2004). Numerosos estudios controlados de contaminación, han demostrado que una cáscara intacta, en la cosecha, es una barrera eficaz contra la penetración de bacterias a la pulpa del melón (Suslow, 2004a).

3.1.2.2. Formación de biopelículas

Cuando las bacterias se adhieren a las superficies de frutas y verduras, tienden a ubicarse en los poros, hendiduras u otras irregularidades naturales de superficie intacta, donde se protegen. También se fijan a las superficie en cortes, heridas o raspaduras (Sapers, 2001). El crecimiento microbiano en las frutas y vegetales crudos pueden resultar en la formación de biopelículas. Estas biopelículas pueden proporcionar un entorno de protección para los

agentes patógenos y reducir la eficacia de los tratamientos y otros agentes inhibidores (Buck *et al.* 2003; Sapers, 2001).

Las biopelículas son comunidades microbianas muy complejas, producto de la multiplicación de células bacterianas sobre una superficie ya sea biótica o abiótica. Consisten en una matriz de un polímero que se adhiere a los polisacáridos que forman la pared celular y protegen a los microorganismos de las agresiones ambientales, la desecación y de agentes bactericidas. Estas biopelículas forman una barrera que impide el acceso a biocidas, toxinas, entre otros (Costerton *et al.* 1999; Cherry, 1999; Sapers, 2001; Annous *et al.* 2005b; Aruscavage *et al.* 2006; Dequeiroz & Day, 2007; Annous, 2007; FAO, 2011).

El desarrollo de biopelículas por parte de los patógenos humanos puede protegerlos de prácticas como el lavado (Annous *et al.* 2005b; Aruscavage *et al.* 2006). Cuando estas películas se forman en ambientes naturales o industriales son resistentes a los bacteriófagos, amebas y a los diferentes biocidas químicos utilizados para combatir la contaminación biológica en los procesos industriales. La complejidad de la estructura de la biopelícula y su metabolismo ha llevado a la analogía de que estas son como los tejidos de los organismos superiores (Costerton *et al.* 1999).

La adherencia bacteriana a las superficies está influenciada no sólo por la carga superficial de la célula y su hidrofobicidad, sino también por la presencia de apéndices en la superficie como flagelos y fimbrias o la presencia de polisacáridos extracelulares (Costerton *et al.* 1999; Ukuku, & Fett, 2002).

Uno de los mecanismos de resistencia de una biopelícula ante los agentes antimicrobianos es la incapacidad del agente para penetrar en la profundidad de la esta. Las sustancias poliméricas que conforman la matriz de la biopelícula, son conocidas por retardar la difusión de los antibióticos y solutos en general. De esta forma, el agente antimicrobiano se desactiva en las capas exteriores de la misma más rápido de lo que se difunde. Esto es cierto

para los oxidantes reactivos como el hipoclorito y el peróxido de hidrógeno (Costerton *et al.* 1999).

La capacidad de las bacterias patógenas de adherirse a la superficie de frutas y hortalizas sigue siendo un problema potencial de inocuidad y de gran preocupación para la industria de los productos frescos (Ukuku & Fett, 2002). Cuando la bacteria forma una biopelícula, se hace más resistente al desprendimiento o la inactivación por medio de desinfectantes. Algunos patógenos humanos como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes*, al igual que otras bacterias como *Pseudomonas spp.* y *Erwinia spp.* son capaces de formar biopelículas (Sapers, 2001). Algunos autores han documentado que *Salmonella spp.* produce una biopelícula compuesta por polímeros extracelulares de celulosa y otros compuestos. Ellos asocian esta película con una mayor resistencia de *Salmonella* a desinfectantes como el cloro (Ukuku & Fett, 2002; Annous *et al.* 2005b).

La población de *Escherichia coli* en la superficie de melón varía desde 5,2 hasta 5,8 Log₁₀ UFC/cm², en comparación con 4,3 a 4,8 Log₁₀ CFU/cm² de *Salmonella spp.* y 2,8 a 3,2 Log₁₀ UFC/cm² para *Listeria monocytogenes*. Los valores más altos indican un fuerte apego de las bacterias a la superficie de melón e indica la relativa incapacidad de los tratamientos de lavado para separar el agente patógeno de la superficie de melón con el agua (Ukuku & Fett, 2002). Cuanto mayor sea el tiempo de contacto entre la bacteria y la superficie del melón, mayor es la probabilidad de que haya formación de biopelículas antes de la desinfección (Annous *et al.* 2005b; Core, 2005).

3.2. Inocuidad de Alimentos

El término calidad se utiliza de diversas formas en relación con frutas y hortalizas frescas, tales como: calidad de mercado, calidad comestible, transporte de calidad, calidad de mesa, calidad nutricional, calidad interna, calidad microbiológica y apariencia de calidad (Kader, 2002). La reducción y/o pérdida de la calidad microbiológica en frutas y hortalizas puede ocurrir durante la precosecha, el corte y recolección, el almacenamiento y el transporte, en

los puntos de venta o incluso durante su preparación para consumo (Díaz-Sobac & Vernon-Carter, 1999).

Garantizar la inocuidad de los productos vendidos es extremadamente importante para los consumidores. Si el producto no es inocuo, no importan sus otras cualidades o calidades, es necesario retirar el producto del mercado (Kader, 2002; Díaz-Sobac & Vernon-Carter, 1999). Por tanto, se definen como alimentos inocuos, aquellos que garantizan que al momento de ser preparados y consumidos no causarán enfermedad al consumidor (CODEX ALIMENTARIUS, 2003b; ONU, 2007).

En materia de inocuidad de productos frescos, las medidas han aumentado debido al creciente número de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (Selma *et al.* 2008). Algunas acciones para controlar el riesgo de contaminación incluyen: higiene de los trabajadores de campo, uso de equipo limpio, limpieza de contenedores, saneamiento del agua y control de temperatura, entre otros (FDA/CFSAN, 2001; Beuchat *et al.* 2001; Velázquez *et al.* 2009).

Puede argumentarse que inocuidad es el componente más importante de la calidad, pues la falta de inocuidad en un producto puede dar lugar a lesiones graves, enfermedades o incluso la muerte para el consumidor (ONU, 2007). La calidad vista como inocuidad depende de factores de riesgo que incluyen: niveles de sustancias tóxicas naturales presentes en algunos cultivos, contaminantes como residuos químicos y metales pesados, higienes de las operaciones de cosecha y poscosecha, procedimientos que reducen el potencial de crecimiento y desarrollo de los hongos que producen micotoxinas o bacterias patógenas al hombre (Kader, 2002; ONU, 2007).

Los patógenos asociados frecuentemente con productos frescos, en su mayoría, se encuentran comúnmente en el tracto intestinal y la materia fecal de seres humanos o animales. A nivel de poscosecha las fuentes de contaminación son: las heces, la manipulación humana, equipos de cosecha, contenedores de transporte, los animales

salvajes y domésticos, insectos, polvo, agua de enjuague, hielo, los vehículos de transporte y equipos de procesamiento (Tauxe, 1997; Seeman *et al.* 2002; Kader, 2002; Buck *et al.* 2003; Figueroa *et al.* 2005; Velázquez *et al.* 2009). Además, se favorece el incumplimiento de condiciones como temperaturas no apropiadas de: procesamiento, almacenamiento y transporte, higiene deficiente del personal, alimentos en contacto con superficies no limpias, equipo contaminado (Díaz-Sobac & Vernon-Carter, 1999).

Al llegar las hortalizas a la planta industrial, los recuentos de bacterias existentes en la superficie pueden oscilar entre 10^2 y 10^7 por gramo. Esta cantidad podría aumentar durante el procesamiento debido a que las frutas y hortalizas están expuestas a una mayor contaminación por superficies en contacto o bien reducirse por acción de las medidas aplicadas en contra de los microorganismos existentes (Frazier & Westhoff, 1993; Ukuku & Sapers, 2001; Ukuku, 2004; Briñez *et al.* 2006).

Por esta razón, métodos de manipulación que reduzcan al mínimo los rasguños, heridas profundas y sobre todo aberturas en la superficie, serán beneficiosos para reducir la posibilidad de contaminación y la probabilidad de que las bacterias puedan ser internalizadas (Suslow, 2004a; Umaña & Sáenz, 2004).

Los peligros biológicos en productos frescos se refieren a microorganismos tales como bacterias, hongos (levaduras y mohos), protozoos, virus y parásitos (ONU, 2007). En general se considera un peligro microbiano la aparición de un microorganismo que tiene el potencial para causar enfermedad o lesión (FDA, 1998).

Existen estudios que demuestran que los consumidores necesitan ser informados sobre la importancia de lavar las frutas y verduras antes de su consumo (Parnell *et al.* 2005). El agua puede ser portadora de gran cantidad de microorganismos, incluyendo las cepas patógenas de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Vibrio cholerae*, *Shigella spp.*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Cyclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii*, y los virus Norwalk y de hepatitis A. Incluso pequeñas cantidades de contaminación con algunos de estos

organismos pueden dar lugar a enfermedades (FDA, 1998; Díaz-Sobac & Vernon-Carter, 1999).

La calidad del agua que entra en contacto con los productos frescos después de la cosecha para: limpieza, clasificación, refrigeración y aplicación de tratamientos, es ampliamente reconocida como el punto de control esencial en productos frescos. En consecuencia es importante seguir programas de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) para asegurar que el agua es de calidad en todas las operaciones. Los niveles de productos químicos antimicrobianos deben ser controlados y registrados rutinariamente para garantizar que se mantienen en los niveles adecuados (Suslow, 2003; Frazier & Westhoff, 1993).

Es importante señalar que el lavado y desinfección probablemente no eliminan por completo los agentes patógenos una vez que ha ocurrido la contaminación. Por lo tanto, es importante utilizar protocolos de limpieza eficientes a lo largo de toda la cadena de producción (Parish *et al.* 2003; FDA/CFSAN, 2001; Kader, 2002).

Existen evidencias que demuestran que el uso de agua de riego contaminada puede incrementar la frecuencia de microorganismos patógenos detectados en productos cosechados (Díaz-Sobac & Vernon-Carter, 1999).

3.2.1. Enfermedades transmitidas por alimentos

Los microbiólogos de alimentos comenzaron a investigar la adherencia de bacterias a los vegetales y equipos de proceso en la década de 1970. Los estudios anteriores se centraron principalmente en la adhesión de microorganismos transmisores de enfermedades a alimentos de origen animal (Liao & Sapers, 2000). Entre los microorganismos que pueden causar problemas a la salud se incluyen levaduras, hongos, bacterias, virus y parásitos (CODEX ALIMENTARIUS, 2003). Las bacterias constituyen un riesgo común en la inocuidad debido a su omnipresencia en el medio ambiente. Las bacterias patógenas pueden potencialmente contaminar frutas y hortalizas en todas las etapas de la cadena de

producción. El número de bacterias individuales que deben estar presentes para causar enfermedades humanas varía con el tipo de organismo, la edad y el estado del hospedero (ONU, 2007).

Los términos intoxicación o infección alimentaria se emplean corrientemente para referirse a un amplio grupo de enfermedades o condiciones clínicas que afectan el tracto gastrointestinal. La inmensa mayoría de las enfermedades de este tipo, encontradas en los países desarrollados, son consecuencia del consumo de comidas o bebidas contaminadas (Forsythe & Hayes, 2000).

Los organismos capaces de producir enfermedades en los humanos, pueden llegar a los alimentos en cualquier etapa del proceso de producción y tienen un gran potencial para causar epidemias, inclusive la muerte en cierto tipo de consumidores que presentan mayores riesgos (niños, adultos afectados por enfermedades del sistema inmunológico y ancianos) (Umaña & Sáenz, 2004).

Entre los principales organismos que pueden causar enfermedades al ser humano están los parásitos como *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum* (Chaidez Quiroz, 2002), los virus hepatitis A, enterovirus Norwalk adenovirus, rotavirus). También las bacterias como: *Escherichia coli* enterotoxigénica y *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp.*, *Clostridium spp.* y *Staphylococcus spp.*, entre otras (Sapers, 2001; Chaidez Quiroz, 2002; Buck *et al.* 2003; Annous *et al.* 2004; Parnell *et al.* 2005; Doyle & Erickson, 2008; Velázquez *et al.* 2009).

Los microorganismos capaces de causar enfermedades en humanos se pueden encontrar en los productos crudos. A veces son parte de la microflora de frutas o vegetales debido a contaminaciones accidentales en el suelo y sus alrededores. En otros casos, se introducen en los alimentos por malas prácticas de manipulación en la producción agrícola o los procesos posteriores a la cosecha (ONU, 2007; Kader, 2002).

En general, los patógenos pueden sobrevivir pero no crecer en la superficie exterior ileso de frutas o verduras, debido en parte al carácter protector de las barreras naturales de la planta. Sin embargo, la supervivencia de patógenos es significativamente mejorada una vez que la barrera de la epidermis se ha roto, ya sea por daños físicos o por la degradación de los patógenos de plantas (bacterias u hongos). Estas condiciones también pueden promover la multiplicación de agentes patógenos, especialmente a temperaturas altas (sin refrigeración) (FDA/CFSAN, 2001; Kader, 2002). Excepción a esta regla son las bacterias *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* O157:H7, las cuales pueden sobrevivir y desarrollarse en la superficie sana de frutas como el melón y la sandía entre otros (FDA/CFSAN, 2001; Harris *et al.* 2003; PMA, 2005).

Datos del Centro Estadounidense para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) indican que el número de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos vinculados a productos frescos y el número de personas afectadas en estos brotes, se ha incrementado en los últimos años (Tauxe, 1997; Cherry, 1999; FDA/CFSAN, 2001; Ukuku & Sapers, 2001; Kader, 2002; Buck *et al.* 2003; Harris *et al.* 2003; Qiang *et al.* 2005; Ukuku *et al.* 2005).

Las situaciones más urgentes de inocuidad en la industria de alimentos hoy son causados por la presencia de *Escherichia coli* O157: H7 y *Salmonella spp.* en carnes crudas, los productos avícolas y en vegetales frescos (Sperber, 2005; Venkitanarayanan *et al.* 1999). Una encuesta de la FDA acerca de los productos frescos importados demostró que un 5,3% de las muestras dieron positivas para *Salmonella* y un 2% de muestras dieron positivas para *Shigella* de un total de 151 muestras de melones procedentes de México, Costa Rica y Guatemala (Ukuku, 2004).

3.2.1.1. *Escherichia coli*

El término "coliformes" fue acuñado para describir a este grupo de bacterias entéricas. No es una clasificación taxonómica, sino más bien una definición de trabajo que se utiliza para

describir un grupo de bacterias gram-negativas, anaerobios facultativos que fermentan la lactosa produciendo ácido y gas dentro de 48 horas a 35 ° C. En 1914, el Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos aprobó el recuento de coliformes como una norma de importancia sanitaria (FDA/CFSAN, 2002).

En 1892, Shardingger propuso el uso de *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal. Esto se basó en la premisa de que *Escherichia coli* es abundante en las heces humanas y animales además de que, generalmente no se encuentran en otros nichos. Por lo tanto, la presencia de *Escherichia coli* en los alimentos o el agua llegó a ser aceptada como indicador de contaminación fecal reciente y la posible presencia de otros patógenos entéricos como *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7 (FDA/CFSAN, 2002; Aruscavage *et al.* 2006).

La bacteria *Escherichia coli*, fue identificada en 1885 por el pediatra alemán, Theodor Escherich. Esta bacteria es miembro de la familia Enterobacteriaceae que incluye muchos géneros, entre ellos agentes patógenos conocidos como: *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* (FDA/CFSAN, 2002). En el género *Escherichia* sólo hay una especie *Escherichia coli*. Esta bacteria es un bacilo corto, móvil, gram-negativo, con muchas características iguales a las salmonellas. Uno de los detalles característicos que las diferencia es que *E. coli* es capaz de utilizar la lactosas y sacarosa con la producción de ácido y gas (Forsythe & Hayes, 2000).

Las *Escherichia coli* se dividen en seis grupos: enteroagregante, enterohemorrágica (produce citotoxinas que originan síntomas más graves y se conoce principalmente *E. coli* O157:H7), enteroinvasiva, enteropatógena, enterotoxigénica y verotoxigénica (Forsythe & Hayes, 2000; Frazier & Westhoff, 1993). La *Escherichia coli* está ampliamente distribuida en el intestino de seres humanos y animales de sangre caliente, es anaerobio facultativo predominante en el intestino y parte esencial de la flora intestinal que mantiene la fisiología del huésped sano (Frazier & Westhoff, 1993; FDA/CFSAN, 2002).

Aunque la mayoría de las cepas de *Escherichia coli* no se considera como agentes patógenos, también hay cepas patógenas que cuando se ingieren causan enfermedades

gastrointestinales en los seres humanos sanos (FDA/CFSAN, 2002). La bacteria *Escherichia coli* O157: H7 enterohemorrágica ha surgido como un patógeno muy importante dentro del grupo de las enfermedades transmitidas por alimentos (Wang *et al.* 2009). La bacteria *Escherichia coli* O157: H7 fue identificada por primera vez como patógeno en 1982 en un brote de diarrea con sangre debido al consumo de hamburguesas de una cadena de comida rápida (Tauxe, 1997). En los últimos años se ha demostrado que se adhiere fácilmente a los estomas en productos como: lechuga, culantro u otras hojas (Seo & Frank, 1999).

Escherichia coli O157:H7 es reconocida como un patógeno importante. Requiere de 2 a 5 días de incubación y las secuelas de la gastroenteritis van desde diarrea con sangre hasta síndrome urémico hemolítico, el cual es más común en niños pequeños (<5 años) y en los ancianos (FDA/CFSAN, 2001; Harris *et al.* 2003; Ukuku *et al.* 2005; ONU, 2007). La gravedad de la enfermedad causada por *E. coli* O157: H7 y la baja dosis infecciosa (menos de 100 UFC/g) han contribuido a considerar esta bacteria entre los agentes patógenos de alto riesgo para la salud humana (Velázquez *et al.* 2009; Dormedy *et al.* 2000).

3.2.1.2. *Salmonella spp.*

El enteropatógeno bacteriano más común asociado con frutas y verduras es *Salmonella spp.* por lo que en Estados Unidos se ha convertido en un "problema de salud pública" (Ukuku & Sapers, 2001; Aruscavage *et al.* 2006; ONU, 2007). Sin embargo, diferentes autores demostraron que los productos frescos también son vehículo para la transmisión de *E. coli* O157: H7 (Aruscavage *et al.* 2006).

La *Salmonella* es un bacilo corto, gram-negativo, no esporulado y generalmente móvil con flagelos. El género *Salmonella* contiene unas 2000 cepas distintas (denominadas serotipos o serovares) (Forsythe & Hayes, 2000; Frazier & Westhoff, 1993). Estas bacterias son anaerobios facultativos caracterizados bioquímicamente por su capacidad de fermentar glucosa con producción de ácido y gas, y por su incapacidad de hidrolizar la lactosa y la sacarosa. Su temperatura óptima de crecimiento está próxima a los 38°C; son relativamente

fotosensibles y se destruyen a 60°C en unos 15-20 minutos, siendo incapaces de crecer por debajo de los 7 u 8°C (Frazier & Westhoff, 1993) (Forsythe & Hayes, 2000).

La salmonelosis es una infección causada por la bacteria *Salmonella*. Requiere de 8 a 72 horas para incubar después de la ingestión de alimentos contaminados. Por lo general, la bacteria se ha multiplicado en el alimento hasta alcanzar cifras elevadas, aumentando así la posibilidad de producir una infección (Harris *et al.* 2003; ONU, 2007). La probabilidad de infección por ingestión de un alimento que contiene *Salmonella* depende de la resistencia del consumidor, la infectividad de la cepa de *Salmonella* en cuestión y del número de microorganismos ingeridos (Frazier & Westhoff, 1993).

La enfermedad se produce cuando las bacterias mueren, después de multiplicarse en el intestino de su hospedero, y sufrir la lisis subsiguiente, liberando una potente endotoxina. Se trata de un liposacárido que forma parte de la membrana de la bacteria y que es el principal responsable de los síntomas clínicos. La enfermedad produce dolor abdominal, diarrea, escalofríos, fiebre, náuseas, vómitos y en algunos casos cefalea y escalofríos. Otros síntomas de la enfermedad son: heces líquidas, verdosas y malolientes, abatimiento, debilidad muscular, lasitud, generalmente fiebre moderada, desasosiego, contracciones nerviosas y somnolencia. Normalmente dura hasta siete días pero algunos síntomas pueden persistir semanas e incluso meses (Forsythe & Hayes, 2000; Frazier & Westhoff, 1993).

Salmonella ha sido aislada de diferentes clases de alimentos frescos y pre-cortados incluyendo frutas y verduras como: lechuga, coliflor, repollo, cilantro, pepino, papa, tomate, sandía y melón (Selma *et al.* 2008). Los serotipos de *Salmonella* parecen tolerar la rápida desecación mejor que los patógenos bacterianos comunes. El nivel de supervivencia y persistencia depende de la concentración inicial, el tiempo que lleve la contaminación, las condiciones ambientales y en cierta medida de si la contaminación se asocia con algún tipo de protector orgánico (Suslow, 2004a).

La bacteria *Salmonella* es responsable de un amplio número de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, entre los cuales destaca el melón (Core, 2005). Las personas y los animales son directa o indirectamente la fuente de contaminación de los alimentos con salmonellas. Los microorganismos pueden proceder de enfermos clínicos o de portadores (Frazier & Westhoff, 1993).

3.2.2. Brotes de enfermedades asociados con el consumo de melón

Los principales organismos asociados con brotes de enfermedades por consumo de melón son *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*. Sin embargo, Annous *et al.* (2004) explican que la FDA ha reportado casos positivos de *Shigella spp.* en melones producidos en Costa Rica e importados de otros países. Además, Ukuku *et al.* (2005) explican que aunque no existen informes documentados de brotes de Listeriosis asociados con el consumo de melón fresco o mínimamente procesado, la posibilidad de un brote de este tipo sigue siendo motivo de preocupación, debido a la similitud de esta bacteria con *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*.

3.2.2.1. Casos de *Salmonella spp.*

Además de melón se han reportados brotes de *Salmonella spp.* en otros vegetales como manzana, sandía, lechuga, jugos de naranja y manzana sin pasteurizar, mango y tomate (Rushing *et al.* 1996; Sapers *et al.* 2001; Buck *et al.* 2003; Sivapalasingam *et al.* 2003; Branquinho Bordini *et al.* 2007, FAO, 2011).

Siete brotes de salmonelosis han sido asociados directamente con melones. En ellos los agentes involucrados son los tipos Chester, Poona, Saphra y Oranienburg. Para la mayoría de los brotes, se ha supuesto que las bacterias de *Salmonella* estuvieron presentes en la corteza, presumiblemente contaminada en el campo o durante el lavado en una planta de empaque (FDA/CFSSAN, 2001; Danyluk *et al.* 2014). Los resultados de este estudio sugieren que las bacterias de *Salmonella* adheridas a las superficies de melón puede sobrevivir al menos 6 días (Ukuku & Sapers, 2001), esto debido a que esta bacteria es capaz de penetrar

rápidamente en la corteza del melón o formar una película de polímeros protectores que la fijan a la superficie (Core, 2005).

El primer reporte en melón fue en 1990. Correspondió a un brote de *Salmonella* Chester que afectó a 245 individuos y causó dos muertes en 30 estados diferentes de Estados Unidos (Mohle-Boetani *et al.* 1999; Ukuku & Sapers, 2001; Harris *et al.* 2003; Barak *et al.* 2003). El segundo caso se reportó durante junio y julio de 1991, en los estados de Illinois y Michigan: se identificaron 49 casos de infección por *Salmonella* Poona. Los síntomas incluyeron: náuseas, vómitos, diarrea, calambres abdominales y fiebre, la duración de los síntomas fue de 3-12 días. El estudio del caso determinó que la fuente de contaminación fue melón utilizado en barras de ensaladas o en ensaladas de frutas. La enfermedad no se asoció con el consumo de melones frescos en rodajas (CDC, 1991; Mohle-Boetani *et al.* 1999; Ukuku & Sapers, 2001; Barak *et al.* 2003).

En 1997 el Centro para Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) reportó un caso de *Salmonella* Saphra entre el 23 febrero-15 mayo en el estado de California. El estudio de epidemiología y rastreo llevó a la conclusión de que los responsables del brote fueron melones tipo Cantaloupe importados de México (Mohle-Boetani *et al.* 1999; Barak *et al.* 2003; Harris *et al.* 2003). Un brote de *Salmonella* Oranienburg tiene lugar en 1998, en esta ocasión hubo 22 casos confirmados en Ontario, Canadá (Mohle-Boetani *et al.* 1999; Barak *et al.* 2003; Harris *et al.* 2003). Un nuevo caso de *Salmonella* Poona tiene lugar en el año 2000, en esta ocasión hubo un total de 43 individuos enfermos. Este brote fue asociado con el consumo de melón en ensaladas de frutas (Ukuku & Sapers, 2001; Harris *et al.* 2003; Barak *et al.* 2003; Figueroa *et al.* 2005).

El caso más grave ocurrió en 2001 cuando en 13 estados diferentes, 46 personas enfermaron por consumo de melón en ensaladas de frutas, como resultado hubo dos personas fallecidas. En este caso el agente etiológico fue *Salmonella* Poona (Barak *et al.* 2003; Figueroa *et al.* 2005). Otro brote más ocurrió entre junio y julio de 2006, un total de

41 infecciones fueron diagnosticadas a causa de *Salmonella* Oranienburg, éstas fueron diagnosticadas en personas de 10 estados de EE.UU. y una provincia canadiense (CDC, 2007). Las ensaladas de frutas que consumieron estaban compuestas de varios tipos de frutas, principalmente melones Cantaloupe y Honey Dew. Una investigación de rastreo de la fuente original del Cantaloupe y Honey Dew indicó que probablemente fue melón producido en Estados Unidos el que causó el brote, pero no se identificó una finca en específico (CDC, 2007; Selma *et al.* 2008).

3.2.2.2. Casos de *Escherichia coli*

Existe registro de un brote ocurrido en agosto de 1993, vinculado con el consumo de melón contaminado con *Escherichia coli* O157: H7 (Chaidez Quiroz, 2002; Harris *et al.* 2003; Ukuku *et al.* 2005; Selma *et al.* 2008; FAO, 2011; Danyluk *et al.* 2014).

3.2.2.3. Casos de *Listeria monocytogenes*

A la fecha se ha presentado un único caso, pero ha sido el más severo hasta ahora de los ocurridos en melón. Sucedió entre Agosto y Octubre de 2011 en los Estados Unidos de América. Se reportaron 147 personas enfermas y 33 muertes (CDC. 2012a; CDC. 2012b; McCollum *et al.* 2013; Danyluk *et al.* 2014)

3.3. Programas de inocuidad

Después de la Segunda Guerra Mundial, se produjeron incidentes graves de inocuidad durante el nacimiento de la industria alimentaria. Principalmente se desarrollaron casos de contaminación por *Salmonella spp.* que provenía de huevos o productos lácteos, o la presencia y el crecimiento de *Clostridium botulinum* en alimentos enlatados. Aquí nace la necesidad de desarrollar metodologías que permitan minimizar los riesgos de enfermedades transmitidas por alimentos (Sperber, 2005).

El mejor método para eliminar patógenos de alimentos vegetales es ante todo la prevención. Sin embargo, esto no siempre es posible y la necesidad de lavar y desinfectar muchas clases de vegetales sigue siendo de vital importancia para prevenir brotes de enfermedades. Esto debe ir unido siempre a un grupo de estrategias que impidan que la contaminación se produzca, entre ellas: las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP), Procedimientos Operativos Estándar de Saneamiento (POES) entre otras prácticas más (FDA/CFSAN, 2001; Kader, 2002; ONU, 2007; Parish *et al.* 2003; Sapers, 2001; Sperber, 2005).

Las guías de BPA y BPM son de carácter genérico, debido a la gran variedad de alimentos a los que se aplican, entre ellos frutas y productos vegetales. No contienen pruebas específicas de detección y seguimiento, porque hay pocos datos disponibles para uso. Estas guías recomiendan operaciones y prácticas de manejo que ayudan a mitigar los riesgos (Garrett *et al.* 2003).

3.3.1. Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control

El Análisis de Peligros y Puntos Críticos de control conocido como HACCP por sus siglas en inglés, nació debido a la necesidad de que los astronautas de la NASA llevaran alimentos seguros al espacio. En colaboración, la empresa Pillsbury Company, la NASA y el ejército de los Estados Unidos dieron origen a la propuesta del plan HACCP (Forsythe & Hayes, 2000; Sperber, 2005).

El programa se introdujo a la industria de los Estados Unidos en 1971, en la Conferencia sobre Protección Alimentaria. Posteriormente, y como medio para conseguir una producción alimentaria segura, fue adoptado en todo el mundo al hacerlo la Comisión del Codex Alimentarius en 1993 (Forsythe & Hayes, 2000; ONU, 2007).

Dado que los sistemas de control de calidad anteriores estaban sobre la base de inspecciones del producto final, estos resultaban costosos y, peor aún, inexactos. Por este motivo las limitaciones de los sistemas de control de calidad para asegurar la inocuidad de los alimentos pronto se hicieron evidentes (Tauxe, 1997; Sperber, 2005; Figueroa *et al.* 2005). Actualmente, debido a la baja dosis infecciosa de algunos patógenos, se establece que el éxito de la producción preventiva radica en la reducción, control o eliminación de los microorganismos mediante el programa HACCP (Dormedy *et al.* 2000; Forsythe & Hayes, 2000)

A pesar de que el HACCP no es obligatorio, ha sido acogido por la industria como una herramienta útil para la aplicación de prácticas dirigidas a conseguir un entorno de producción inocuo. El HACCP es adecuado para identificar los peligros, controlar la producción y desarrollar un registro eficaz de mantenimiento del sistema (Garrett *et al.* 2003; Gorny, 2006).

Una de sus principales características es que el programa se centra en la prevención, puede aplicarse en toda la cadena alimentaria, desde la producción primaria hasta el consumo final (ONU, 2007). De esta forma, se busca prevenir la contaminación microbiana con medidas de protección higiénicas que eviten el desarrollo microbiano y la formación de toxinas en los alimentos y, busca eliminar cualquier microorganismo productor de toxiinfecciones alimentarias (Venkitanarayanan *et al.* 1999; Forsythe & Hayes, 2000; Sperber, 2005; Gorny, 2006).

Para desarrollar y llevar correctamente un Programa de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control es necesario cumplir con lo siguiente: realizar un análisis de peligros, determinar los puntos críticos de control, establecer límites críticos, establecer un sistema de monitoreo de los puntos críticos, definir acciones correctivas que se adoptarán cuando el proceso se salga de control, definir procedimientos para la de verificación del

funcionamiento del sistema e instaurar mecanismos para la documentación de todos los procedimientos y registros (Forsythe & Hayes, 2000; Sperber, 2005).

El uso del sistema HACCP en la producción agrícola es de alguna manera limitada. Cuando las frutas y verduras se consumen en fresco, no hay medidas que puedan eliminar o reducir los riesgos biológicos a niveles aceptables, una vez que se ha producido la contaminación (ONU, 2007).

Es muy importante para el éxito de los sistemas de HACCP evaluar y validar la eficacia del programa. Estos sistemas requieren de la medición objetiva de los peligros biológicos para validar el funcionamiento y las estrategias de intervención (Dormedy *et al.* 2000).

3.3.2. HACCP para melón

El melón es considerado un alimento potencialmente peligroso en el Código Alimentario de la FDA ya que es capaz de soportar el crecimiento de patógenos debido a su baja acidez (pH 5,2 a 6,7) y alta actividad de agua (0,97 a 0,99) (FDA/CFSAN, 2001). En Estados Unidos, la FDA llevó a cabo una investigación donde obtuvo que el 7,3% y el 4,3% de las cortezas de melón importado y nacional respectivamente dieron resultados positivos para *Salmonella spp.* o *Shigella spp.* (Richards & Beuchat, 2004; Selma *et al.* 2008).

El melón puede contaminarse durante el crecimiento, el manejo post-cosecha, empaque, transporte, distribución, o durante la preparación final en servicio de alimentos o en el hogar (Parnell *et al.* 2005; Selma *et al.* 2008; Leaman & Wetherington, 2013). El mejor enfoque para mantener la naturaleza sana y el consumo seguro de los melones es establecer criterios estándar para reducir al mínimo el riesgo de contaminación externa e interna en cada paso de "la granja al tenedor" (Suslow, 2003; Umaña & Sáenz, 2004).

En la mayoría de superficies vegetales se concentra una gran cantidad de sustancias nutritivas que favorecen el crecimiento de los microorganismos desde los inicios de

desarrollo del producto hasta su consumo (Cherry, 1999; Umaña & Sáenz, 2004; Rocha Bastos *et al.* 2005). La amplia red que posee el Cantaloupe ofrece mayores espacios de adhesión para los microorganismos. Las irregularidades de la superficie como: rugosidad, grietas y otros daños físicos, se ha demostrado que aumentan la adherencia bacteriana y reducen la capacidad de los tratamientos de lavado y desinfección para eliminar las células bacterianas (Parnell *et al.* 2005; Annous, 2007; Ukuku, 2004).

En un plan HACCP de melón, se deben seguir todos los principios establecidos y que se describen a continuación.

3.3.2.1. Establecimiento del análisis de peligros

Para alcanzar este objetivo se necesita de un equipo de HACCP. El equipo debe estar conformado de forma tal que se disponga de información de primera mano del proceso de producción y establecerá un diagrama de flujo del proceso (Figura 1) en el que se identifiquen los peligros (Forsythe & Hayes, 2000).

Con el fin de reducir el riesgo y para aumentar la seguridad en la producción es necesario, en primer lugar, evaluar los riesgos potenciales en el entorno de producción (ONU, 2007). El diagrama de flujo de proceso de empaque de melón fresco se observa en la Figura 1.

3.3.2.2. Identificación de Puntos Críticos de Control

Una vez definidas las fuentes potenciales de contaminación u otros peligros, deben desarrollarse prácticas para controlar, reducir o eliminarlos (ONU, 2007). Cuanto más alta sea la probabilidad de que un peligro genere un efecto nocivo, mayor atención debe prestarse a asegurarse de que el grupo de medidas de control seleccionado es eficaz (CODEX ALIMENTARIUS, 2008).

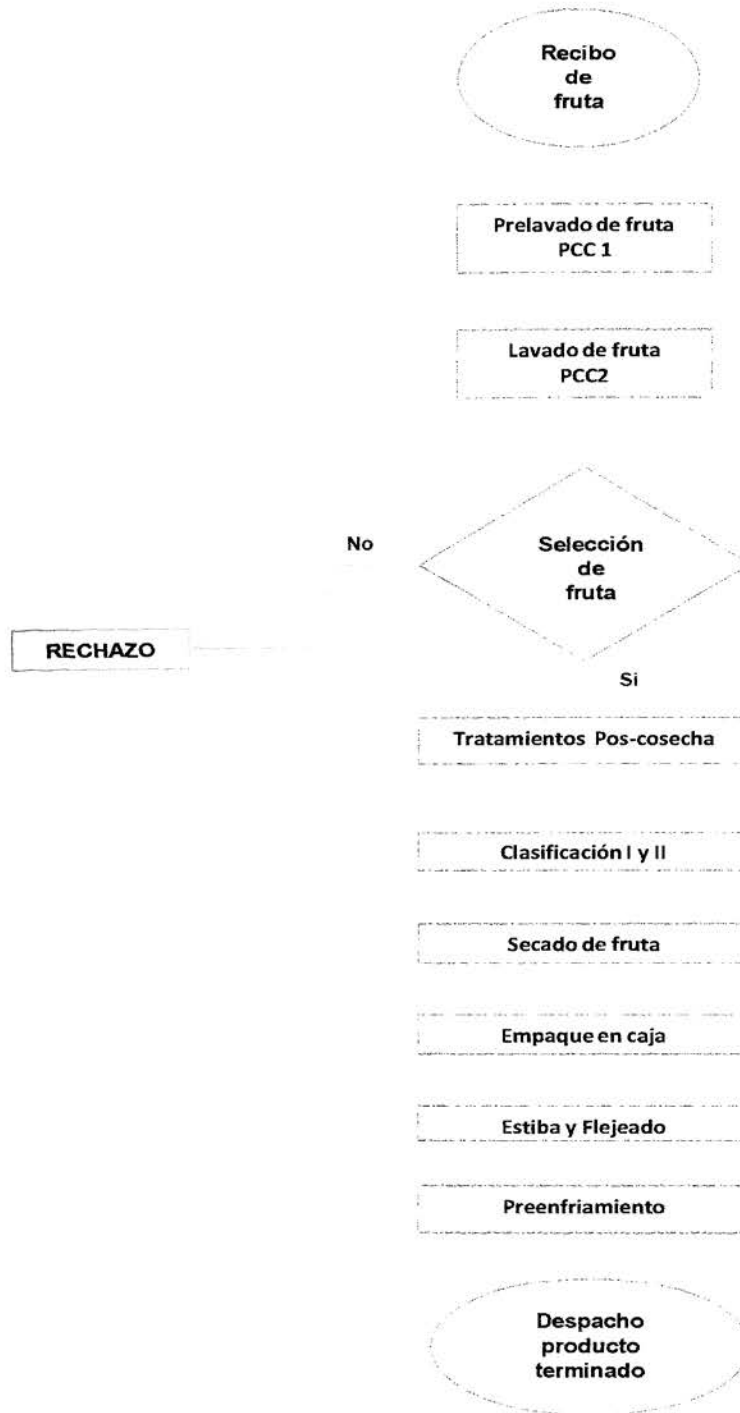


Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de empaque de melón

El agua de lavado se ha convertido en un punto de enfoque para el desarrollo y mejoramiento de los tratamientos de desinfección que buscan reducir la cantidad de microorganismos patógenos que puedan llegar a ser peligrosos para los consumidores de frutas y hortalizas frescas. El lavado es entonces un punto crítico de control, donde si se utiliza el tratamiento adecuado es posible reducir la posibilidad de que el alimento se convierta en transmisor de alguna enfermedad (Pulse Instruments, s.f.; Casteel *et al.* 2008).

Para las etapas del proceso donde se introduzca, potencie o controle un peligro químico, físico o biológico, utilizando el árbol de decisiones de Codex Alimentarius, se determina si esa etapa es o no un punto crítico de control. La etapa de desinfección, es un punto crítico porque en ella se busca reducir al mínimo el potencial de transmisión de microorganismos patógenos, en productos frescos de un lote a otro o entre frutos de un mismo lote. (Suslow, 1998a; Suslow, s.f.).

3.3.2.3. Establecimiento de los Límites Críticos de Control

Los límites críticos de control se establecerán teniendo en cuenta los peligros, así como las condiciones en las que se prevé que el alimento será manipulado y consumido. Los límites críticos deberán tener en cuenta también la probabilidad de ser medidos o registrados (CODEX ALIMENTARIUS, 1997). Para el caso de melón, se determinará al conocer la dosis de desinfectante más efectiva.

Una vez determinado el límite crítico deberá establecerse el procedimiento de monitoreo a seguir, con el fin de prevenir o eliminar un peligro para la inocuidad de los alimentos o reducirlo a un nivel aceptable (FDA, 1998; CODEX ALIMENTARIUS, 2008).

3.3.2.4. Establecimiento de la frecuencia de monitoreo

El monitoreo o vigilancia es el acto de ejecutar una secuencia planeada de observaciones o mediciones de parámetros, para evaluar si una medida se encuentra o no bajo control

(CODEX ALIMENTARIUS, 2008). En el caso del proceso de melón fresco, los parámetros que se monitorean son: pH mediante medidores de pH o cintas tornasol; cloro libre, utilizando colorímetros; potencial de oxidación reducción en milivoltios, con medidores fijos o portátiles de ORP y también temperatura del agua. La frecuencia con la que se llevan a cabo las lecturas generalmente es de una hora.

Tradicionalmente, en el monitoreo de contaminación microbiana se realiza la detección de microorganismos “indicadores” de contaminación fecal. Estos incluyen bacterias coliformes, específicamente la presencia de *Escherichia coli*, la cual habita normalmente solo en el intestino de los humanos o los animales (Chaidez Quiroz, 2002).

3.3.2.5. Establecimiento de acciones correctivas, registro y sistemas de verificación

El equipo HACCP, debe establecer qué correcciones o acciones correctivas deben tomarse y quién debe hacerlo. Además, deben conservarse registros que demuestren el cumplimiento de los procedimientos y el monitoreo sobre el punto crítico de control. Por último, deben existir sistemas o metodologías que permitan verificar el proceso con el fin de asegurar que el plan HACCP es efectivo (Forsythe & Hayes, 2000; ONU, 2007).

3.3.3. Validación de Medidas Preventivas

El Codex Alimentarius (2008) define el término validación como: la obtención de pruebas que demuestren que una medida o combinación de medidas de control, si se aplica debidamente, es capaz de controlar el peligro con un resultado especificado.

Por medio del proceso de validación es que se puede demostrar que las medidas de control elegidas realmente son capaces de lograr, de una manera constante, el nivel previsto de control del peligro (CODEX ALIMENTARIUS, 2008). Es muy importante para el éxito de los sistemas de HACCP evaluar y validar la capacidad de la medida de control, de ser eficaz. En

el caso de peligros biológicos, la validación del sistema HACCP requiere la medición objetiva de esos peligros, de forma que permita asegurar que se logran los niveles de reducción deseados (Dormedy et al. 2000; Scott, 2005).

Un proceso de validación debe seguir las siguientes etapas: decidir el o los enfoques que se aplicarán, definir los parámetros y los criterios de decisión que demostrarán la efectividad y eficacia que tiene una medida o combinación de medidas de control, reunir la información pertinente para la validación, analizar los resultados y documentar y revisar la validación (CODEX ALIMENTARIUS, 2008).

Hay una serie de metodologías para la validación de medidas de control. Estas incluyen el uso de publicaciones científicas, los conocimientos históricos, documentos reguladores, ensayos experimentales, modelos científicos, datos operativos y encuestas (Scott, 2005). La metodología precisa dependerá de: la naturaleza del peligro, la naturaleza de la materia prima y del producto, el tipo de medidas de control o de sistema de control seleccionado para controlar el peligro y del rigor previsto de dicho control (CODEX ALIMENTARIUS, 2008).

Una validación puede obtenerse mediante datos experimentales científicamente válidos que demuestren la idoneidad de la medida de control. Por ejemplo: la demostración cuantitativa y la documentación de la reducción logarítmica de un patógeno concreto mediante un proceso microbicida específico (CODEX ALIMENTARIUS, 2008). Los equipos de procesamiento, control de dispositivos y sistemas de registro electrónico pueden ser validados para asegurar que el sistema lleva a cabo con precisión y fiabilidad el control de los riesgos (Scott, 2005).

Otra metodología común para la validación es llevar a cabo experimentos científicos donde se confirme la idoneidad de la medida de control. Esto puede ser por medio de pruebas de laboratorio que evalúan el efecto de una medida de control o pueden ser trabajos en planta para documentar la detección o la eliminación de un peligro (Scott, 2005).

Probablemente uno de los enfoques más comunes es el uso de publicaciones científicas que documenten la eficacia de una medida de control. Estas publicaciones pueden ser estudios de validación específicos que evalúan el efecto de parámetros definidos en un determinado peligro. Se pueden considerar también los libros que evalúan información que existe al respecto y esquemas de control de parámetros como: las temperaturas mínimas y máximas de crecimiento, valores de pH, de agentes patógenos, también puede ser utilizado como parte de validación (Scott, 2005; CODEX ALIMENTARIUS, 2008)

La industria es responsable de la validación de las medidas de control, mientras que la autoridad competente se asegura de que la industria tenga sistemas eficaces para la validación y de que las medidas de control estén debidamente validadas (CODEX ALIMENTARIUS, 2008).

3.3.3.1. Métodos de Análisis

En 1997 la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), se propuso aprobar una metodología que sirviera para evaluar la efectividad de los diferentes tratamientos desinfectantes. La agencia recomienda hacer los estudios en al menos 5 cepas diferentes de las bacterias más comunes en productos frescos (*Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes*) y considera como razonable obtener una reducción de al menos 2 Log₁₀ UFC/cm² (Beuchat *et al.* 2001).

Cada agente patógeno deben ser cultivado en un caldo estándar o medio de agar a una temperatura específica durante un tiempo determinado. (Beuchat *et al.* 2003; FDA/CFSAN, 2001). Entre los medios selectivos para coliformes destacan: el agar Mc Conkey y el agar bilis rojo violeta; como resultado las bacterias forman colonias de color fucsia; mientras que para *Salmonella* se utiliza agar desoxicolato lisina xilosa (XLD) y las bacterias dan lugar a colonias de color negro (Forsythe & Hayes, 2000).

Cuando el agar se ha solidificado se incuban las placas durante el tiempo que depende del microorganismo estudiado; tanto *Escherichia coli* como *Salmonella spp.* se incuban a 37 °C. Después de la incubación se cuentan las colonias en placas que contienen entre 25-250 colonias; a partir de este recuento pueden calcularse fácilmente el número de bacterias viables por gramo (o por cm²) (Forsythe & Hayes, 2000).

El protocolo para la desinfección química debe incluir la relación peso/volumen del producto y el tratamiento, las concentraciones de cada tratamiento, tiempo, temperatura y el neutralizador usado. Además se deben identificar las condiciones más adecuadas (temperatura y tiempo de exposición) para la aplicación del desinfectante (Beuchat *et al.* 2003; FDA/CFSAN, 2001).

3.4. Lavado y desinfección de frutas y vegetales

El lavado con agua sin clorar o tratada con cloro es una práctica común después de la cosecha, para limpiar y desinfectar los productos agrícolas. Sin embargo, el agua puede ser una fuente de contaminación y un vehículo para la difusión de microorganismos en el campo, la planta de procesamiento, el transporte, medio ambiente y la preparación. El uso de agua con cloro hasta 200 ppm es común para reducir la contaminación microbiana de vegetales (Venkitanarayanan *et al.* 1999; Richards & Beuchat, 2004; Ukuku *et al.* 2005).

Como lavado se define la acción de rociar o sumergir una fruta u hortaliza en agua, con el fin de retirar suciedad que trae del campo. El lavado puede prolongar la vida útil de frutas y vegetales ya que reduce el número de microorganismos en superficie. Sin embargo, sólo una parte de los microorganismos patógenos pueden ser eliminados con este tratamiento (FDA, 1998; Beuchat *et al.* 2001; Buck *et al.* 2003; Umaña & Sáenz, 2004). Lavar los vegetales con agentes desinfectantes es el único paso del proceso que produce una reducción en la cantidad de microorganismos presentes en el producto (Allende *et al.* 2009; Ukuku, 2006).

La desinfección es un proceso diseñado para la inactivación o destrucción de organismos patógenos para proteger la salud pública, así como para el control de hongos con el fin de extender su vida útil. El uso de desinfectantes más eficientes es importante en la cadena de producción de melón (Qiang *et al.* 2005; Rocha Bastos *et al.* 2005).

El término desinfección es definido por la FDA como proceso capaz de destruir o reducir sustancialmente el número de microorganismos que afectan la salud pública, así como otros microorganismos indeseables, sin afectar negativamente a la calidad del producto o la seguridad del consumidor (FDA, 1998; FDA/CFSAN, 2001; Parish *et al.* 2003; Umaña & Sáenz, 2004; ONU, 2007; Casteel *et al.* 2008). También se define como el tratamiento que se aplica al agua de un proceso con el fin de inactivar o destruir bacterias patógenas, hongos, virus y otros microorganismos (Suslow, 2002). El objetivo de la desinfección es evitar la transferencia de estos organismos del alimento al agua o viceversa y entre los productos, de manera que se aumente la probabilidad de que microbiológicamente el producto es seguro para el consumo (Suslow, 2002; Suslow, 2001).

Existen diferentes formas de lavar y desinfectar las frutas y hortalizas, entre ellas la pulverización, lavado o inmersión en agua es una práctica común durante el procesamiento poscosecha (Casteel *et al.* 2008). Algunos autores hablan acerca de utilizar lavado con cepillos para remover físicamente suelo y microorganismos en algunos productos frescos resistentes (Parish *et al.* 2003; FDA/CFSAN, 2001).

Para la desinfección se utilizan tratamientos con productos químicos antimicrobianos, incluidos los productos naturales como aceites esenciales, compuestos biológicos, las enzimas; materiales abrasivos y combinaciones de estos agentes con el lavado. Nuevas tecnologías ofrecen oportunidades para la producción de frutas y hortalizas con niveles muy reducidos de microbios patógenos (Cherry, 1999; Sapers, *et al.* 2002; Walton *et al.* 2008).

De esta forma, la aplicación de un programa adecuado de lavado y desinfección en la planta industrial reduce el número de microorganismos existentes en la superficie de estos

alimentos (Frazier & Westhoff, 1993). Sin embargo, el agua puede transmitir diversos microorganismos patógenos como: *Escherichia coli*, especies de *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, especies de *Shigella*, así como *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Cyclospora cayetanensis* y los virus Norwalk y de la hepatitis. Por lo tanto debe cuidarse la calidad del agua para evitar que esta se convierta en un foco de contaminación (Díaz-Sobac & Vernon-Carter, 1999; Frazier & Westhoff, 1993).

El riesgo de que la desinfección o el lavado no sean efectivos radica en que puede ocurrir un transporte de patógenos de la cáscara a la pulpa cuando se corta la fruta (Annous *et al.* 2004). Otros factores considerados potencialmente importantes, que limitan la eficacia de lavado, es la adhesión de las bacterias a lugares de difícil accesos como: el tronco, las zonas cáliz o heridas en la cáscara, la infiltración de bacterias en el canal del cáliz y la formación de biopelícula (Sapers, *et al.* 2002).

La incapacidad de los desinfectantes más fuertes, incluso para erradicar por completo los patógenos de la superficie de frutas y hortalizas frescas, está bien documentada (Sapers, *et al.* 2005). La información publicada sugiere que los métodos convencionales de lavado y desinfección, incluso utilizando nuevos agentes desinfectantes, no son capaces de reducir las poblaciones microbianas en más de un 99% (Sapers, 2001; Annous, 2007).

La Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) establece que un agente desinfectante o detergente debe tener la capacidad de reducir $\pm 3 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$, para considerarlo eficaz como desinfectante (Dequeiroz & Day, 2007). Algunos autores sugieren que un desinfectante adecuado para procedimientos de desinfección debe dar como resultado una reducción del 99,9% de las poblaciones de microbios (ONU, 2007). Sin embargo, la Guía para Reducir al Mínimo los Riesgos de Seguridad Alimentaria Microbiana de las Frutas y Hortalizas frescas de la FDA (1998) establece que lo ideal sería que la reducción alcanzada por el desinfectante sea de $2 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$ o 99%.

Existen evidencias de que el lavado con soluciones de cloro en concentraciones entre 50 y 200 ppm y por tiempos de 1 ó 2 minutos, solamente pueden conseguir una reducción entre 1-2 Log₁₀ en el recuento de microorganismos como *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* (FDA/CFSAN, 2001; Sapers, 2001; Sapers, *et al.* 2002; Parish *et al.* 2003; Aruscavage *et al.* 2006) (Ukuku, 2006; Araya Rodríguez *et al.* 2008; Casteel *et al.* 2008; Velázquez *et al.* 2009).

Otros autores aseguran que es posible conseguir reducciones superiores, entre 2-3 Log₁₀, si se controla adecuadamente la concentración de cloro y el tiempo de contacto (Ukuku, 2004; Buck *et al.* 2003; PMA, 2005). Por ejemplo, Ukuku & Sapers (2001), reportan una reducción de 3,4 Log₁₀ UFC/cm² de *Salmonella* Stanley HO558, en melones lavados por 5 minutos con una solución de cloro a 1000 ppm, aunque estos niveles de cloro no se permiten a nivel comercial en alimentos, se evaluaron a nivel experimental con la intención de comprobar que las reducciones llegan a mantenerse similares a pesar del incremento de las dosis.

3.4.1. Situaciones que hacen inefectiva la desinfección

El primer paso en la contaminación de los alimentos ocurre cuando el microorganismo entra en contacto con el producto y se adhiere a éste (Liao & Sapers, 2000). Las plantas poseen una cutícula cerosa que hace que sea difícil para los microorganismos introducirse en los tejidos vegetales (Aruscavage *et al.* 2006) (Richards & Beuchat, 2004). No obstante, algunas frutas y vegetales poseen diferente topografía de superficie que ofrece oportunidades mayores a los microorganismos para adherirse e inclusive penetrar más allá de esta, lo que les permite protegerse de los diferentes métodos de lavado y de la acción de productos químicos (Cherry, 1999).

Una serie de factores contribuyen a la adhesión de patógenos entéricos a la superficie de los alimentos, entre ellos: polímeros extracelulares, hidrofobicidad de la superficie, formación de puentes catiónicos divalentes y la carga bacteriana en la superficie (Doyle & Erickson, 2008; Wang *et al.* 2009).

De igual manera, las aberturas naturales y las heridas, son clave para la internalización de los microbios. Las dos aberturas naturales más importante son los estomas y lenticelas. Los estomas tienen como función el intercambio de gases, mientras que las lenticelas se encargan de hidratar o liberar el exceso de líquido en los tejidos (Suslow, 2001; Sapers, *et al.* 2005; Wang *et al.* 2009).

Ya sea porque las bacterias se adhieren a la superficie o porque penetran a través de aberturas naturales o heridas, el riesgo se basa en que una vez formada la biopelícula o internalizada la bacteria, los métodos tradicionales de desinfección se vuelven completamente ineficaces y por tanto la probabilidad de que ocurra una infección o intoxicación alimentaria es mayor (Cherry, 1999; Aruscavage *et al.* 2006; Wang *et al.* 2009).

Ejemplo de esta situación es el melón. Investigadores han demostrado que la superficie de esta fruta permite la formación de biopelículas (Ukuku & Fett, 2002; Richards & Beuchat, 2004; Annous *et al.* 2004; Core, 2005). Ante esta situación la posibilidad de que el patógeno sea llevado al interior de la fruta cuando se corta es muy elevada. Ukuku y Sapers (2001) mostraron que *Salmonella* Stanley se transfiere a los tejidos internos del melón cuando las frutas se cortan en la preparación para el consumo.

3.4.2. Desinfectante

Un agente antimicrobiano es toda sustancia de origen natural, sintético o semi-sintético que en concentraciones bajas mata los microorganismos o inhibe su desarrollo provocando un daño reducido o nulo al organismo huésped (CODEX ALIMENTARIUS, 2003).

Un desinfectante o biocida es un agente químico, usualmente de amplio espectro, que inactiva microorganismos. Debido a que tienen una amplia gama de actividad, existen los que inhiben el crecimiento y son llamados: bacteriostáticos, fungistáticos o esporostáticos. También existen los que matan al microorganismo, llamados bactericida, esporicida o virucida, según sea el caso (McDonnell & Russell, 1999).

El objetivo de la utilización de cualquier desinfectante es destruir los agentes patógenos. Existen diferentes clases de agentes antimicrobianos. Entre los desinfectantes químicos destacan: el cloro, el ácido peracético, el ácido peroxiacético, el peróxido de hidrógeno y el ozono entre otros (Suslow, 2002; Beuchat *et al.* 2001; Mari *et al.* 2004; Walton *et al.* 2008; Velázquez *et al.* 2009; Pulse Instruments, s.f.).

Estos químicos varían en su capacidad para matar microorganismos. La eficacia depende de los tipos de microorganismos, sus mecanismos de fijación y las características físicas de las frutas y hortalizas (fisuras, grietas, hidrofobicidad, textura), tiempo de exposición, concentración del desinfectante, el pH y la temperatura (Cherry, 1999; Seo & Frank, 1999; FDA/CFSAN, 2001; Parish *et al.* 2003; Delaquis *et al.* 2004).

Además, como beneficio los desinfectantes químicos mantienen un cierto efecto residual que es benéfico en caso que el producto esté expuesto nuevamente a patógenos (Ukuku, 2006). Existen además una serie de métodos físicos como: tratamientos térmicos, irradiación, microfiltración o luz ultravioleta, que también tienen acción biocida y que se están investigando actualmente (Suslow, 2002).

3.4.3. Cloro

El cloro es la sustancia desinfectante más común empleada en los programas de saneamiento de productos frescos, básicamente porque es eficaz, de rápida acción, tiene costos relativamente bajos, es relativamente estable en las condiciones óptimas y se puede adaptar a diferentes situaciones de acondicionamiento poscosecha de productos agrícolas. Además, los residuos del tratamiento con aguas cloradas se disipan rápidamente de los productos tratados o son sales inofensivas (Artés *et al.* 2009; Aruscavage *et al.* 2006; FDA/CFSAN, 2001; Sapers, 2006; Parish *et al.* 2003; Qiang *et al.* 2005; Roberts & Reymond, 1994; Sapers, 2001; Sapers, *et al.* 2005; Seo & Frank, 1999; Suslow, 2002; Umaña & Sáenz, 2004; Sapers, 2003a).

El cloro se utiliza habitualmente para la desinfección de verduras como: lechuga, zanahoria, espinacas y frutas como fresas, manzanas, melones (Honey Dew y Cantaloupe) y tomates (Qiang *et al.* 2005). Actualmente en Costa Rica se utiliza el cloro como desinfectante para melón después de la cosecha. Sin embargo, el cloro tiene varias desventajas técnicas y de eficacia frente a muchos patógenos importantes (Araya Rodríguez *et al.* 2008).

El cloro funciona como oxidante dado que extrae electrones fuera de la membrana de la célula, causando que esta se desestabilice, destruyendo la integridad de la membrana celular por lo que esta muere de forma rápida (Suslow, 1998a; Suslow, 2004b). En general se recomiendan dosis de cloro entre 50 y 200 ppm y tiempos de contacto entre 1 y 2 minutos, como resultado se obtiene una reducción de 1-2 Log₁₀ UFC/cm² UFC/cm² (90-99%) del contenido bacteriano en tanques de inmersión o en sistemas de recirculación de agua (Roberts & Reymond, 1994; FDA, 1998; FDA/CFSAN, 2001; Sapers, 2001; Parish *et al.* 2003; Sapers, 2003a; Parnell *et al.* 2005; Sapers, 2006; Casteel *et al.* 2008; Velázquez *et al.* 2009).

Lo que comúnmente se conoce como cloro es realmente una solución que podría llamarse “agua clorinada” donde el principal agente oxidante es el ácido hipocloroso. Es un agente bactericida potente que se obtiene a partir de diferentes agentes liberadores como por ejemplo: el hipoclorito de sodio o calcio, el dióxido de cloro, cloroisocianurato sódico, o directamente inyectando gas cloro (Seo & Frank, 1999; McDonnell & Russell, 1999).

El hipoclorito de calcio es la fuente más utilizada para tratamientos de desinfección. Existen formulaciones registradas de 65% y 68% de ingrediente activo. Está disponible como polvo granulado, tabletas (pastillas) y pastillas de lenta liberación. Se almacena en seco y es más estable que el hipoclorito de sodio líquido (Suslow, 2002; Artés *et al.* 2009). Su uso está aprobado por FDA como una ayuda para el lavado de frutas y hortalizas, tanto en plantas de procesamiento como en los establecimientos de servicio de alimentación (Sapers, 2003b; Parnell *et al.* 2005).

El ácido hipocloroso (HOCl) es la forma de cloro que tiene la mayor actividad bactericida contra una amplia gama de microorganismos. En soluciones acuosas, el equilibrio entre el ácido hipocloroso (HOCl) y el ion hipoclorito (ClO^-) depende del pH, por lo tanto el pH debe regularse y mantenerse siempre en un rango entre 6.5-7.5 (Suslow, 2002; Suslow, 2001; FDA/CFSAN, 2001; Parish *et al.* 2003; Sapers, 2003a; Umaña & Sáenz, 2004; Qiang *et al.* 2005; Artés *et al.* 2009).

Dentro del equilibrio que se forma en la solución de agua clorada se deben diferenciar los términos que se refieren al cloro. En primer lugar existe el cloro libre, activo, reactivo o disponible que se utiliza para describir la cantidad de cloro en cualquiera de las formas disponibles para la reacción de oxidación y desinfección, es decir el ácido hipocloroso principalmente y el ion hipoclorito. El cloro total se refiere a la cantidad de cloro libre y combinado en la solución. Incluye compuestos resultantes de la combinación del cloro con amoníaco o de otras formas menos disponibles del cloro con actividad antimicrobiana débil, como las cloraminas. Existe también el cloro libre residual que es un exceso de ácido hipocloroso más allá de la demanda de cloro. Concentraciones de cloro libre residual entre 2 y 7 ppm son necesarias para garantizar la completa destrucción de microorganismos en el agua (Bartz, 1988; Suslow, 2002; Delaquis *et al.* 2004).

Para obtener los mejores resultados con el agua clorada, se debe tener en cuenta que lo importante es el cloro libre. En pruebas de laboratorio, concentraciones de cloro libre entre 0.2-5 mg/L de agua consiguen inactivar bacterias gram-negativas en cuestión de segundos (Bartz, 1988; Umaña & Sáenz, 2004).

Debido a que algunos patógenos no son fáciles de eliminar mediante el uso del cloro, incluso en condiciones óptimas, es importante iniciar siempre los procesos con agua de calidad (Suslow, 2002). A niveles industriales se recomiendan dosis de cloro libre mayores a las usadas en laboratorio (20-300 veces), debido a que el cloro reacciona con la materia orgánica (Bartz, 1988). Algunas condiciones favorecen la respuesta del cloro entre ellas

adicionar agentes surfactantes aprobados para reducir la tensión superficial del agua, favorecer el contacto mediante mayores tiempos de exposición o concentraciones más altas (Suslow, 2002; Umaña & Sáenz, 2004). Sin embargo, trabajar con los niveles más bajos de cloro es lo más conveniente para reducir los riesgos para la salud debido al potencial de toxicidad y a que puede ser mutágeno o carcinógeno (Delaquis *et al.* 2004).

Como agente aséptico, la adición de cloro reduce significativamente el riesgo de enfermedad en comparación con los tratamientos de solo agua; inclusive procesos donde además de agua clorada se usan cepillos para restregar la fruta logran conseguir reducciones por encima del 90% (Bartz, 1988; Barak *et al.* 2003). Se ha demostrado que puede inactivar bacterias como: *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* en productos vegetales (Seo & Frank, 199; Casteel *et al.* 2008; Selma *et al.* 2008).

Entre las desventajas que tiene el uso de cloro están: es altamente corrosivo, los sistemas de monitoreo tiene poca seguridad, es sensible a la materia orgánica, su efectividad depende de un estrecho rango de pH y puede propiciar la formación de compuestos peligrosos (Roberts & Reymond, 1994).

La formación de compuestos peligrosos es quizá la razón que ha motivado el cuestionamiento de su uso. El cloro gaseoso (Cl_2) puede reaccionar con compuestos orgánicos y formar compuestos potencialmente cancerígenos o mutagénicos (Sapers *et al.* 2001; FDA/CFSAN, 2001; Parish *et al.* 2003; Sapers, 2003b). Además, con su uso solamente es posible alcanzar reducciones de entre 2-3 Log_{10} UFC/cm². Por lo tanto, hay mucho interés en evaluar el uso de desinfectantes más seguros y eficaces para frutas y verduras (Ukuku *et al.* 2005; Ukuku, 2006).

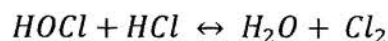
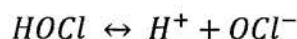
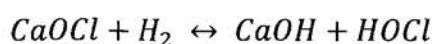
La eficacia del cloro tiene varias limitaciones debido a la rápida caída de su actividad por la presencia de sustancias orgánicas que modifican el pH de la solución. La concentración de HOCl es también significativamente afectada por la temperatura, presencia de materia

orgánica, la luz, el aire, entre otros (Mari *et al.* 1999; FDA/CFSAN, 2001; Parish *et al.* 2003; Artés *et al.* 2009).

Por ejemplo, si la temperatura del agua está muy alta o el pH es inferior a 4, las soluciones de ácido hipocloroso liberan al ambiente gases de cloro que pueden provocar irritación de la piel y las vías respiratorias, de los trabajadores de la planta empacadora. Además las cloraminas que se forman por la reacción del hipoclorito con el amoníaco también pueden producir irritación (Sapers, 2003b).

Entre los factores que afectan la cantidad de cloro activo, el pH de la solución es el principal debido a que el cloro es fuertemente dependiente de él (Suslow, 1998a). Esta dependencia se debe a que en agua el hipoclorito de sodio o calcio se disocia en el ión sodio (Na^+) o calcio (Ca^{+2}) y el ión hipoclorito (OCl^{-2}) y establece un equilibrio con el ácido hipocloroso. Sin embargo, debe controlarse el pH ya que entre 4 y 7 predomina el ácido hipocloroso mientras que por encima de 9 predomina la forma de OCl^{-2} (McDonnell & Russell, 1999).

Cuando el hipoclorito de calcio se disuelve en agua se produce la siguiente reacción:



El mayor poder desinfectante del cloro se presenta cuando se encuentra entre un 95 y un 80% de "cloro libre", que sería a un pH entre 6,5 y 7,0. Este nivel se reduce a menos del 20% con un pH superior a 8.0. De igual manera, en soluciones con pH bajo, el cloro se pierde en forma de gas y aumenta su acción corrosiva. Cuando el pH está muy alto, el cloro reacciona con la materia orgánica formando subproductos como: cloraminas, cloroformo y otros trihalometanos, que se sabe o se sospecha tienen potencial carcinogénico (Suslow, 2002;

Suslow, 1998a; FDA/CFSAN, 2001; Parish *et al.* 2003; Umaña & Sáenz, 2004; Qiang *et al.* 2005; Suslow, s.f.).

Dentro del sistema de gestión de calidad e inocuidad, es importante diseñar un sistema eficaz de adición de ácido, para realizar correcciones de pH. Entre los productos que normalmente se usan para mantener el pH del agua clorinada entre 6,5-7,5, están el ácido clorhídrico (HCl) o el ácido cítrico (C₆H₈O₇) (Suslow, 2002; Suslow, 1998^a; Umaña & Sáenz, 2004; Suslow, s.f.).

La presencia de materia orgánica y tierra reducen la cantidad de cloro activo presente en la solución. Es muy importante considerar esta situación para garantizar la eficacia del tratamiento. Se deben incluir medidas que tiendan sobre todo a reducir la presencia de estos elementos de forma que se evite el constante reforzamiento de las aguas con más cloro. Entre las posibilidades que existen están: cambiar el agua periódicamente, utilizar filtros para retirar la materia orgánica, incluso realizar un lavado previo puede prolongar la utilidad del agua de cloro (Suslow, 2002; Umaña & Sáenz, 2004; Delaquis *et al.* 2004).

La temperatura es también un factor importante a considerar. Su regulación es más difícil, pero se sabe que al aumentar la temperatura incrementa la actividad del cloro, pero también se favorece la pérdida en forma de gas cloro y no es lo mejor para los productos agrícolas; por el contrario, si las temperaturas son bajas, como la que se usan en los tratamientos de hidrogenfrío, se reduce la eficacia del cloro. Sin embargo, debe monitorearse debido a la posibilidad que existe de que ocurra infiltración (Umaña & Sáenz, 2004).

Los agentes a base de cloro son oxidantes muy activos capaces de destruir las proteínas celulares de los microorganismos. Entre los efectos que producen los agentes clorados están: deterioro del ADN bacteriano, interrumpir la fosforilación oxidativa y otras actividades asociadas con la membrana celular (McDonnell & Russell, 1999).

Distintas investigaciones han comprobado que el ácido hipocloroso inhibe el crecimiento de *Escherichia coli* y la síntesis de ADN en un 96%, pero la síntesis de proteínas solamente en un 30% como máximo. Puesto que concentraciones menores a 260 ppm no inducen una alta reducción de la síntesis de proteínas, se infiere que el mecanismo de acción principal del compuesto es interrupción de la síntesis de ADN (McDonnell & Russell, 1999).

Por otra parte, debido a que la solución de agua clorada se debe manejar a niveles controlados de pH, se sabe que un pH ácido afecta de dos maneras diferentes a las células bacterianas, primero alterando el funcionamiento de las enzimas y segundo alterando el transporte de nutrientes hacia la célula (Jay *et al.* 2005).

La cloración es eficaz en la reducción del contenido de microorganismos en el agua, pero su eficacia depende de la cantidad de cloro libre presente (Rushing *et al.* 1996; Mari *et al.* 2004). Para mejorar la eficiencia del cloro es importante controlar el potencial de oxidación-reducción (ORP) y el pH (6,5) en el agua y utilizar estos valores para el control (Sapers, 2001).

Los patógenos también varían en su sensibilidad a los desinfectantes. Por ejemplo, *Listeria monocytogenes* es generalmente más resistente al cloro que *Salmonella spp.* y *Escherichia coli O157: H7* (Buck *et al.* 2003).

Los niveles de productos químicos antimicrobianos deben ser monitoreados y registrados de forma rutinaria para asegurar que se mantienen en las concentraciones adecuadas. Otros parámetros como: pH, temperatura y potencial de reducción de la oxidación (ORP) que indican los niveles de agentes activos o que afectan a la eficacia de los antimicrobianos utilizados, también deben ser monitoreados y registrados (FDA, 1998; Sapers, 2006).

Tradicionalmente la efectividad del tratamiento con cloro se evalúa mediante métodos cuantitativos como la lectura en partes por millón (ppm) de total o libre (Suslow, 1998a). El cloro libre puede ser medido por medio de un equipo de valoración o colorímetro específico para el cloro libre el cual se basa en el reactivo DPD (N, N-dietil-p henylenediamine) que

funciona principalmente para medir, por colorimetría, el cloro reactivo. Con mayor frecuencia en los procesos se utilizan kits de papel para medir la concentración de cloro total y pH (Suslow, 2002; Suslow, 2001; Umaña & Sáenz, 2004).

En los últimos años se ha introducido la lectura del potencial de oxidación-reducción (ORP), como un método de control y registro fácil de los procesos de desinfección (Suslow, 1998a; Suslow, 2004b; Sapers, 2003a; Umaña & Sáenz, 2004; Suslow, s.f.). Este término se refiere a la actividad o fuerza que poseen los agentes oxidantes o reductores en una solución (Myron L Company, 2008).

Los sistemas ORP fueron estudiados por primera vez en 1936 en la Universidad de Harvard. Estos estudios demostraron una fuerte correlación entre el ORP y la actividad bacteriana. Estas pruebas fueron confirmadas por estudios sobre agua potable y de piscinas en otras zonas del mundo. En 1971, la Organización Mundial de la Salud (OMS) aprobó la medición de 700 mV como un estándar para agua potable. Además, en 1982, la Agencia de Normas Alemana aprobó niveles de ORP de 750 mV como ideal para piscinas públicas y en 1988 el Instituto Nacional de Piscinas aprobó 650 mV para los balnearios (Myron L Company, 2008).

El potencial de oxidación/reducción se mide en milivoltios (mV) a través de un sensor pequeño de platino que es capaz de acumular carga sin sufrir ninguna reacción química. Al igual que el pH, no es una medición de la concentración del agente oxidante directamente, sino del nivel de actividad de éste (Venkitanarayanan *et al.* 1999; Sapers, 2006; Myron L Company, 2008).

Por otra parte, cuando la variación en la concentración del desinfectante se traduce en una variación en el pH de la solución, esto se refleja en las lecturas del ORP debido a que aumenta o disminuye el poder oxidativo. A un pH de 6.5 la concentración de cloro libre es mayor y esto se refleja en un aumento del potencial de oxidación (mV) mientras que en medios alcalinos baja la concentración de cloro libre y hay menos potencial de oxidación (Suslow, 1998a; Suslow, 2004b).

Una de las principales ventajas de la utilización del ORP como sistema de monitoreo para procesos de desinfección en agua, es que proporciona un valor único y rápido del potencial de desinfección del agua en un tratamiento poscosecha. Con ello el sistema es capaz de evaluar la actividad del desinfectante aplicado y no la dosis de éste. Debe ser tomado como una ventana de operación y no como un punto fijo. Las lecturas pueden variar en $\pm 25\text{mV}$ especialmente en medidores de mano o por el movimiento del agua en los lectores fijos. (Suslow, 2004b; Suslow, s.f.).

Como desventaja, los sistemas ORP deben tener un sistema de mantenimiento muy controlado, de lo contrario se deterioran rápidamente. Debe existir siempre un sistema de calibración, sondas de repuesto y programas de limpieza (Suslow, 2004b; Suslow, s.f.).

Por medio de la investigación se ha determinado que un valor entre 650 a 750 mV permite que las soluciones con los desinfectantes trabajen mejor para la eliminación de bacterias patógenas de los productos agrícolas y bacterias patógenas a humanos como *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en un corto tiempo. Incluso se esperarían reducciones similares si se mantiene el potencial redox de 750-850 mV (Suslow, 1998b; Sapers, 2001; Sapers, 2003a; Umaña & Sáenz, 2004; Suslow, 2004b; Parnell *et al.* 2005).

3.4.4. Alternativas al cloro

La incapacidad de los métodos tradicionales de desinfección para erradicar por completo de la superficie de frutas y hortalizas frescas los patógenos, está bien documentada (Sapers, *et al.* 2005).

De igual manera una creciente preocupación por la inocuidad microbiológica de los productos frescos, unido a la sospecha de que se restrinja el uso del cloro, ha generado un amplio interés por el desarrollo de agentes desinfectantes alternativos, entre los que se mencionan el dióxido de cloro, ozono y ácido peroxiacético (Sapers, 2001; Sapers, 2003b; Selma *et al.* 2008).

En los últimos años se han realizado estudios para examinar la eficacia del cloro, el peróxido de hidrógeno, el ozono y el ácido peroxiacético entre otros, en la inactivación de bacterias como *Escherichia coli* O157:H7 en productos frescos (Deza *et al.* 2004; Wang *et al.* 2009). Con el uso de estos agentes alternativos se consigue una reducción de la población microbiana de entre un 90-99% que es una reducción importante más no total (Sapers, 2003b).

3.4.4.1. Dióxido de cloro

El dióxido de cloro (ClO_2) es un gas estable en disolución, tiene un fuerte poder bactericida y virucida, desinfecta las superficies y previene o elimina rápidamente los biopelícula (Beuchat *et al.* 2005; Sapers, 2006; Artés *et al.* 2009). Ha tenido resultados exitosos en la reducción de la carga microbiana en diferentes clases de vegetales como: cítricos, manzanas, chiles verdes y diferentes clases de bayas (Richardson *et al.* 1998; Mahovic *et al.* 2006). Es un gas de color amarillo-rojizo, que tiene un potencial de oxidación 2.5 veces mayor que el gas cloro y explosivo a concentraciones mayores al 10% de ingrediente activo o a temperaturas superiores a los 130 °C (Suslow, 2002; Artés *et al.* 2009).

De igual manera, inhibe la síntesis de proteínas, además en concentraciones altas es esporicida. Tiene la capacidad de descomponer compuestos fenólicos, cianuros, sulfuros y mercaptanos de aguas residuales y no reacciona con el amoníaco (McDonnell & Russell, 1999; Beuchat *et al.* 2005; Zoffoli *et al.* 2005). Reacciona directamente con los aminoácidos y el ARN de la célula, pero no está claro si se ataca la estructura celular o los ácidos en del interior. Evita la producción de proteínas y afecta la membrana de la célula porque produce cambios en lípidos y proteínas (Artés *et al.* 2009).

Entre las ventajas que posee este compuesto por encima del cloro están: su poder oxidante es de aproximadamente 2,5 veces superior (Parish *et al.* 2003; Beuchat *et al.* 2005), es menos afectado por el pH (5-10) (Mari *et al.* 1999; Beuchat *et al.* 2005; Zoffoli *et al.* 2005), es más estable en solución (Mari *et al.* 1999), no es corrosivo (Mari *et al.* 1999), no se ioniza

para formar ácidos débiles, compuestos halogenados o para formar subproductos cancerígenos como los trihalometanos (Parish *et al.* 2003; Artés *et al.* 2009).

El dióxido de cloro se inactiva con la materia orgánica, aunque en menor grado que otros compuestos de cloro (Mari *et al.* 1999; Beuchat *et al.* 2005; Roberts & Reymond, 1994). Otras de sus desventajas son: es más caro (Mari *et al.* 1999), es muy inestable en el almacenamiento (FDA/CFSAN, 2001; Parish *et al.* 2003), dosis elevadas podrían causar fitotoxicidad en heridas superficiales de los vegetales (Mahovic *et al.* 2006) y por último los subproductos de su reacción (clorito y clorato) pueden crear problemas en pacientes sometidos a diálisis (Artés *et al.* 2009).

El dióxido de cloro es muy eficaz, en un tiempo de contacto mínimo, contra organismos patógenos como *Legionella*, quistes de amebas, quistes de *Giardia lamblia*, *Escherichia coli* y *Cryptosporidium spp.* (Artés *et al.* 2009). Ejemplo de ello la investigación de Mari *et al.* (1999) donde se obtuvieron resultados de inhibición en la germinación de conidios con soluciones de dióxido de cloro a 100 mg/ml, independientemente de la duración de la inmersión.

Se demostró también que el dióxido de cloro tiene mayor actividad biocida por microgramo por mililitro, contra bacterias y levaduras comparado con otros agentes desinfectantes como: hipoclorito de sodio, yodo, compuestos de amonio cuaternario, sin embargo aún no ha sido aprobado por la FDA para su uso en alimentos (Roberts & Reymond, 1994).

3.4.4.2. Clorito de sodio acidificado

Dentro de la industria alimentaria, es una práctica común aplicar el clorito en forma acidificados o como un precursor para el dióxido de cloro. Esta acción contribuye a inactivar los microbios a través de disrupción de la membrana en combinación con la inhibición de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. En la forma no acidificada, el clorito tiene

relativamente bajo poder oxidante, y por lo tanto el modo de inactivación de las células es probable que difiera (Kumar *et al.* 2007).

Investigaciones han demostrado la eficacia del clorito de sodio acidificado. La FDA aprobó sus uso en dosis entre 0,5-1,2 g/L para la inactivación de patógenos como: *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella spp.* Sin embargo, este tratamiento tiene un impacto negativo sobre la calidad organoléptica de frutas y vegetales (Allende *et al.* 2009).

En la investigación de Parish *et al.* (2003) los autores citan que como resultado de un análisis científico realizado por Park y Beuchat en 1999 se demostró que clorito de sodio acidificado tiene un efecto antimicrobiano importante sobre *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella spp.* inoculados en Cantaloupes, Honey Dews y espárragos. Ellos obtuvieron una reducción alrededor de 3 Log₁₀ UFC/cm². De igual manera se ha probado una mezcla de clorito de sodio y ácido cítrico, que resulta más soluble que el hipoclorito de sodio y con alrededor de 2,5 veces más capacidad de oxidación que el ácido hipocloroso (Allende *et al.* 2009).

3.4.4.3. Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ha sido sugerido como una alternativa para desinfectar frutas y hortalizas frescas. Numerosos estudios experimentales han demostrado su eficacia en la ampliación de la vida útil y la reducción de las poblaciones microbianas naturales y patógenas en productos como: uvas, ciruelas, manzanas, naranjas, melones, tomates, chiles y lechuga (McDonnell & Russell, 1999; Sapers, 2003b; Sapers, 2006).

Aunque el peróxido de hidrógeno está clasificado por la FDA como GRAS para determinadas aplicaciones en alimentos específicos, las actuales regulaciones de la FDA no permiten su uso como agente de lavado, excepto cuando se usa en concentraciones bajas, en combinación con ácido acético para formar ácido peroxiacético y cuando la fruta o vegetal no vaya a consumirse crudo (Sapers, 2001; Sapers & Sites, 2003; Sapers, 2003b; Sapers, 2006).

Se le considera un desinfectante ecológico porque se degrada rápidamente a productos inocuos: oxígeno y agua. Es efectivo contra virus, bacterias, levaduras y esporas. En general, se observa una mayor actividad contra bacterias gram-positivas que gram-negativas (McDonnell & Russell, 1999; Sapers, 2001).

Es un líquido claro e incoloro que está comercialmente disponible en una variedad de concentraciones que van del 3 al 90% (McDonnell & Russell, 1999). Actúa como agente oxidante no discriminador que ataca directamente el ADN, las proteínas y los lípidos, a pesar de que las membranas de las bacterias permanecen intactas, es capaz de generar otros citotóxicos oxidantes como radicales hidroxilo (FDA/CFSAN, 2001; Sapers, 2003b; Parish *et al.* 2003; Qiang *et al.* 2005; Kumar *et al.* 2007; Artés *et al.* 2009).

El peróxido de hidrógeno tiene baja toxicidad, no es un veneno sistémico o mutagénico, sin embargo los vapores que emana pueden causar inflamación de las vías respiratorias. Las soluciones diluidas (1-10%) son seguras a temperatura ambiente (Sapers, 2003b). En algunos vegetales el uso de peróxido de hidrógeno es perjudicial debido a que daña su apariencia externa (Sapers, 2001).

La actividad esporicida de peróxido de hidrógeno junto con la rápida degradación en agua y oxígeno, lo hace un desinfectante conveniente para su uso en superficies en contacto con alimentos (FDA/CFSAN, 2001; Parish *et al.* 2003; Qiang *et al.* 2005). Los niveles que se manejan para el uso en alimentos oscilan en concentraciones entre 0,04-1,25%. Para determinar concentraciones de H₂O₂ entre 1-10% existen cintas reactivas que permiten medir la concentración del producto en la solución (Sapers, 2003b).

El autor Sapers (2002) (2003b) realizó una serie de estudios en donde comprobó que si se utiliza peróxido de hidrógeno en sistemas de lavado con cepillo la reducción de la población es menor a 1 Log₁₀ UFC/g. Además, agrega que el producto es al menos tan eficaz como el lavado con cloro y, a diferencia del último, no deja residuos potencialmente peligrosos.

3.4.4.4. Ácido peracético

El ácido peracético se considera un potente esporicida, bactericida, virucida, fungicida, en concentraciones bajas hasta 0,3%; tiene una mayor estabilidad, es más rápido, no depende del pH y tiene menor toxicidad. Además, cuenta con la aprobación de la FDA y en se descompone en productos seguros ácido acético y oxígeno (Mari *et al.* 1999; McDonnell & Russell, 1999).

El ácido peracético resulta efectivo para inactivar agentes patógenos que están presentes en la solución de lavado, para evitar la contaminación cruzada. Actúa desnaturalizando las proteínas y enzimas celulares, además aumenta la permeabilidad de la pared celular debido a que altera los enlaces de azufre (McDonnell & Russell, 1999; Hopkins & Thompson, 2003).

La eficacia del ácido peracético como desinfectante para uso en productos frescos no se ha investigado a fondo (Parish *et al.* 2003; FDA/CFSAN, 2001). Aún así algunas investigaciones sugieren que *inhibe la germinación de conidios*, el grado de inhibición depende de la concentración del producto y el tiempo de contacto. Los mejores resultados se observaron con ácido peracético a 1mg/ml y un tiempo de exposición de al menos 2 min (Mari *et al.* 1999).

3.4.4.5. Ácido peroxiacético

El ácido peroxiacético es una mezcla de peróxido de hidrógeno y ácido peracético que en los últimos años ha sido probada como desinfectante, debido a que estos compuestos no se consideran perjudiciales para el ambiente. Es efectivo en la reducción de bacterias y sus esporas, hongos y levaduras (Cherry, 1999; Briñez *et al.* 2006; Sapers, 2006; Artés *et al.* 2009).

Actualmente se aplica para la limpieza de superficies en concentraciones que van desde 85 a 300 ppm y la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) ha establecido un mínimo de

85 ppm de ácido peracético para limpiar superficies donde se manipulen productos alimenticios (Sapers, 2003b; Artés *et al.* 2009).

Debido a que el ácido peroxiacético tolera factores como: temperatura, pH (de 1 a 8), dureza del agua y la presencia de materia orgánica, su principal área de aplicación es en el sector de frutas y hortalizas. Para el tratamiento de la superficie de frutas o verduras, se recomienda combinar formulaciones 11% peróxido de hidrógeno y 15% de ácido peracético a 80 ppm, seguido de lavado con agua potable (Artés *et al.* 2009).

3.4.4.6. Compuestos de amonio cuaternario

Los compuestos de amonio cuaternario pueden proporcionar un tratamiento eficaz en la eliminación de bacterias, sin afectar la integridad estructural del producto. El modo de acción de estos compuestos en general implica una inactivación de las enzimas productoras de energía, desnaturalización de las proteínas celulares esenciales y la ruptura de la membrana celular. En bajas concentraciones, son bacteriostáticos y en altas concentraciones, son bactericidas (FDA/CFSAN, 2001; Parish *et al.* 2003; Walton *et al.* 2008; Velázquez *et al.* 2009).

Estos compuestos son surfactantes catiónicos inodoros, incoloros, estables a altas temperaturas, no corrosivos, no irritantes para la piel y capaces de penetrar en contacto con alimentos más fácilmente que otros desinfectantes. Su actividad antimicrobiana es mayor contra hongos y bacterias gram-positivas que contra bacterias gram-negativas. De esta forma *Listeria monocytogenes* es más sensible a los amonios cuaternarios que *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* o *Pseudomonas spp.* (Parish *et al.* 2003; FDA/CFSAN, 2001).

Los compuestos de amonio cuaternario no están aprobados aún para su uso directo en productos frescos y su utilidad es limitada, ya que serían útiles solo para frutas u hortalizas que deban ser peladas antes de consumirlas (Parish *et al.* 2003; FDA/CFSAN, 2001; Cherry, 1999).

Ejemplo de amonio cuaternario es el cloruro de benzalconio, agente antimicrobiano sintético ampliamente usado como desinfectante en el tratamiento de líneas de proceso y superficies en la industria alimentaria; a la vez que como antiséptico y desinfectante en centros de salud y hogares. Su capacidad de agente tensoactivo proporciona una gran capacidad de penetrar y adherirse a superficies porosas. Tiene actividad sobre los biopelícula creados por las bacterias. En sus resultados Velázquez *et al.* (2009) obtuvo que dosis de 0,1mg/ml de cloruro de benzalconio aplicadas al lavado de tomates redujo la población de *Escherichia coli* O157:H7 en 2,06 Log₁₀.

De igual manera el cloruro de cetilpiridina (CPC), es un surfactante catiónico, con carga positiva, que reduce la tensión superficial del agua en superficies hidrofóbicas. Su fórmula molecular es C₂₁H₃₈NCl, tiene un peso molecular es 340. El CPC es un ingrediente común en enjuagues bucales, pastas de dientes y pastillas para la garganta (Singh *et al.* 2005; Beers *et al.* 2006; Bai *et al.* 2007; Araya Rodríguez *et al.* 2008).

A principios de 2004, el CPC fue aprobado por la FDA para su uso en las canales de aves precongeladas (Singh *et al.* 2005) (Bai *et al.* 2007) (Araya Rodríguez *et al.* 2008). Canales consideradas visiblemente contaminadas, pero tratada con CPC tuvieron significativamente conteos más bajos de todos los organismos evaluados. Se obtuvo una reducción entre 2-2,5Log₁₀ en el recuento de mesófilos aerobios; entre 1,2-1,6Log₁₀ de reducción en *Escherichia coli* y una reducción de 0,6-1,2Log₁₀ en coliformes y *Campylobacter spp.* (Beers *et al.* 2006; Singh *et al.* 2005).

3.4.4.7. Compuestos yodados

Los compuestos yodados son una combinación de yodo elemental y agentes tenso-activos no iónicos, utilizados como desinfectantes para alimentos y equipos en la industria (Parish *et al.* 2003; FDA/CFSAN, 2001).

Cabe mencionar que estos compuestos están aprobados para el contacto directo con alimentos. No obstante su aplicación es limitada debido a que puede ocurrir una reacción entre el yodo y el almidón del vegetal que da como resultado un color azul-morado, inadecuado para la calidad visual (Parish *et al.* 2003; FDA/CFSAN, 2001).

El yodo es bactericida, fungicida, viricida y esporicida, tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana. Estos compuestos llamados también yodóforos, son menos corrosivos que el cloro a bajas temperaturas y son menos volátiles e irritantes para la piel que otros tipos de soluciones (McDonnell & Russell, 1999; FDA/CFSAN, 2001; Parish *et al.* 2003).

La acción antimicrobiana del yodo es rápida, incluso en bajas concentraciones, pero el modo de acción exacto se desconoce. El yodo penetra rápidamente dentro de los microorganismos y ataca los principales grupos de proteínas, nucleótidos y ácidos grasos, que conllevan a la muerte celular (McDonnell & Russell, 1999).

3.4.4.8. Ozono

El uso de agua ozonizada se ha sugerido como una alternativa interesante, debido a su eficacia en bajas concentraciones y tiempos de contacto cortos, además no produce residuos tóxicos (Richardson *et al.* 1998; Smilanick *et al.* 1999; Selma *et al.* 2008; Artés *et al.* 2009).

En 1997, un panel de expertos examinó la seguridad y el potencial de uso del ozono en el procesamiento de alimentos y lo declaró GRAS para aplicaciones de contacto con alimentos (Smilanick *et al.* 1999; Selma *et al.* 2008; Artés *et al.* 2009).

El ozono es un tratamiento eficaz para inactivar bacterias, hongos, virus y protozoos en el agua para hacerla potable (FDA/CFSAN, 2001; Parish *et al.* 2003). Es una molécula inestable de tres átomos de oxígeno (O₃), formado por la adición de un átomo de oxígeno a una molécula biatómica (Artés *et al.* 2009).

El ozono se caracteriza por ser un reactivo muy fuerte, de alta penetración y su espontánea descomposición a oxígeno gaseoso lo hace viable para su uso como desinfectante de alimentos (Qiang *et al.* 2005). Actúa como un oxidante fuerte muy efectivo, es casi insoluble en agua y su actividad desinfectante no se ve afectada por niveles de pH entre 6 y 8 (Suslow, 2002). Destruye los microorganismos mediante la oxidación de los componentes vitales de la célula, evitando el crecimiento microbiano y ampliando la vida útil en muchas frutas y verduras (Artés *et al.* 2009).

El ozono puede provocar corrosión en metales y otros equipos de procesamiento, tiene un costo elevado, es difícil de medir y controlar en medios donde la carga orgánica es elevada (Suslow, 2002; FDA/CFSAN, 2001; Parish *et al.* 2003). Debido a su fuerte actividad oxidante, el ozono puede causar daños fisiológicos en los productos frescos (Parish *et al.* 2003; FDA/CFSAN, 2001).

Su uso como agente antimicrobiano ha sido poco estudiado, sin embargo algunos autores han reportado su capacidad en la inactivación de bacterias patógenas en algunos productos vegetales (Parish *et al.* 2003; FDA/CFSAN, 2001). Por ejemplo Qiang *et al.* (2005) aseguran que el ozono ha sido estudiado para inactivar bacterias como: *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* en diferentes alimentos como: lechuga, pimienta negra en grano y molida, sidra de manzana y jugo de naranja, manzanas, fresas, melón, pepinos, repollo y carne de res.

3.4.4.9. Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos pueden poseer capacidad bactericida. La acción antimicrobiana de los ácidos orgánicos se debe a la reducción del pH en el medio ambiente, la interrupción del transporte y permeabilidad de la membrana, la acumulación de aniones y una reducción en el pH celular interno por la disociación de los iones de hidrógeno del ácido (Parish *et al.* 2003; FDA/CFSAN, 2001; Sapers, 2006; Velázquez *et al.* 2009).

Muchos tipos de productos, especialmente frutas, naturalmente poseen concentraciones significativas de ácidos orgánicos como el acético, benzoico, ácido cítrico, málico, sórbico, succínico, tartárico, que afectan negativamente a la viabilidad de las bacterias contaminantes (Parish *et al.* 2003; FDA/CFSAN, 2001). Diferentes concentraciones de ácido láctico solo o en combinación con otros productos químicos han demostrado ser eficaces en la eliminación de bacterias patógenas (Velázquez *et al.* 2009).

3.4.4.10. Métodos físicos de desinfección

La aplicación de agua caliente o vapor de agua en la superficie de frutas y hortalizas frescas pueden utilizarse para pasteurizar el producto siempre que la transferencia de calor sea capaz de llegar a los sitios donde se adhieren los microorganismos (Sapers, 2001; FDA/CFSAN, 2001; Parish *et al.* 2003; Ukuku, 2006; Annous, 2007).

El uso de agua caliente resulta más efectivo en la reducción de patógenos que el uso de desinfectantes químicos. No obstante el tratamiento con calor produce efectos adversos sobre el color, textura y sabor lo cual limita la utilidad del tratamiento. Puede ser útil en productos frescos precortados o jugos no pasteurizados, donde la apariencia exterior pierde importancia (FDA/CFSAN, 2001; Sapers, 2001; Parish *et al.* 2003; Ukuku, 2006).

Para el caso de melón, el uso de agua caliente como método para descontaminar resulta más eficaz que el lavado. La inmersión en agua caliente consigue reducciones significativas ($\geq 5 \text{ Log}_{10}$ UFC) en la población de *Salmonella spp.* cuando la fruta fue tratada a 76 °C durante 3 minutos. Los melones toleran tratamientos cortos de agua caliente sin sufrir daños y manteniendo su vida útil (Sapers, 2001; Annous *et al.* 2004; Annous, 2007).

Otras condiciones térmicas que favorecen la reducción de patógenos en melón son: la exposición a la luz natural en condiciones de baja humedad, según Suslow (2004a) reduce en un 99% las células viables de microorganismos. Mantener la cadena de frío puede

disminuir el crecimiento de microorganismos en la superficie de melón (Annous *et al.* 2005b).

La irradiación es también una opción para reducir o eliminar la contaminación en frutas y hortalizas. Tratamientos con una dosis media, es decir de 1 a 10 kGy, pueden reducir poblaciones microbianas incluyendo patógenos de alimentos. La letalidad de la irradiación depende de cual sea el objetivo (insectos o microorganismos), las condiciones del producto y de factores ambientales. Cabe señalar que los productos tratados con dosis por encima del nivel de 1 kGy no pueden utilizar el término "fresco" (Parish *et al.* 2003; FDA/CFSAN, 2001).

Por otra parte el tratamiento con luz ultravioleta ofrece varias ventajas a los procesadores de alimentos, ya que no deja ningún residuo, no tiene restricciones legales, es fácil de usar y es letal para la mayoría de los tipos de microorganismos y no requiere un gran equipo de seguridad que deben aplicarse. Sin embargo, se necesita más investigación para optimizar su uso (Artés *et al.* 2009).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización del proyecto

El proyecto se desarrolló en dos sitios diferentes. Las pruebas de desinfección, infiltración y análisis microbiológicos se hicieron en el Laboratorio de Microbiología del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), en la Universidad de Costa Rica. Las pruebas de registro y levantamiento de información se hicieron en la planta empacadora de melones en Finca La Cueva, ubicada en Liberia, Guanacaste.

4.2. Empresa donde se realizó el proyecto

Finca La Cueva pertenece a la empresa Corporación de Desarrollo Agrícola Del Monte S.A. Está ubicada al norte de la ciudad de Liberia en la provincia de Guanacaste; geográficamente se localiza $10^{\circ}41'38''$ latitud norte y $85^{\circ}29'40''$ longitud oeste. Esta finca se ha dedicado principalmente a la producción y exportación de melón (*Cucumis melo*) principalmente del tipo Cantaloupe, aunque también ha cultivado otras clases de melón como Galia, Honey Dew y Harper.

4.3. Materiales

4.3.1. Pruebas de registro

Se trabajó con los equipos de medición utilizados y suministrados por la empresa. Un colorímetro COLORQ Pro7 Código 2056 de la empresa LaMotte para las lecturas de cloro libre. Además, un medidor del Potencial de Oxido-Reducción (ORP), marca Ultrameter™, modelo 3P, de compañía MYRON L Company, para las lecturas de Oxidación-Reducción en el agua de la pila.

También se utilizó un registrador de pH de la marca Spectrum Technologies, Inc. en las mediciones de pH en laboratorio y un medidor de la marca Hanna Instruments, modelo HI98128 que se utilizó en los registros in situ de pH y temperatura del agua de lavado. De

igual manera, un termómetro digital de sonda, resistente al agua, modelo Flash Check® 11063 de la marca Delta Trak, para la mediciones de la temperatura de pulpa.

4.3.2. Pruebas de laboratorio

Se utilizaron melones Cantaloupe de primera calidad y con un tamaño similar (1,5 kg, 14 y 15 cm de diámetro ecuatorial y polar, respectivamente). Para la preparación de las disoluciones de desinfección se utilizó hipoclorito de calcio al 68% HTH® y baldes plásticos de 10 litros, para simular la desinfección por inmersión. Los desinfectantes alternativos usados fueron Cecure®, Tsunami®100, Des46®, IOFEC®20 PLUS y Kilol® DF-100, tal como se describen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Descripción de los desinfectantes a utilizados

| Nombre Comercial | Ingrediente Activo | Dosis a Evaluar | Fabricante | Distribuidor Local |
|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------|------------|--------------------|
| CECURE® | Cloruro de cetilpiridinio (CPC) | 0,5% | SAFE FOODS | GLOBAL KEMICAL S.A |
| TSUNAMI®100 | Ácido Peracético | 80 ppm | ECOLAB | ECOLAB C.R. |
| DES46® | Peróxido de Hidrógeno | 1% | ECO2CLEAN | FERTINAZEL S.A |
| IOFEC®20 PLUS | p-nonilfenil polietoxietanol | 5 ml/L | LAQUINSA | TRISAN AGRO |
| KILOL® DF-100 11SL | Extracto de semillas de cítricos | 2,5 ml/L | CITROBIO | AGROPRO |
| HIPOCLORITO DE CALCIO HTH® 68% | Hipoclorito de calcio | 200 ppm | ARCH | ARCH |

En el caso de la inoculación y recuento se utilizó Agar MacConkey y Agar XLD como medio de cultivo, Peptona Bacteriológica para el agua peptonada, tiosulfato de sodio ACS, Tween 80 y Lecitina granular como neutralizantes. Además, se utilizó placas Petri plásticas, bolsas Stomacher y puntas para micropipetas, tablas de cortar, cuchillos y tenedores estériles, micropipetas y demás cristalería de laboratorio necesaria. Como inóculo se utilizó *Escherichia coli* ATCC 25922, como cepa de estudio porque no es toxigénica, y *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 (cepa patógena).

En todos los casos, el método de inoculación que se utilizó fue demarcar un área de 25 cm² (5 cm X 5 cm) donde se colocó el inóculo. Una vez aplicados los tratamientos respectivos, se extrajo el área inoculada y se procedió a determinar el recuento o la reducción logarítmica, en la pulpa o la cáscara, según fuese el caso. Autores como Annous *et al.* (2005a) explican que se puede inocular la fruta completa o solamente una parte, según sus investigaciones en melón, los resultados obtenidos son similares para ambos métodos.

4.4. Metodología

4.4.1. Determinación del límite crítico de temperatura en la etapa de lavado

Se utilizaron los registros de temperatura de pulpa y agua de lavado existentes. En total, las últimas ocho temporadas en el caso de la fruta y de los últimos dos años en el caso de la temperatura del agua de lavado. Estos provienen de la información que registra diariamente el personal de control de calidad de la planta empacadora.

Además, se utilizó el histórico de temperatura ambiental de la región, como comparativo para los resultados obtenidos. Los datos ambientales se tomaron de la página web del Instituto Meteorológico Nacional, específicamente de los datos que se recopilan en la estación ubicada en el Aeropuerto Internacional Daniel Oduber (10°35 N; 85°32 O y altitud 80 msnm), la más cercana al lugar.

La medición de temperatura de pulpa se realizó con un termómetro digital de sonda. El protocolo para medición en melón establece que la sonda debe introducirse en la pulpa entre 2-3 cm y se debe dejar que la lectura del termómetro se estabilice. El muestreo se hace en el momento en que un nuevo lote de melón llega a la planta y antes de someter la fruta al proceso. Se muestrean diez frutas de cada lote y la hora dependerá del momento de ingreso del lote al proceso.

Con estos datos se pretendió determinar si existen diferencias en la temperatura de pulpa del melón dependiendo del mes del año en que se coseche, con el fin de establecer si existe un mes crítico. De esta forma se puede definir un límite crítico para la temperatura máxima de pulpa y asociar estos resultados con los obtenidos en los apartados 4.2. y 4.3.

La temperatura del agua de lavado se determinó a través de un medidor de pH que adicionalmente registra la temperatura de la solución; la lectura se tomaba cada hora durante la jornada de trabajo, ya que es la frecuencia con la que se monitorean todos los parámetros relacionados con la solución de lavado y desinfección. Esta información se utilizó para establecer un diferencial de temperatura entre solución de lavado y la fruta.

Los datos de temperatura de pulpa y temperaturas de agua de lavado se organizaron por medio de un diseño irrestricto al azar. En el caso de la temperatura de pulpa con ocho repeticiones y cinco tratamientos, mientras que para el agua de lavado fueron dos repeticiones y cinco tratamientos. Las temporadas representan las repeticiones del diseño y los tratamientos los meses que conforman la cosecha anual. Los resultados obtenidos, para ambos casos, se analizaron individualmente por medio de un histograma de distribución de frecuencia, que permitió determinar la temperatura de pulpa máxima en todas las temporadas y con ello se pudo establecer el límite crítico para la temperatura de la pulpa.

De igual manera, este análisis permitió identificar la temperatura mínima de la solución de lavado y desinfección. Con esta información, fue posible determinar el diferencial de

temperatura (ΔT) máximo que podría ocurrir entre la solución de lavado y la de la fruta y con esta información definir los parámetros a evaluar en los apartados 4.2. y 4.3.

En el caso de la temperatura de pulpa, se aplicó un análisis de varianza para medir el efecto del mes sobre la temperatura del melón, con el objetivo de establecer si existen diferencias significativas en la temperatura debida a los meses. Cuando se presentaron diferencias significativas se realizó una prueba de comparación de medias Tukey para determinar el mes crítico. Para este análisis estadístico se utilizó el programa JMP 5.0.1 y se trabajó con un nivel de significancia α igual a 0,05.

4.4.2. Determinación cualitativa de los posibles puntos de infiltración de microorganismos en melón.

Se colocaron 10 melones enteros y sanos en una incubadora a 45°C hasta que alcanzaron dicha temperatura. Una vez logrado lo anterior, se procedió a sumergir los melones en agua a 20°C adicionada con 50ml de azul de metileno (en una relación de 8 litros de agua por melón), por 10 minutos (máximo tiempo que permanecen en la pila de lavado en la Planta Procesadora de Finca La Cueva).

Una vez terminado el período de inmersión y para evaluar cualitativamente los puntos de infiltración, los melones se partieron cuidadosamente, realizando cortes meridionales del pedúnculo hacia la cicatriz floral. Los cortes se hicieron fina y cuidadosamente con el fin de determinar como positiva la infiltración si había presencia de coloración azul en algún punto al menos 3 mm de pulpa debajo de la cáscara.

4.4.3. Determinación del efecto de la temperatura de la pulpa sobre la infiltración inmediata de Salmonella en melón.

Se utilizó la cepa de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, la cual se creció a partir de un cultivo congelado en Caldo Infusión Cerebro Corazón con un 15% de glicerol en agar XLD, el

cual se incubó por 48 h a 35°C. De este cultivo se tomó una azada y se inoculó un tubo con Caldo Tripticasa Soya que se dejó incubando por 18 horas a 35°C. Este nuevo cultivo se utilizó para inocular la zona más propensa a infiltración en el melón determinada en la sección 4.2. Para ello se aplicaron 100 µl del inóculo por microgoteo con una micropipeta, en un área demarcada de 25 cm².

El recuento de este cultivo utilizado para inocular se determinó por plateo por vaciado. Para ello se tomó 1 mL del inóculo y se realizaron 7 diluciones decimales, las cuales se platearon en agar XLD incubando por 48 horas a 35°C.

La inmersión se realizó respetando la proporción que simula la relación entre el volumen de la pila y la fruta, es decir, un volumen de 8 litros de agua para melones de 1,5 kg aproximadamente.

Se utilizó un diseño irrestricto al azar de 3 tratamientos representados por 3 temperaturas de pulpa diferentes (15°C, 30°C y 45°C) y con 5 repeticiones para cada tratamiento. Se tomó un melón inoculado, el cual fue sumergido en agua de lavado a 30 °C por 10 minutos. Lo mismo se realizó con un melón para temperaturas de pulpa de 15°C y 45°C, y de igual manera para cada una de las repeticiones.

Luego de la inmersión por 10 minutos, de cada melón se cortó un trozo asépticamente, por los bordes exteriores a la zona inoculada. A este trozo se le removió cuidadosamente la cáscara donde se colocó el inóculo. El trozo de pulpa restante se colocó en una bolsa estéril con una solución de 225 mL de agua peptonada y se homogenizó. Posteriormente se realizaron diluciones decimales hasta 10⁻⁶ utilizando agua peptonada. Se montó por vaciado y por duplicado cada dilución utilizando agar XLD. Las placas se incubaron durante 48 horas a 35 °C y se procedió a realizar la lectura.

A los resultados del recuento de *Salmonella* se les realizó un análisis de variancia (ANDEVA) con el fin de determinar si el factor temperatura influye sobre la infiltración y el recuento.

Se aplicó la prueba de comparación de promedios de Tukey para evaluar las diferencias de recuento para las tres temperaturas. Para este análisis estadístico se utilizó el programa JMP 5.0.1 y se trabajó con un nivel de significancia α igual a 0,05.

4.4.4. Determinación del efecto de la temperatura de la pulpa sobre la infiltración de Salmonella sp en melón después de 48 horas de almacenamiento.

Se utilizó el mismo diseño y se siguió el mismo procedimiento descrito en la sección 4.3., excepto que luego de la inmersión por 10 minutos, los melones se colocaron en refrigeración a 4 °C por 48 horas.

Después de cumplidas las 48 horas en refrigeración, cada melón se cortó asépticamente, por los bordes exteriores a la zona inoculada, hasta obtener el trozo del melón cuya cáscara fue inoculada.

4.4.5. Comparación de la reducción microbiológica de Escherichia coli con 5 productos desinfectantes.

Para reproducir las condiciones del proceso se siguió el esquema de proceso que se describe a continuación:

Lavado de la fruta: Se hizo simulando la etapa de lavado de la fruta y se utilizó agua potable por un tiempo de tres minutos y medio para retirar la materia orgánica que trae la fruta del campo.

Secado: las frutas se dejaron secar al ambiente para poder realizar la inoculación.

Preparación del inóculo: se utilizó una cepa de *Escherichia coli* ATCC25922, la cual se conserva congelada en Caldo Cerebro Corazón con 10% de glicerol. La cepa se descongeló a 5°C y se pasó a un tubo de ensayo con caldo nutritivo. La cepa se incubó a 37°C por 24 o 48 horas hasta que recuperó las características originales. Una vez alcanzada esta condición,

la cepa se rayó en una placa con agar estándar y se incubó a 37°C por 16 horas. Luego se preparó un patrón McFarland de 0,5 (patrón de turbidez conocida) que equivale a una carga aproximada de 1×10^8 UFC, utilizando agua salina al 0,85%.

Determinación de la carga inicial, recuento de la cepa: Se tomó 1 mL del inóculo y se realizaron 7 diluciones decimales. Cada dilución se montó por duplicado en agar estándar, según la metodología descrita para recuento total por el Bacteriological Analytical Manual (FDA, 1998).

Inoculación: Una vez que se conoció la carga inicial del inóculo, se realizó la inoculación de la fruta, ésta se hizo en un área de 25 cm² que previamente se demarcó. Para ello se colocaron 100 µL del inóculo como microgotas que fueron distribuidas uniformemente en el área demarcada y se dejó secar al ambiente.

Desinfección: Se simularon las condiciones de desinfección de la empresa. Para ello se determinó la relación entre volumen de la solución desinfectante y la cantidad de melón. Dicha relación se estableció en 8 litros de solución para melones con un peso aproximado de 1,5Kg. Esta relación se conservó en todas las pruebas a realizar y se hizo la desinfección por inmersión. Además, en el caso de los desinfectantes alternativos, se respetó el tiempo de contacto y la concentración recomendados por el proveedor de cada producto. Los tratamientos evaluados se describen en el Cuadro 2. También se unificaron las condiciones de pH y temperatura, para todos los tratamientos. Estos parámetros se mantuvieron en 6,5 y 25°C respectivamente.

Recuento de *Escherichia coli*: Se cortó el área demarcada de 25 cm² de la cáscara de la fruta con un bisturí estéril y se colocó en una bolsa estéril. Se agregaron 225 mL de solución de agua peptonada neutralizante y se homogenizó. Se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-6} utilizando agua peptonada. Se montó por vaciado y por duplicado cada dilución utilizando agar Mac Conkey. Las placas se incubaron durante 24 horas a 44,5°C y se procedió a realizar la lectura.

Reducción conseguida: Se calculó la reducción lograda por cada desinfectante evaluado. Para ello, al recuento inicial en $\text{Log}_{10}/\text{cm}^2$ se le restó el recuento final en $\text{Log}_{10}/\text{cm}^2$.

Se siguió un diseño irrestricto al azar, donde cada uno de los desinfectantes fue un tratamiento y con cinco repeticiones de cada uno. Los resultados obtenidos para cada uno de los tratamientos, con respecto a reducción microbiológica, se evaluaron con un análisis de varianza para determinar si existen diferencias en las reducciones debidas al tipo de desinfectante. Se utilizó una prueba de comparación de medias de Tukey para comparar las reducciones en el caso de que hubiese significancia. Para el análisis estadístico se utilizó en programa JMP 5.0.1 y se trabajó con un nivel de significancia α igual a 0,05.

Cuadro 2. Tratamientos a evaluar como desinfectantes alternativos

| Tratamiento | Desinfectantes | Concentración y tiempo |
|-------------|----------------|------------------------|
| 1 | CLORO | 200 ppm/15s |
| 2 | TSUNAMI 100 | 80 ppm/15 s |
| 3 | DES46 | 1%/15 s |
| 4 | CECURE | 0.5% /15 s |
| 5 | KILOL | 2.5 ml/L/15 s |
| 6 | IOFEC | 5ml/L/15 s |

4.4.6. *Determinación del límite crítico de concentración de cloro en la etapa de desinfección*

Para reproducir las condiciones del proceso, se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado 4.5. (a-g). En el caso del cálculo de la reducción de *Escherichia coli* lograda para cada concentración de cloro, al recuento inicial en $\text{Log}_{10}/\text{cm}^2$ se le restó el recuento final en $\text{Log}_{10}/\text{cm}^2$.

Para este objetivo se siguió un diseño irrestricto al azar con cinco repeticiones y siete tratamientos; el tiempo de contacto para cada tratamiento fue de 15 s (es el tiempo promedio que permanece la fruta en la pila de desinfección). Los tratamientos evaluados fueron 7 diferentes concentraciones de cloro, utilizando 0 ppm como testigo absoluto y aumentando hasta llegar a 200 ppm de cloro libre que es el límite permitido por la FDA; además se incluyeron 5 ppm y 20 ppm ya que estos valores son, respectivamente, el límite crítico y operacional que se utiliza actualmente. Al final se evaluaron: 0 ppm, 5 ppm, 20 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm y 200 ppm de cloro libre en la solución.

Los resultados obtenidos para reducción microbiológica con cada una de las concentraciones de cloro, se evaluaron a través de un análisis de varianza, para establecer la significancia de la concentración sobre la reducción de *Escherichia coli*. Se utilizó una prueba de separación de medias de Tukey para comparar las reducciones en el caso de que hubiese significancia. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Jump 5.0.1 y se trabajó con un nivel de significancia α igual a 0,05.

Adicionalmente, de manera preliminar se incluyó una evaluación de la reducción de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, siguiendo el mismo procedimiento del apartado 4.5. (a-g), excepto en el apartado c donde se utilizó la descripción del apartado 4.3 (a). La reducción se calculó de igual manera que para *Escherichia coli*.

En este caso se aplicó un diseño irrestricto al azar con cinco repeticiones y tres tratamientos; el tiempo de contacto para cada tratamiento fue de 15 segundos. Los tratamientos evaluados fueron tres diferentes concentraciones de cloro, utilizando 0 ppm como testigo absoluto, 100 ppm como concentración media y 200 ppm de cloro libre que es el límite permitido por la FDA.

Los resultados obtenidos para reducción microbiológica con cada una de las concentraciones de cloro, se evaluaron a través de un análisis de varianza, para establecer la significancia de la concentración sobre la reducción de *Salmonella Typhimurium* ATCC

14028. Se utilizó una prueba de comparación de medias de Tukey para comparar las reducciones en el caso de que hubiese significancia. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Jump 5.0.1 y se trabajó con un nivel de significancia α igual a 0,05.

4.4.7. Determinación de la frecuencia de monitoreo del cloro libre y de dosificación de cloro.

Para este ensayo se tomaron lecturas de cloro libre (ppm) de la pila de desinfección de la planta procesadora. Se iniciaron las lecturas antes de que arrancara el proceso y se terminó cuando no se registró cloro en la solución o al final del proceso. La frecuencia entre estas mediciones fue de 10 minutos a partir del momento de inicio. Durante la evaluación, se procuró mantener el pH dentro del rango que se recomienda en la literatura 6–7. Para ello se realizaron aplicaciones de ácido cítrico cuando los niveles de pH eran mayores de 7.

Para la lectura del cloro libre, se utilizó el equipo colorímetro COLORQ Pro7 Código 2056. Este equipo tiene capacidad para medir cloro libre hasta 10 ppm. En condiciones normales, tanto la pila de prelavado como la de lavado se mantienen en niveles superiores, razón por la cual fue necesario hacer una dilución de 1 en 10 para las mediciones de cloro libre.

Una vez efectuada la dilución se siguió el procedimiento correspondiente para el equipo. Se colocó la muestra en el tubo de ensayo y éste se insertó en el Color Q y se apretó el botón para encender el equipo. Cuando aparecieron las letras bLA (en la pantalla) se presionó el botón una vez más, para que el equipo llevara a cabo la calibración del blanco. Una vez que el equipo midió el blanco aparecieron las iniciales FCL (free chlorine). En este momento se retiró el tubo de ensayo y se añadieron los reactivos, primero 5 gotas del reactivo 1A y después 5 gotas del reactivo 1B. Seguidamente se tapó el tubo y se agitó 3 veces, se volvió a colocar el tubo en el Color Q y se presionó el botón para obtener la lectura de cloro libre. El resultado obtenido se multiplicó por 10, porque se realizó una dilución de 1 parte de la muestra en 10 partes de agua destilada.

En este caso se siguió un diseño irrestricto al azar donde los tratamientos fueron los diferentes tiempos de lectura (cada 10 minutos) y las repeticiones los días en que se hicieron las mediciones. En total se realizaron seis repeticiones de esta prueba, una vez a la semana por espacio de seis semanas. A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de regresión para determinar el tiempo en que se agota el cloro y para el análisis estadístico se utilizó el programa JMP 5.0.1. Además, se trabajó con un nivel de significancia α igual a 0.05.

4.4.8. Determinación de la correlación entre milivoltios medidos con ORP y cloro libre medido con Colorímetro

Para este ensayo se tomaron lecturas de cloro libre (ppm) y potencial de óxido/reducción (mv) de la pila de desinfección de la planta procesadora. Se iniciaron las lecturas antes del arranque del proceso y se terminó hasta que se agotara el cloro o finalizara el proceso. La frecuencia entre estas mediciones fue de 10 minutos a partir del momento de inicio y las lecturas se hicieron de manera simultánea, tomando una muestra del agua de la pila que sirvió para las dos mediciones.

Lectura de cloro libre: se hizo igual que como se cita en el apartado 4.7.

Lectura del potencial de oxidación - reducción: Para esta lectura se utilizó en equipo Ultrameter™ modelo 3P. Este dispositivo tiene una cavidad que contiene el electrodo que hace la lectura. En esta cavidad se colocaron 5 gotas de la muestra tomada de la pila de desinfección. Una vez colocada la muestra se encendió el equipo y se esperó a que la lectura se estabilizara para registrarla (entre 30 y 45 segundos).

En este caso se siguió un diseño irrestricto al azar donde los tratamientos fueron los diferentes tiempos de lectura y las repeticiones los días en que se hicieron las mediciones. En total se realizaron seis repeticiones de esta prueba, una vez a la semana por espacio de seis semanas. Los datos obtenidos se evaluaron mediante un análisis de correlación de

datos ORP vs Cloro libre, para determinar si existe asociación entre ambas lecturas y poder recomendar cual se debe utilizar o si se puede predecir una midiendo la otra. Para el análisis estadístico se utilizó el programa JMP 5.0.1. y se trabajó con un nivel de significancia α igual a 0,05.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Determinación del límite crítico de temperatura en la etapa de lavado

Una vez analizados los registros acumulados por la empresa, fue posible establecer parámetros de referencia para las pruebas posteriores (Cuadro 3). Entre ellos, la temperatura de pulpa máxima alcanzada durante ocho años fue de 45,7°C, mientras que en el agua de lavado el registro mínimo en dos años fue de 20,1°C, por lo que es posible establecer un ΔT máximo de 25,6°C. Sin embargo, en el mismo cuadro es posible identificar que en promedio la variación de las temperaturas de pulpa y agua de lavado no es estadísticamente diferente.

Cuadro 3. Temperaturas máximas, promedio y mínimas de pulpa y agua de lavado, registradas in situ entre 2006 – 2014. Finca La Cueva, Liberia, Guanacaste.

| Parámetros | Temperatura °C | |
|-----------------|----------------|----------------|
| | Pulpa de Melón | Agua de lavado |
| Máximo | 45,7 | 30,0 |
| Promedio | 29,0 | 26,7 |
| Mínimo | 15,5 | 20,1 |

Al realizar el histograma de frecuencia para los registros de temperatura de pulpa (Figura 2), fue posible establecer que la mayoría de los valores registrados se mantienen entre los 20 y 40°C, solamente un porcentaje muy bajo, cercano al 5%, ronda los extremos superior e inferior.

En caso de que ocurriesen en conjunto los extremos de ambas condiciones, este 5% podría representar un peligro para la inocuidad de la fruta; por tanto, los controles de la temperatura de pulpa y del agua de lavado se consideran y sugieren como necesarios para prevenir situaciones de riesgo, a través de medidas que minimicen el peligro.

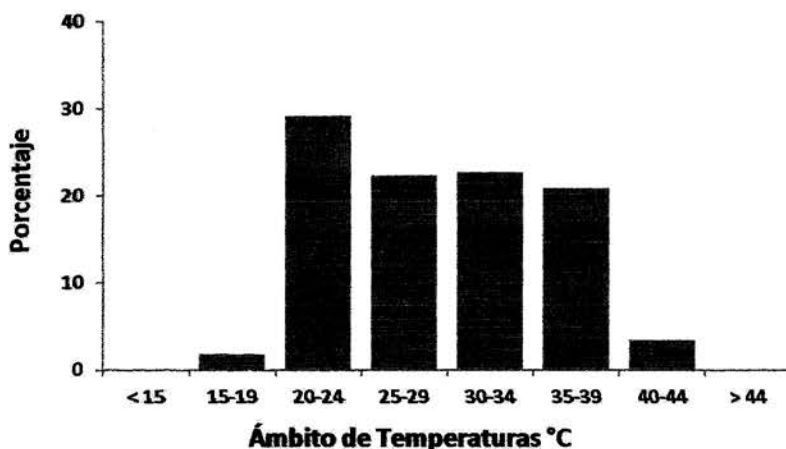


Figura 2. Histograma de frecuencia, para distribución de la temperatura de pulpa del melón, tipo Cantaloupe, cosechado en Finca La Cueva, Liberia, Guanacaste entre 2006 – 2014.

De acuerdo con el análisis de varianza realizado y como se muestra en la Figura 3 y el Cuadro 4, para los registros de temperatura de pulpa, el mes de abril es significativamente diferente a enero, febrero y marzo, registrando las temperaturas más altas de la temporada; por tanto, es posible considerarlo como crítico en el proceso de lavado y desinfección del melón.

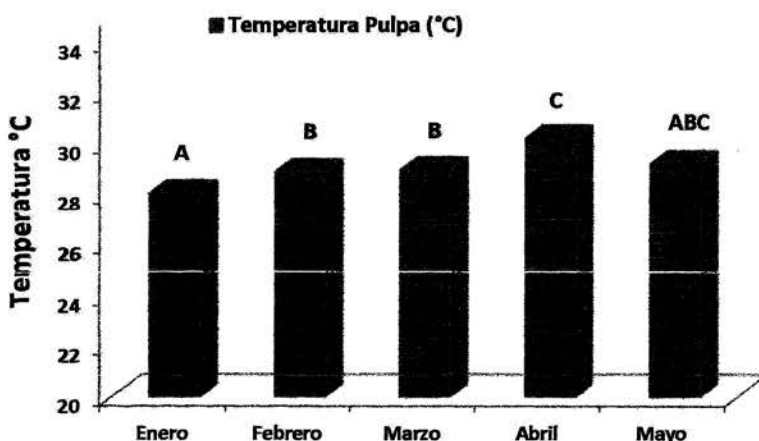


Figura 3. Promedio mensual de temperatura de pulpa, melones tipo Cantaloupe cosechados en Finca La Cueva, Liberia, Guanacaste; entre 2006 – 2014.

Es importante mencionar que el mes de mayo no es estadísticamente diferente a ninguno de los meses; no obstante, los registros correspondientes a este mes pertenecen mayoritariamente a los primeros cinco días del mes, debido a que la ventana de exportación de melón se cierra entre los últimos días de abril y los primeros de mayo, por lo que los días de mayo que se coseche y empaque melón también deben considerarse críticos para temperatura, al igual que el mes de abril.

Cuadro 4. Promedio mensual de temperaturas de pulpa, para melón tipo Cantaloupe en Finca La Cueva, Liberia, Guanacaste; entre 2006 – 2014.

| Mes | Temperatura de Pulpa °C ^{a,b} |
|---------|--|
| Enero | 28,073 ± 0,004 ^A |
| Febrero | 28,905 ± 0,004 ^B |
| Marzo | 28,983 ± 0,004 ^B |
| Abril | 30,214 ± 0,004 ^C |
| Mayo | 29,23 ± 0,01 ^{ABC} |

^a Promedios ± IC al 95%

^b Promedios con letras distintas son significativamente diferentes ($\alpha=0,05$)

Si se compara la información analizada con los datos reportados en el sitio web del Instituto Meteorológico Nacional, Figura 4, es posible confirmar que los registros de la finca coinciden con los datos nacionales, siendo los meses de marzo y abril los más calientes y, por tanto, críticos para el tema de infiltración. Nuevamente, el promedio del mes de mayo registrado difiere del reportado a nivel nacional, porque solamente se cosecha melón durante los primeros días del mes.

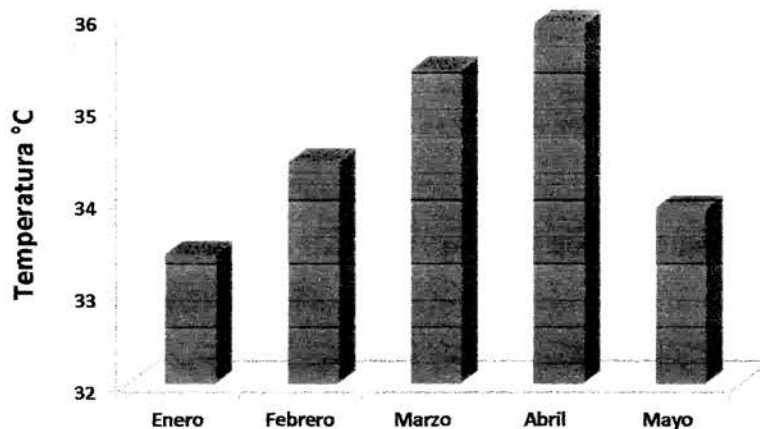


Figura 4. Temperatura máxima mensual para la zona de Liberia, reportada por el Instituto Meteorológico Nacional. Estación meteorológica del Aeropuerto Daniel Oduber Quirós: 10°35 N; 85°32 O y altitud 80 msnm. Liberia, Guanacaste.

Debido a que durante los meses de abril y mayo la temperatura de pulpa en el melón podría sobrepasar los 40°C, especialmente en horas cercanas al medio día, es fundamental que se monitoree cuidadosamente la temperatura en las pilas de lavado de fruta, para establecer si el diferencial térmico favorecería o no la infiltración en esta época. Por esta razón, la temperatura de pulpa debe considerarse como crítica y, por tanto, deben tomarse medidas preventivas que minimicen o reduzcan el riesgo, principalmente durante los meses de abril y mayo. Acciones que permitan proteger al producto de la radiación y controles estrictos sobre la temperatura del agua de lavado, podrían ser útiles. Por ejemplo: cubrir las carretas que transportan la fruta con sarán u otros materiales que minimicen la exposición de los melones a la radiación.

5.2. Determinación cualitativa de los posibles puntos de infiltración de microorganismos en melón.

Esta prueba se realizó con la intención de determinar los posibles puntos de infiltración de bacterias patógenas al interior de la fruta. Para ello se definió un ΔT extremo de 25°C,

basado en los resultados de temperaturas máximas de pulpa y mínima de la solución de lavado, obtenidos y descritos en el apartado anterior (Cuadro 3).

Previamente se evaluó la forma de sumergir y mantener sumergido el melón y también el tiempo requerido para que la fruta alcanzara los 45°C en la incubadora. En la incubadora solamente se podían introducir 5 melones, por lo que fue necesario realizar tres evaluaciones diferentes (4-4-2) ya que en todos los casos era necesario introducir una fruta adicional para monitorear la temperatura de pulpa. La fruta que se utilizó de testigo, mantuvo un termómetro de sonda dentro de la pulpa, hasta que la misma alcanzó 45°C.

La evaluación del lavado de cada fruta se hizo individualmente, para evitar que el tiempo de espera alterara la temperatura de los otros melones. Para mantener la temperatura del agua, constantemente en 20°C se aplicaba hielo para evitar que la temperatura subiera por encima de lo deseado y se mantuvo una lectura constante, utilizando un termómetro permanentemente.

Una vez aplicado el tratamiento a todos los melones, se procedió a realizar cortes meridionales, en espera de presencia de coloración azul en la pulpa, de acuerdo con lo que sugieren autores como Buck *et al* (2003), Kader (2002) y Sapers *et al.* (2005), quienes han evaluado diferenciales de temperatura similares en frutas y verduras intactas y han comprobado el paso de bacterias cuando la temperatura del producto es más alta que la del agua donde se sumerge. Específicamente Sapers *et al.* (2005), realizaron un estudio en mangos que comprobó que ocurre infiltración cuando esta fruta es enfriada en agua a 22°C, por diez minutos, después de haber recibido un tratamiento térmico con agua a 46° C. Este experimento se hizo también utilizando una solución colorante.

Los resultados obtenidos en los melones evaluados se contraponen a los de los investigadores citados. En este caso, ninguna de las frutas evidenció coloración azul en al menos 3 mm de profundidad de pulpa, después de aplicado el tratamiento. La Figura 5 permite ilustrar la coloración que adquirió la fruta externamente.

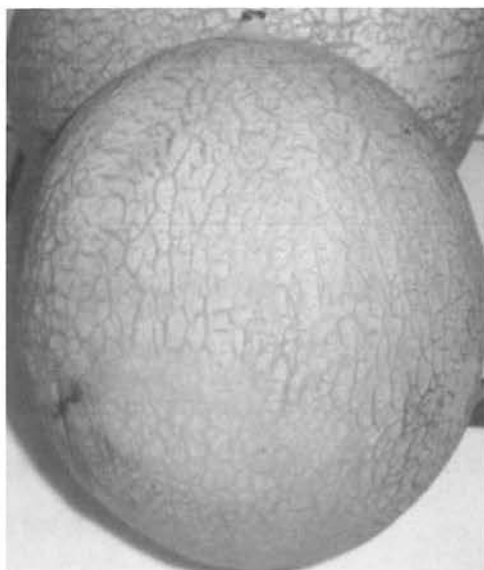


Figura 5. Melón después de la inmersión en agua adicionada con 50ml de azul de metileno.

Solamente una de las 10 frutas mostró una leve coloración azul a través del pedúnculo, pero dicha coloración se dio a una profundidad que no fue mayor a 1 mm. La Figura 6 compara la fruta positiva con una de las negativas. La diferencia podría deberse a que el melón presentaba una condición conocida entre los productores como "cracking".

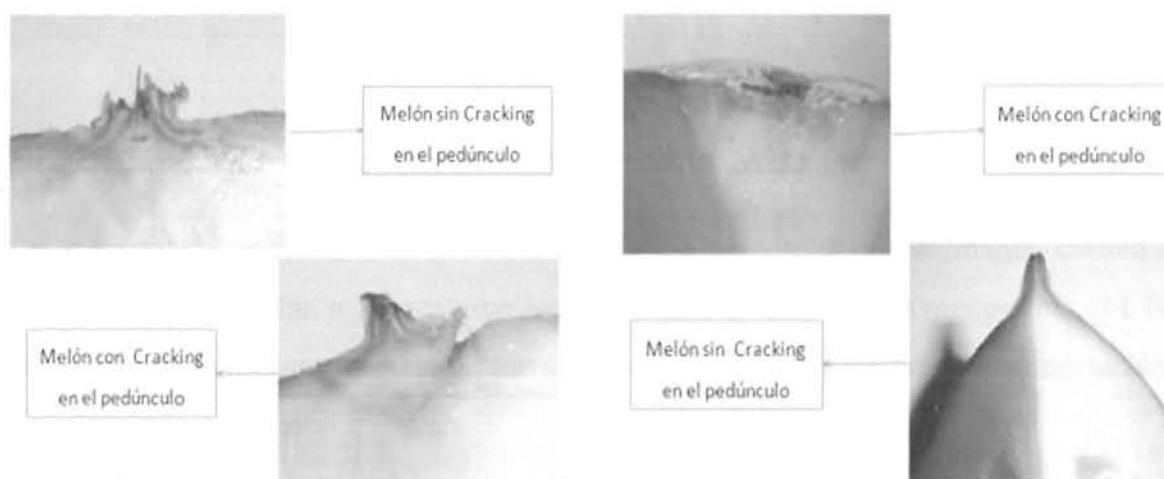


Figura 6. Penetración de azul de metileno a través del pedúnculo en melón con "cracking".

Sapers *et al* (2005) explican que ciertos tipos de melones se agrietan cuando se acercan a la madurez. Las células vivas debajo de la grieta se desarrollan en una estructura corchosa similar a la red y este tipo de áreas o estructuras favorecen la adhesión e internalización de microorganismos.

El término “cracking” se utiliza para describir una cicatriz que se forma alrededor del pedúnculo del melón, la cual se va abriendo poco a poco hasta que la fruta se desprende totalmente de la planta. El cracking se valora, generalmente, dentro de una escala de grado de 1 a 5, donde 1 sería ausencia de cracking y 5 desprendimiento completo del pedúnculo. La Figura 7 muestra algunos de los grados de cracking.

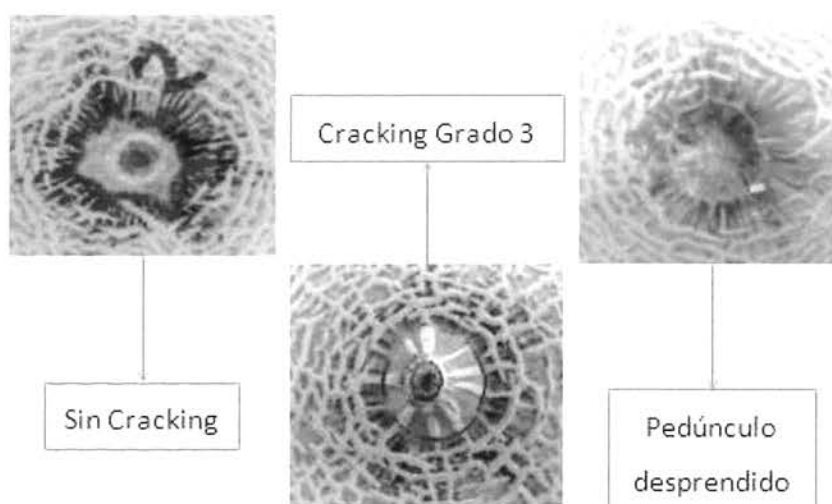


Figura 7. Ilustración de tres diferentes grados de cracking.

Para exportación, melones con grados mayores a 3 se consideran de menor calidad o rechazo pues evidencian madurez excesiva y, por tanto, tendrían una menor vida útil. En este caso, la fruta presenta cracking grado 4, por lo que no se consideraría para exportación, pero sí para mercado local.

Este único resultado cualitativo podría relacionarse con lo que citan autores como Buck *et al* (2003), Sapers *et al* (2005) y Selma *et al* (2008) cuando afirman que las bacterias patógenas son capaces de internalizarse en los productos frescos a través de grietas o

fisuras pequeñas en el producto. Lo anterior debido a que la suspensión acuosa a la que se expone el producto en etapas de lavado o desinfección favorece la movilización de microorganismos al interior de la fruta y el carácter hidrofóbico de la cutícula cerosa del melón, dificulta que los desinfectantes lleguen a los microorganismos.

Debido al resultado anterior y aunque solamente una de las frutas presentó coloración (equivale a un 10%), se establece que el riesgo de infiltración existe debido a que, en volúmenes de exportación en la empresa, este porcentaje representa miles de frutas y, por lo tanto, un riesgo elevado de contaminación. Aunque las pruebas posteriores determinarán condiciones favorables para la infiltración o internalización y posibles medidas preventivas, este resultado predice las ventajas que tiene el desarrollo de un plan HACCP sólido y estructurado para poder minimizar el riesgo de que este peligro se manifieste.

5.3. Determinación del efecto de la temperatura de la pulpa sobre la infiltración de *Salmonella sp.* tanto inmediata como después de 48 horas de almacenamiento del melón.

Luego de realizados los ensayos y analizados los resultados se confirmó que un diferencial térmico negativo es capaz de producir infiltración de microorganismos al interior de los melones tipo Cantaloupe, coincidiendo estos resultados con lo que sugieren autores como Buck *et al.* (2003), Richards & Beuchat (2004) y Selma *et al.* (2008), quienes afirman que la infiltración depende de la temperatura, el tiempo y la presión. Específicamente, establecen que un diferencial de temperatura negativo aumenta la infiltración del agua y de cualquier microorganismo que pudiera contener, a través de las estructuras fisiológicas naturales de frutas y vegetales, lo mismo que la presencia de grietas, heridas o fisuras pequeñas en el producto. Sin embargo, en el presente estudio también se presentó infiltración en los melones sometidos a un diferencial térmico positivo.

Para los melones evaluados, (Cuadro 5), se determinó que un diferencial negativo entre la temperatura del agua de lavado y la temperatura de pulpa permite una infiltración hacia el interior de la fruta. En este caso se obtuvo un recuento de *Salmonella* Typhimurium de 2,1 Log₁₀ UFC/cm² únicamente en las frutas que se almacenaron a 5°C por 48 horas. Este resultado puede atribuirse a una infiltración inmediata leve que no puede determinarse en el recuento inicial pero que crece y aumenta durante el periodo de almacenamiento. Este resultado confirma el carácter crítico del efecto de la temperatura, ya que una pequeña cantidad de bacterias patógenas que logren infiltrarse al interior de la fruta puede crecer rápidamente durante el transporte y almacenamiento del producto y generar así una enfermedad alimentaria.

Cuadro 5. Recuento logarítmico (UFC/cm²) de *Salmonella* Typhimurium infiltrada inmediatamente y 48 horas después de almacenamiento, según temperatura de pulpa y temperatura del agua de lavado.

| Temperatura de Pulpa (°C) | Temperatura de Agua de Lavado (°C) | ΔT^* | Recuento Logarítmico (UFC/cm ²) ^{a,b} | |
|---------------------------|------------------------------------|--------------|--|-------------------------|
| | | | Inmediato | 48 hrs |
| 15 | 30 | 15 | 1,1 ± 0,3 ^{AB} | 1,2 ± 0,3 ^{AB} |
| 30 | 30 | 0 | <10 ^B | <10 ^B |
| 45 | 30 | -15 | <10 ^B | 2,1 ± 0,8 ^A |

Basado en historial \bar{X} de temperatura del agua de inmersión = 30°C.

^a Promedios ± IC al 95%

^b Promedios con letras distintas en columnas son significativamente diferentes ($\alpha=0,05$)

De igual manera, un diferencial positivo también favoreció la infiltración, pero en este caso se obtuvo un recuento inmediato de 1,1 Log₁₀ UFC/cm² del microorganismo inoculado y un recuento de 1,2 Log₁₀ UFC/cm² en los melones que se almacenaron después del tratamiento a temperatura de refrigeración por 48 horas. El incremento del recuento durante el almacenamiento es evidente en los resultados para ambas condiciones por lo que toda

medida preventiva será fundamental para minimizar el riesgo de contaminación, ya que las opciones de desinfección son nulas una vez que el microorganismo ha penetrado en la fruta.

Los resultados se contraponen a la teoría pues no se esperaba infiltración cuando se utilizó fruta fresca en una solución de lavado cálida; sin embargo, confirma los resultados obtenidos en el objetivo anterior y lo mencionado y estudiado por autores como Buck *et al.* (2003), Sapers *et al.* (2005) y Selma *et al.* (2008), al referirse a los procesos de internalización. Estos autores enfatizan que el agua se convierte en el vehículo ideal para movilizar los microorganismos al interior de las frutas a través de heridas naturales como el pedúnculo, la cicatriz del pedúnculo u otro tipo de grietas que pueden ser naturales o causadas por plagas del cultivo o daño mecánico ocurrido durante la cosecha o el transporte.

La implementación y cumplimiento de programas de Buenas Prácticas Agrícolas y Buenas Prácticas de Manufactura deben ser obligatorias y prioritarias en la empresa, ya que dentro del plan HACCP el peligro de internalización no podría definirse como un punto crítico de control, pues no existen medidas que permitan eliminar o minimizar el riesgo. Además, aunque se controle la temperatura del agua, la posibilidad de que los microorganismos ingresen en la fruta queda evidenciada en los resultados de esta investigación. Es importante mantener los sistemas de calidad que incluyan la supervisión permanente de la calidad microbiológica del agua que entra en contacto con los melones y la prevención de la contaminación cruzada con patógenos de otras fuentes en todos los puntos en el sistema de pre y pos cosecha. Del mismo modo, asegurar la calidad del producto rechazando frutas con heridas expuestas, daños de insectos y hongos, entre otros, contribuirían también a disminuir la posibilidad de una contaminación al interior del melón.

5.4. Comparación de la reducción microbiológica de *Escherichia coli* con 5 productos desinfectantes

Como alternativa al uso del cloro, se propuso evaluar desinfectantes alternativos, que pudiesen ser una opción económicamente viable y que a su vez otorgaran al proceso una reducción mayor a la que se consigue con el uso tradicional del cloro (hipoclorito de calcio) o al menos los 2 logaritmos que establece la FDA (1998). Para esta evaluación, los desinfectantes se utilizaron de la misma forma en que actualmente se aplica el hipoclorito de calcio en el proceso del melón.

En general, la mayoría de las investigaciones de alternativas al cloro se han realizado en torno al peróxido de hidrógeno, tanto en melón como en otras frutas y vegetales. Sin embargo, los productos evaluados son recomendados por las casas comerciales como opciones viables. Algunos de los resultados obtenidos por investigadores en productos diferentes a melón serían: Sapers (2001) obtuvo reducciones de hasta 3 Log₁₀CFU/g en manzanas inoculadas y tratadas por inmersión en una solución de peróxido de hidrógeno al 5% a una temperatura entre 50-60°C; Sapers *et al.* (2002) también realizaron estudios en manzanas inoculadas con *Escherichia coli*, y lograron reducciones entre 2-3 Log₁₀CFU/g cuando las manzanas fueron lavadas por inmersión en soluciones de peróxido de hidrógeno al 5%; Sapers & Sites (2003) consiguieron reducciones cercanas a 4 Log₁₀UFC/g en manzanas inoculadas con *Escherichia coli* y tratadas con soluciones de peróxido de hidrógeno al 5%.

El análisis de varianza realizado con los datos de este estudio indica que hay diferencias significativas en las reducciones logarítmicas de *Escherichia coli* entre los productos. Como se muestra en el Cuadro 6, las mayores reducciones se consiguen con el producto que tiene yodo como ingrediente activo y las menores con el producto a base de extracto de semillas de cítricos y el de peróxido de hidrógeno.

Cuadro 6. Reducción logarítmica (UFC/cm²) de *Escherichia coli* obtenida para diferentes desinfectantes evaluados en melones tipo Cantaloupe.

| Desinfectante | Reducción Logarítmica UFC/cm ² ^{a,b} |
|---------------|--|
| IOFEC | 2,8 ± 0,5 ^A |
| CECURE | 2,4 ± 0,3 ^{AB} |
| CLORO | 2,3 ± 0,4 ^{AB} |
| TSUNAMI | 1,9 ± 0,4 ^{AB} |
| DES46 | 1,7 ± 0,3 ^B |
| KIOL | 1,6 ± 0,6 ^B |

^a Promedios con IC al 95%

^b Promedios con letras distintas son significativamente diferentes ($\alpha=0,05$)

Aunque existen diferencias significativas entre las reducciones debidas a los productos, la prueba de separación de medias de Tukey indica que la reducción obtenida por el cloro no es estadísticamente diferente a la que se obtiene con el producto a base de yodo y que tampoco es diferente a la que produce el extracto de semillas de cítricos. En comparación estricta con el cloro como testigo absoluto, no existen diferencias entre los desinfectantes evaluados. De igual manera, si se considera en índice de confianza, es posible identificar que únicamente el IOFEC y el CECURE logran la meta propuesta de reducir 2 Log₁₀ UFC/cm², los demás productos no alcanzan este valor. Para ambos productos su viabilidad para uso en contacto directo con productos frescos es dudoso, por lo tanto no pueden considerarse una opción real.

De los productos evaluados y que se ofrecen como una alternativa, existen pocas referencias de investigaciones realizadas específicamente en melón. Sapers (2001) reporta reducciones entre 3-4 Log₁₀ UFC/cm² de *Salmonella Stanley* y *Escherichia coli*, utilizando una solución de peróxido de hidrógeno a 80°C por 3 minutos; Ukuku & Sapers (2001)

encontraron que un lavado con peróxido de hidrógeno al 5% causó una reducción de 3,2 Log_{10} CFU/cm² en el momento, pero dicha reducción disminuyó durante el almacenamiento; por otro lado Ukuku (2004) afirma que lavar los melones enteros con peróxido de hidrógeno en concentraciones de 2,5% y 5% durante 5 min provoca una reducción cercana a 3 Log_{10} UFC/cm² en la población de *Salmonella* de melones Cantaloupe o Honey Dew.

Si se comparan estas investigaciones con los resultados obtenidos, para el peróxido de hidrógeno evaluado (DES46®) la reducción obtenida es menor a la citada por la literatura, pero la dosis evaluada también es menor. La recomendación del distribuidor fue utilizar el producto al 1% y la literatura menciona como dosis más baja 2,5%, pero de marcas diferentes con igual ingrediente activo. Aun así, los resultados obtenidos rondan el parámetro establecido de 2 Log_{10} UFC/cm² de reducción, por lo que es recomendable considerar la posibilidad de evaluar dosis mayores del producto y condiciones específicas como temperatura de lavado.

En el caso del ácido peracético, Park & Beuchat (1999) y Fan, *et al.* (2009) obtuvieron reducciones significativas de *Salmonella sp* y *Escherichia coli* O157: H7 inoculadas en melones tipo Cantaloupe tratadas con dosis entre 40-80 ppm del producto evaluado, siendo las reducciones entre 2-3 Log_{10} UFC/cm², respectivamente, valores similares a los obtenidos en la presente investigación y cercanas también al mínimo establecido. De igual manera, Araya Rodríguez *et al.* (2008) realizaron pruebas con el producto a base de CPC al 0,5% y obtuvieron reducciones de 4,5 Log_{10} en el recuento de mesófilos aerobios, mientras que en este estudio la reducción de *E. coli* oscila entre 2,1 – 2,7 Log_{10} UFC/cm² considerando el índice de confianza.

En general, como se muestra en el Cuadro 6, los resultados obtenidos evidencian reducciones que van desde 1,0 – 2,3 Log_{10} UFC/cm², considerando los índices de confianza,. Dichos resultados permiten establecer que el uso de cualquiera de estas alternativas, puede alcanzar el valor meta y, por tanto, reducen el riesgo microbiológico en melón. Sin embargo,

por la información con que se cuenta, las opciones más viables son los productos a base de ácido peracético o peróxido de hidrógeno, ya que cuentan con el respaldo de investigaciones adicionales y con la aprobación para su uso en productos frescos.

Tomando en consideración la meta establecida de conseguir una reducción mínima de 2 Log_{10} UFC/cm², los resultados son benéficos para la operación debido a que históricamente se han realizado análisis en laboratorios acreditados que confirman que esta reducción es suficiente para los procesos. La empresa tienen datos de 2010 y 2011 donde analizaron recuento de coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* por la técnica de número más probable (N.M.P/g), y solo reportan recuentos menores a 100 N.M.P/g en coliformes totales; para los demás parámetros el resultado es siempre negativo. Además, en los últimos cuatro años la empresa ha realizado muestreos diarios de fruta, a través de una prueba rápida (presencia/ausencia) tanto para *Salmonella sp* como *Escherichia coli*, con un 100% de pruebas negativas.

La evaluación de productos alternativos debe continuarse para considerar las posibilidades viables tanto en materia de inocuidad como de costo, especialmente si se considera que estadísticamente todos los productos evaluados trabajan igual que el cloro. No obstante, en los últimos años han aumentado las restricciones y limitantes acerca de su uso en algunos mercados, principalmente europeos (Díaz-Sobac & Vernon-Carter, 1999; Parnell *et al.* 2005; Leaman & Wetherington, 2013) y, por tanto, en pocos años estos resultados podrían ser muy útiles para sustituir el hipoclorito de calcio que se utiliza actualmente.

De igual manera, tanto el cloro como sus posibles alternativas deberían ser evaluados en relación con su efectos sobre *Listeria monocytogenes*. Si bien solamente se reporta un brote de esta enfermedad alimenticia, este ha sido el más severo y con mayor número de fallecidos, en lo que a consumo de melones frescos.

Considerar sustituir el uso de fuentes cloradas por alguna de las opciones evaluadas significaría adicionalmente la posibilidad de contrarrestar algunas de las condiciones

adversas de esta fuente, como la susceptibilidad a la presencia de materia orgánica o a la dependencia del pH y la temperatura. Los productos alternativos tienden a ser mucho más estables en el tiempo y, por tanto, su consumo sería menor y su relación beneficio/costo significativa para las operaciones.

5.5. Determinación del límite crítico de concentración de cloro en la etapa de desinfección.

Los resultados de los apartados anteriores confirman la necesidad de determinar la concentración de cloro libre ideal para minimizar el riesgo de contaminación microbiológica de la pulpa del melón por bacterias presentes en su superficie. Diferentes autores han demostrado que la exposición de las frutas y hortalizas frescas a 100-200 ppm de cloro, disminuye las poblaciones microbianas en aproximadamente 2-4 logaritmos (Velázquez *et al.* 2009). Por ejemplo, en tomates lavados con agua clorada se obtuvieron reducciones entre 3 y 3.1 Log_{10} UFC/cm², por lo que concluyen que el cloro es útil para reducir el riesgo (Ibarra Sánchez *et al.* 2004).

En melones, autores como FDA/CFSAN (2001), Parish *et al.* (2003) y Selma *et al.* (2008) citan investigaciones realizadas por Beuchat y otros en 1998, en melones tipo Cantaloupe o Honey Dew, y reportan reducciones entre 2,6 y 3,8 Log_{10} UFC/cm² en las poblaciones de *Salmonella sp* o *E. coli* O157: H7 inoculadas en la superficie, cuando fueron tratados durante 3 minutos con 2000 ppm de hipoclorito de sodio acidificado. No obstante estas concentraciones exceden por mucho el máximo de 200 que se permite.

Otros autores como Ukuku & Sapers (2001) reportan reducciones de 3,4 Log_{10} UFC/cm² en *Salmonella* Stanley en melones inoculados y lavados con solución de cloro a 1000 ppm. Mientras que Parnell *et al.* (2005) obtuvieron reducciones de hasta 1.8 Log_{10} UFC/muestra en melones inoculados con *Salmonella* Typhimurium y tratados mediante un remojo durante 60 s en una solución con 200 ppm de cloro total.

En el caso de la reducción logarítmica de *Escherichia coli* determinada en la presente investigación, para las diferentes concentraciones de cloro libre, el análisis de varianza confirma que hay diferencias significativas en las reducciones para las distintas concentraciones evaluadas y, como se muestra en el Cuadro 7, la mayor reducción se consigue con 200 ppm de cloro libre. Sin embargo, la prueba de comparación de medias de Tukey muestra variación únicamente entre la muestra sin cloro y la de 200 ppm, puesto que, entre las otras concentraciones y la máxima, no hay diferencias estadísticas. Por lo tanto, la sola aplicación de cloro puede considerarse beneficioso para la desinfección.

Basados en el índice de confianza, el uso de 200 ppm deben considerarse como obligatorio, debido a que incluso a esa concentración la reducción podría no alcanzar la meta de 2 Log₁₀ UFC/cm², ya que la reducción podría incluso ser de apenas 1.9 Log₁₀ UFC/cm² (2,3 ± 0,4 Log₁₀ UFC/cm²). Por tanto, la concentración que ofrece más seguridad al proceso es la más alta permitida, para contacto directo con productos frescos.

Cuadro 7. Reducción logarítmica (UFC/cm²) de *Escherichia coli* obtenida para diferentes concentraciones de cloro libre evaluadas en melones tipo Cantaloupe.

| Concentración de Cl libre (ppm) | Reducción Logarítmica UFC/cm ² a,b |
|---------------------------------|---|
| 0 | 1,1 ± 0,5 ^A |
| 5 | 1,3 ± 0,5 ^{AB} |
| 20 | 1,5 ± 0,5 ^{AB} |
| 50 | 1,9 ± 0,7 ^{AB} |
| 100 | 2,0 ± 0,4 ^{AB} |
| 150 | 1,9 ± 0,2 ^{AB} |
| 200 | 2,3 ± 0,4 ^B |

^a Promedios ± IC al 95%

^b Promedios con letras distintas son significativamente diferentes ($\alpha=0,05$)

En el caso de la evaluación preliminar que se hizo con *Salmonella* Typhimurium, se logró una reducción de 2,8 Log₁₀ UFC/cm² y 3,2 Log₁₀ UFC/cm² para las concentraciones de 100 y 200 ppm de cloro libre (Cuadro 8), aunque estadísticamente estos resultados no difieren

entre sí, según la prueba de separación de medias de Tukey. Si se consideran los índices de confianza, ambas concentraciones se mantienen en la meta trazada, por esta razón es necesario ampliar la evaluación del efecto de más concentraciones sobre la reducción de *Salmonella sp.*

Para los dos microorganismos evaluados, los resultados obtenidos demuestran que existen diferencias en la reducción conseguida por el hipoclorito de calcio, sobre *Salmonella sp.*, esto coincide con lo citado por Sapers *et al.* (2002) y Walton *et al.* (2008). Sin embargo, es necesario continuar las evaluaciones de manera específica con los diferentes microorganismos y las condiciones de evaluación. De igual manera, deben incluirse la evaluación del efecto de estas concentraciones en la reducción de *Listeria monocytogenes*, debido a que en los últimos años, este microorganismo se ha convertido en crítico para las operaciones de melón fresco.

Cuadro 8. Reducción logarítmica (UFC/cm²) de *Salmonella* Typhimurium obtenida para diferentes concentraciones de cloro libre evaluadas en melones tipo Cantaloupe.

| Concentración de Cl libre (ppm) | Reducción Logarítmica UFC/cm ² ^{a,b} |
|---------------------------------|--|
| 0 | 1,6 ± 0,2 ^A |
| 100 | 2,8 ± 0,2 ^B |
| 200 | 3,2 ± 0,3 ^B |

^a Promedios ± IC al 95%

^b Promedios con letras distintas son significativamente diferentes ($\alpha=0,05$)

De igual manera, en próximas investigaciones, debería introducirse como factor a evaluar el tiempo transcurrido entre la inoculación y la aplicación del tratamiento de desinfección. De esta manera se consideraría la posibilidad de formación de biofilm por parte del microorganismo en estudio, ya que para estas pruebas el tratamiento de desinfección se aplicó siempre de forma inmediata, nada más se dejó secar el inóculo. Beuchat *et al.* (2003) sugieren que en este tipo de estudios es importante que el inóculo se deje secar por un

tiempo estándar, a una temperatura y humedad relativa similar, antes de que se apliquen los tratamientos, para evaluar la posible formación de biofilms.

Los resultados obtenidos para los desinfectantes alternativos (sección 5.4) no difieren significativamente del hipoclorito de calcio que es el utilizado actualmente para el lavado y desinfección de melón. Sin embargo, se estableció como meta para límite crítico conseguir una reducción de al menos 2 Log₁₀ UFC/cm²; este resultado se alcanza en el caso de *Escherichia coli* a una concentración mayor a 100 ppm y para *Salmonella Typhimurium* la mayor reducción se consigue a 200 ppm.

Aun así, en ambos casos la diferencia principal es contra el testigo absoluto por lo que a partir de 5 ppm¹ ya existe probabilidad estadística de obtener la reducción meta. Este valor de 5 ppm de cloro libre que actualmente rige como PCC en el plan HACCP de la empresa, fue establecido por el Departamento de Investigación y Desarrollo de la casa matriz de esta compañía. En sus investigaciones ellos definieron este valor como el mínimo requerido para asegurar la inocuidad del agua de lavado del melón, de manera tal que esta no se convierta por sí misma en un medio de contaminación o movilización de patógenos. Sin embargo, dentro de un plan HACCP, el objetivo de un PCC es reducir el riesgo en el producto y, según los resultados en el Cuadro 7, con 5 ppm de cloro libre, no se alcanza la meta establecida, incluso si se considera el índice de confianza.

Ante las implicaciones que puede traer el posible brote de una enfermedad alimentaria en la salud de los consumidores y sobre las exportaciones de melón, se deberá considerar la opción de elevar la concentración de 5 ppm a 200 ppm de cloro libre, para poder asegurar con certeza la reducción meta. No obstante, es necesario tomar en cuenta la posibilidad de ampliar las pruebas específicamente para *Salmonella sp.* debido a que es el patógeno que

¹ Límite crítico definido en el plan HACCP de la empresa

más se reporta en melón y que, de acuerdo con los resultados obtenidos, es más susceptible al cloro.

La eficacia de los desinfectantes se puede mejorar mediante el aumento del tiempo de contacto entre la solución y el producto, utilizar métodos de cepillado o con materiales abrasivos y hasta tratamiento térmicos. Sin embargo, la abrasión y tratamientos de alta temperatura pueden resultar en daño mecánico y/o favorecer la infiltración. Además, podría considerarse el uso en conjunto de dos o más desinfectantes de los estudiados y evaluar su efectividad en la reducción de los principales patógenos de interés para el melón.

5.6. Determinación de la frecuencia de monitoreo del cloro libre y de dosificación de cloro.

Dentro del plan HACCP evaluado, la frecuencia de monitoreo del cloro libre es un factor importante. El análisis de regresión aplicado a los datos de cloro libre en el tiempo registrados durante seis días es significativo $p < 0.0001$ para $\sigma = 0,05$. Por tanto, el modelo ajustado que se muestra en la Figura 8, permite predecir el tiempo que tarda en disminuir el cloro libre en la solución de lavado de fruta en Finca La Cueva.

La ecuación de ajuste permite calcular que para una concentración de Cl igual a 5 ppm el tiempo es de 10h. No obstante, debido a la inestabilidad del pH en la solución y a que la concentración de cloro libre depende de factores adicionales no evaluados, como calidad de la fuente de cloro, temperatura del agua y contenido de materia orgánica en la solución de lavado, no es recomendable establecer una frecuencia de monitoreo tan amplia.

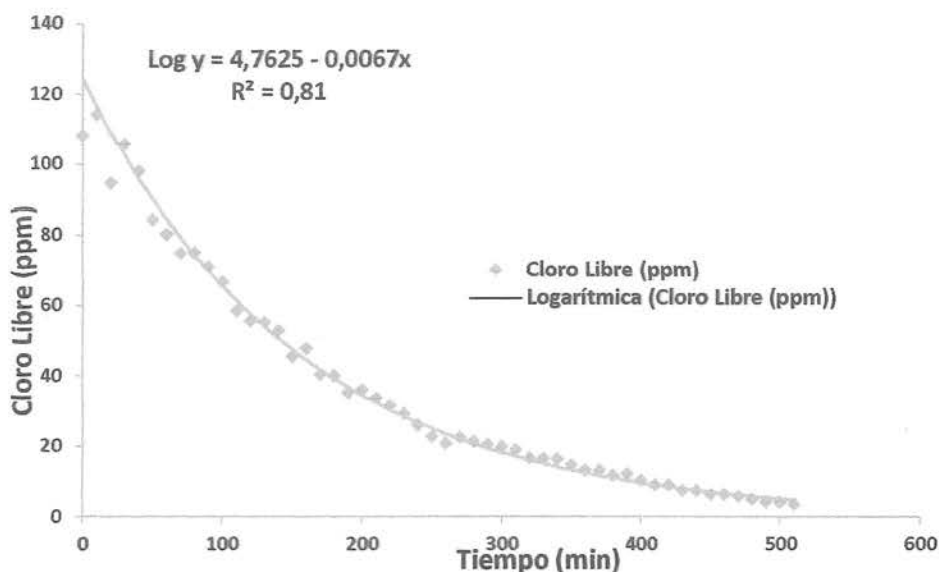


Figura 8. Regresión y ajuste para la variación en el tiempo de la concentración de cloro libre (ppm) en el agua de lavado de melones tipo Cantaloupe, en Finca La Cueva, Liberia, Guanacaste.

Debido a los factores mencionados anteriormente (pH, temperatura del agua, contenido de materia orgánica y calidad de la fuente de cloro), es recomendable mantener la frecuencia de monitoreo cada hora como lo establece actualmente el plan HACCP. De igual manera deberán mantenerse las dosificaciones adicionales de reguladores de pH e Hipoclorito de Calcio para mantener tanto el pH como el cloro libre dentro de los valores establecidos.

En pruebas sucesivas, la empresa deberá considerar la opción de evaluar el efecto de la materia orgánica y la temperatura en la disminución del cloro libre en la solución. De igual manera, deberían evaluar diferentes fuentes u opciones de cloro: hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, tricloro, cloro gaseoso, dióxido de cloro u otras, con la intención de establecer si alguna de ellas ofrece mayor estabilidad en la solución de lavado, desinfección y poder optimizar la frecuencia de monitoreo para este punto crítico.

5.7. Determinación de la correlación entre milivoltios medidos con ORP y cloro libre medido con Colorímetro.

De acuerdo con los resultados obtenidos luego de analizar las mediciones de potencial de óxido-reducción y cloro libre, es posible establecer mediante el análisis estadístico (Figura 9) que no existe correlación entre dichos parámetros. El análisis de varianza es significativo ($p < 0,001$ para $\sigma = 0,05$) pero el ajuste del modelo muestra un ajuste pobre $R^2 = 0,36$; por tanto, no es posible afirmar que uno de los parámetros pueda utilizarse para predecir el otro.

En la Figura 9 es posible observar que las lecturas de medidor de ORP empiezan a estabilizarse entre 800-900mv, sin importar la concentración de cloro libre presente en la solución de lavado.

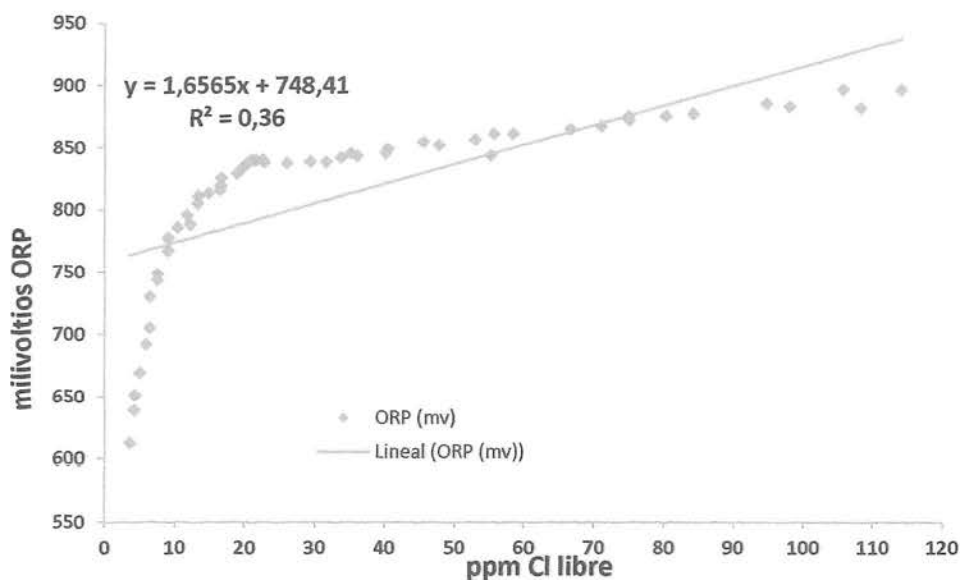


Figura 9. Correlación entre los parámetros: cloro libre y potencial de óxido-reducción, medido en el agua de lavado de melones tipo Cantaloupe, en Finca La Cueva, Liberia, Guanacaste

En sus estudios, Suslow (2004b) dice que a un valor de 650 mv logra la eliminación de bacterias que afectan la calidad y la sanidad, tales como *Erwinia sp*, *Salmonella sp* y *Escherichia coli*. Sin embargo, el mismo autor confirma en sus publicaciones de 1998 y 2004 que el valor del ORP no está relacionado directamente con las partes por millón de cloro libre o total, ya que el ORP mide la actividad oxidativa en el agua y no la concentración del desinfectante. Suslow (2004b) afirma en su investigación que la concentración del cloro sí aumenta el valor de ORP pero a una velocidad de cambio mucho menor y señala que el estancamiento de los valores ORP pudiera deberse a que el electrodo ha llegado a un punto de saturación y está incapacitado de percibir los aumentos en la actividad oxidativa del agua. Se igual manera, factores como turbidez del agua producto de la materia orgánica presente y el pH también podrían influir en la respuesta del electrodo.

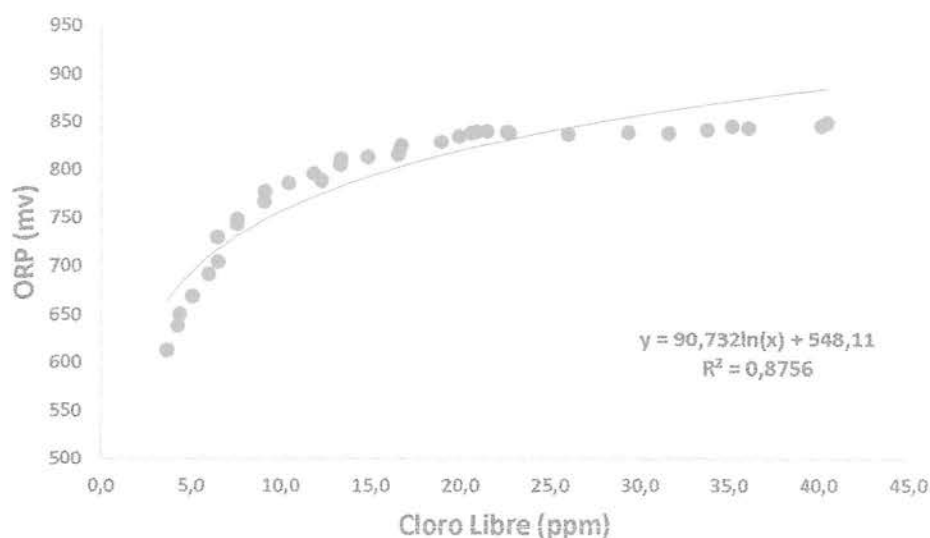


Figura 10. Correlación entre los parámetros: cloro libre y potencial de óxido-reducción; segmentación de los valores inferiores a 40 ppm, medidos en el agua de lavado de melones tipo Cantaloupe, en Finca La Cueva, Liberia, Guanacaste

Si se considera la posibilidad de segmentar la curva de la Figura 9 en dos gráficas diferentes, una que correlacione las concentraciones entre 0 y 40 ppm de cloro libre (Figura 10) y otra que correlacione las concentraciones mayores a 40 ppm de cloro libre (Figura 11), es posible observar un mejor ajuste en las mediciones de ambos equipos.

La Figura 9 muestra un ajuste logarítmico con un $R^2 = 0,88$ por lo que es posible afirmar que para concentraciones bajas sería posible predecir la concentración de cloro libre a través del potencial de óxido reducción.

De igual manera, la Figura 11 muestra también una correlación lineal muy buena entre ambas mediciones, con un $R^2 = 0,91$, por tanto si se trabaja utilizando concentraciones superiores a 40 ppm de cloro libre también podría predecirse dicha concentración a través del potencial de óxido reducción.

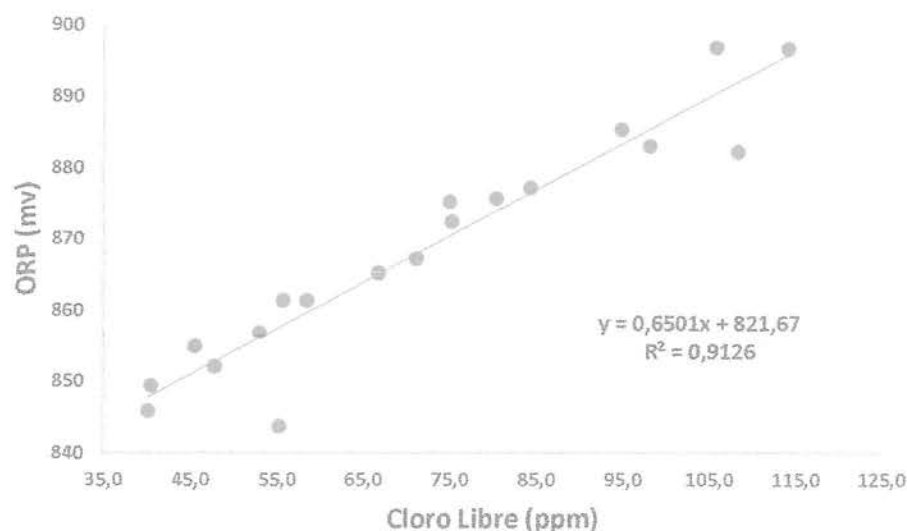


Figura 11. Correlación entre los parámetros: cloro libre y potencial de óxido-reducción; segmentación de los valores superiores a 40 ppm, medidos en el agua de lavado de melones tipo Cantaloupe, en Finca La Cueva, Liberia, Guanacaste.

Si bien, estos resultados pueden considerarse positivos, dentro del proceso evaluado, se generan dudas, debido a condiciones externas como turbidez de la solución, temperatura, pH, contenido de materia orgánica entre otros. Estos aspectos podrían afectar tanto el valor de cloro libre o el potencial de óxido reducción registrado.

Dadas las condiciones de la empresa, y de acuerdo con los resultados obtenidos, no es recomendable utilizar el potencial de óxido-reducción como parámetro a medir en el punto crítico de control, por lo que, para el caso del agua de lavado y desinfección del melón, debe utilizarse únicamente el colorímetro que permite obtener la concentración de cloro libre en la solución.

5.8. Consideraciones finales

Aunque a nivel de la industria alimentaria se puede considerar difícil implementar correcta y completamente un plan HACCP para productos frescos, los resultados obtenidos confirman que es posible validar científicamente un plan HACCP aplicable a melón. Sin embargo, es quizás en esta tipo de industria donde resulta imprescindible construir un sistema de gestión de la inocuidad sobre bases sólidas, donde el HACCP sea el complemento final de un sistema integral de gestión de la inocuidad que incluya: Buenas Prácticas Agrícolas, Buenas Prácticas de Manufactura, Programas Prerrequisitos, Buenas Prácticas de Transporte, entre otros. Estas herramientas deberán ser para la empresa igual o más importantes que el mismo análisis de peligros y puntos críticos de control, para que todos juntos logren el objetivo de reducir la incidencia de patógenos.

Lo anterior debido a que los resultados obtenidos en este trabajo confirman lo citado por diferentes autores (Seo & Frank (1999), FDA/CFSAN (2001), Sapers (2001), Parish *et al.* (2003), Annous *et al.* (2004), Core (2005), Araya Rodríguez *et al.* (2008)) quienes afirman que el lavado y desinfección de frutas y vegetales frescos probablemente no elimina por completo todos los agentes patógenos una vez que ha ocurrido la contaminación, ya que la superficie de frutas y vegetales, en este caso melón, favorece en muchas ocasiones el

crecimiento y la protección de los microorganismos en espacios donde los desinfectantes no pueden penetrar.

De igual manera, valorar opciones alternativas de desinfectantes es muy importante, ya que son una opción viable, siempre y cuando se consideren condiciones como su autorización de uso en producto fresco, evaluación de dosis diferentes, si son o no sensibles a condiciones propias del proceso: temperatura, pH de la solución, modo de aplicación, contenido de materia orgánica entre otros y siempre en función del beneficio/costo que se pueda obtener.

Por tanto, para la producción y venta de melón fresco, es necesario asegurar condiciones específicas como protección de las frutas durante su traslado del campo al área de proceso, evitando exponer el producto a las altas temperaturas, en la época más crítica y por periodos extensos. Además, asegurar la calidad e inocuidad de la fuente de agua que se utilice en contacto directo con la fruta, incluso la que se utilice para aplicación de tratamientos pre y pos cosecha. De igual manera, definir protocolos de limpieza y desinfección eficientes a lo largo de la cadena de producción utilizando productos de calidad, capacitando al personal responsable de su implementación y supervisión. Finalmente, deberá respetarse los tiempos de almacenamiento y la cadena de frío que requiere el producto. Todo lo anterior unido al cumplimiento del plan HACCP ya definido por la empresa, permitiría garantizar la inocuidad del producto, pues se reduce el riesgo al mínimo.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Los meses de abril y mayo son críticos para la temperatura de pulpa del melón en la zona de Guanacaste, especialmente el mes de abril pues en mayo solo se cosecha durante los primeros 5 o 10 días del mes. La empresa deberá tomar medidas para evitar la exposición prolongada del producto al sol directo y llevar un mayor control del diferencial térmico entre temperatura de la solución de lavado y la pulpa del melón.
- En melones intactos no se observó infiltración de tintura hacia la pulpa de la fruta; sin embargo en frutos con grados avanzados de “cracking” si se observó infiltración. Por tanto, la probabilidad de infiltración existe desde que inicia el agrietamiento alrededor del pedúnculo y aumenta en los casos en que el pedúnculo se desprenda completamente. Se presume también que ocurriría infiltración a través de cualquier otro tipo de grieta o herida en la cáscara.
- Cuando se somete a lavado por inmersión melones con temperatura de pulpa más caliente que el agua de la solución, ocurrió infiltración de *Salmonella Typhimurium* hacia la pulpa del melón; dicha infiltración fue indetectable de manera inmediata, pero se hizo evidente luego de 48 horas de almacenamiento.
- Los melones lavados por inmersión, pero con temperatura de pulpa inferior al agua de lavado, también presentaron recuento de *Salmonella Typhimurium*, tanto los evaluados de forma inmediata como después de 48 horas de almacenamiento. En este caso se asume que lo ocurrido es internalización del microorganismo y no infiltración, debido a que no podría ocurrir la absorción de líquido cuando el diferencial es positivo, según lo indica la literatura.
- Con los desinfectantes alternativos evaluados se obtienen reducciones logarítmicas iguales, estadísticamente, a las conseguidas con el cloro; por tanto, todos pueden considerarse opciones viables para la empresa y su uso dependerá de factores económicos o de exigencias de los mercados. Es recomendable ampliar estas evaluaciones para definir la mejor opción en caso necesario.

- En el caso de los desinfectantes alternativos, debe considerarse como una limitación el hecho de que alguno de ellos o su concentración no estén autorizados por FDA para estar en contacto con frutas. En caso de requerir efectivamente una alternativa, la empresa debe considerar ampliar esta investigación, tomando en cuenta este componente.
- Se debe evaluar el efecto tanto del cloro como de los desinfectantes alternativos en la reducción de *Listeria monocytogenes*, debido a la severidad del brote asociado a este microorganismo en melón fresco.
- Para lograr una reducción de al menos 2 logaritmos en la superficie del melón, es necesario establecer 200 ppm de cloro libre como punto crítico de control.
- La frecuencia de monitoreo de cloro libre en la solución de lavado y desinfección deberá mantenerse cada hora, como se realiza actualmente, ya que existen factores no evaluados que podrían afectar la concentración del cloro, entre ellos: materia orgánica, pH y temperatura. Además, los resultados anteriores sugieren que la concentración de cloro libre debería de aumentar y, por tanto, el descenso de la concentración de cloro libre será más frecuente.
- No se recomienda el uso de medidores del potencial de óxido reducción para las etapas de lavado y desinfección del melón, pues sus lecturas no pueden relacionarse directamente con la concentración de cloro libre. El electrodo del equipo tiende a saturarse a mayor concentración de cloro en la solución y por efecto de la materia orgánica presente en la solución. Los equipos colorimétricos existentes en el mercado y que permiten determinar la concentración exacta en partes por millón de cloro libre son los ideales para esta etapa del proceso.
- Es necesario continuar realizando evaluaciones en esta etapa del proceso que permitan ampliar los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que en el camino surgieron nuevas interrogantes como: efecto de los diferentes grados de cracking en la infiltración o internalización de *Salmonella Typhimurium*, efecto de los desinfectantes evaluados, incluido el cloro, sobre otros patógenos diferentes a *Escherichia coli*, como:

Salmonella sp y *Listeria monocytogenes*, efecto de la temperatura, pH y contenido de materia orgánica sobre la concentración del cloro libre en la solución de lavado y desinfección, entre otras opciones.

7. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- ALLENDE, A.; MCEVOY, J.; TAO, Y. & LUO, Y.. 2009. **Antimicrobial effect of acidified sodium chlorite, sodium chlorite, sodium hypochlorite, and citric acid on *Escherichia coli* O157:H7 and natural microflora of fresh-cut cilantro.** *Food Control* 20: 230-234.
- ANNOUS, B.A., BURKE, A. & SITES, J.E. 2004. **Surface pasteurization of whole fresh cantaloupes inoculated with *Salmonella* Poona or *Escherichia coli*.** *Journal of Food Protection* 67(9): 1876–1885.
- ANNOUS, B.A., SAPERS, G.M., JONES, D.M. & BURKE, A. 2005a. **Improved recovery procedure for evaluation of sanitizer efficacy in disinfecting contaminated cantaloupes.** *Journal of Food Science* 70(4): 242–247.
- ANNOUS, B.A.; SOLOMON, E.B.; COOKE, P.H. & BURKE, A. 2005b. **Biofilm formation by *Salmonella* spp. on Cantaloupe melons.** *Journal of Food Safety.* 25: 276-287.
- ANNOUS, B.A. 2007. **Efficacy of hot water surface pasteurization vs. non-thermal sanitizing wash treatments for reducing populations of *Salmonella* Poona on Inoculated whole cantaloupe melons.** Food Safety Intervention Technologies Research Unit, U.S. Department of Agriculture. INTERNET. http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=206350
- ARAYA RODRÍGUEZ, M.; JIMÉNEZ RAMÍREZ, F.; WALDROUP, A.; KIRANGA, B.; DEACON, R. & PAGAN, O. 2008. **The efficacy of Cecure® (CPC Antimicrobial) for postharvest decontamination of Cantaloupes and Spanish melons.** *Research Journal of Microbiology* 3(5): 336-344.
- ARTÉS, F.; GÓMEZ, P.; AGUAYO, E.; ESCALONA, V. & ARTÉS-HERNÁNDEZ, F.. 2009. **Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant**

commodities. Postharvest Biology and Technology Article in press. INTERNET. www.elsevier.com/locate/postharvbio.

ARUSCAVAGE, D.; LEE, K.; MILLER, S. & LEJEUNE, J.T. 2006. **Interactions affecting the proliferation and control of human pathogens on edible plants.** Journal of Food Science 71(8): 89-99.

BAI, Y.; COLEMAN, K.R.; COLEMAN, C.W. & WALDROUP, A.L. 2007. **Effect of cetylpyridinium chloride (Cecure[®] CPC Antimicrobial) on the refrigerated shelf life of fresh boneless, skinless broiler thigh meat.** International Journal of Poultry Science 6(2): 91-94

BARAK, J.D.; CHUE, B. & MILLS, D.C. 2003. **Recovery of surface bacteria and surface sanitization of Cantaloupes.** Journal of Food Protection 66(10): 1805-1810.

BARTZ, J.A. 1988. **Potential for postharvest disease en Tomato fruit infiltrated with chlorinated water.** Plant Disease. 72:9-13.

BARTZ, J. 2006. **Internalization and Infiltration.** Gorny, J.; Yousef, A. & Sapers G. eds. **Microbiology of Fruits and Vegetables.** CRC Press 2005. INTERNET. eBook ISBN: 978-1-4200-3893-4

BEERS, K.; RHEINGANS, J.; CHINAULT, K.; COOK, P.; SMITH, B. & WALDROUP, A. 2006. **Microbial efficacy of commercial application of Cecure[®] CPC Antimicrobial to ingesta-contaminated pre-chill broiler carcasses.** International Journal of Poultry Science 5(8): 698-703.

BEUCHAT, L.R.; HARRIS, L.J.; WARD, T.E. & KAJS, T.M. 2001. **Development of a proposed standard method for assessing the efficacy of fresh produce sanitizers.** Journal of Food Protection 64(8): 1103-1109.

- BEUCHAT, L.R.; FARBER, J.N.; GARRETT, E.H.; HARRIS, L.J.; PARISH, M.E.; SUSLOW, T.V. & BUSTA, F.F. 2003. **Standardization of a method to determine the efficacy of sanitizers in inactivating human pathogenic microorganisms on raw fruits and vegetables.** *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2: 174-178.
- BEUCHAT, L.R.; PETTIGREW, C.A.; TREMBLAY, M.E.; ROSELLE, B.J. & SCOUTEN, A.J. 2005. **Lethality of chlorine, chlorine dioxide, and a commercial fruit and vegetable sanitizer to vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* and spores of *Bacillus thuringiensis*.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32: 301–308.
- BOLAÑOS HERRERA, A. 1998. **Introducción a la Olericultura.** San José, Costa Rica, EUNED.
- BRANQUINHO BORDINI, M.E.; ASTURIANO RISTORI, C.; JAKABI, M. & SCALA GELLI, D. 2007. **Incidence, internalization and behavior of *Salmonella* in mangoes, var. Tommy Atkins.** *Food Control* 18:1002-1007.
- BRIÑEZ, W.J.; ROIG-SAGUÉS, A.X.; HERNÁNDEZ HERRERO, M.M.; LÓPEZ-PEDEMONTE, T. & GUAMIS, B. 2006. **Bactericidal efficacy of peracetic acid in combination with hydrogen peroxide against pathogenic and non pathogenic strains of *Staphylococcus spp.*, *Listeria spp.* and *Escherichia coli*.** *Food Control* 17: 516–521.
- BUCK, J.W.; WALCOTT, R.R. & BEUCHAT, L.R. 2003. **Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables.** *Plant Health Progress Online* doi: 10.1094/PHP-2003-0121-01-RV. INTERNET. <http://www.apsnet.org/online/feature/safety/Buck.pdf>.
- CASTEEL A, M.J.; SCHMIDT, C.E. & SOBSEY, M.D. 2008. **Chlorine disinfection of produce to inactivate hepatitis A virus and coliphage MS2.** *International Journal of Food Microbiology* 125: 267–273.

- CDC. 1991. **Epidemiologic Notes and Reports Multistate Outbreak of *Salmonella* Poona Infections. United States and Canada, 1991.** INTERNET. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00014966.htm>.
- CDC. 2007. ***Salmonella* Oranienburg infections associated with fruit salad served in Health-Care facilities. Northeastern United States and Canada, 2006.** INTERNET. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5639a3.htm?scid=mm5639a3e>.
- CDC. 2012a. **Multistate outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado.** INTERNET. <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupe/sjensenfarms/082712/index.html>.
- CDC. 2012b. **Multistate outbreak of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Newport Infections** Linked to Cantaloupe. INTERNET. http://www.cdc.gov/salmonella/typhimuriumcanta_loupe0812/.
- CHAIDEZ QUIROZ, C. 2002. **Inocuidad de frutas y hortalizas frescas: Efecto del agua contaminada.** Agua Latinoamérica 2(3): 4p.
- CHERRY, J.P. 1999. **Improving the safety of fresh produce with antimicrobials.** Food Technology 53(11): 54-57.
- CODEX ALIMENTARIUS. 1997. **Principios para el establecimiento y la aplicación de criterios microbiológicos para los alimentos. (CAC/GL 21-1997)** INTERNET. <http://www.fao.org/docrep/009/y5307s/y5307s04.htm#bm4>
- CODEX ALIMENTARIUS. 2003a. **Código de prácticas de higiene para las frutas y hortalizas frescas. (CAC/RCP 53-2003).** INTERNET. www.codexalimentarius.net/download/standards/10200/cxp_053s.pdf

- CODEX ALIMENTARIUS. 2003b. **Código internacional de prácticas recomendado – principios generales de higiene de los alimentos. (CAC/RCP 1-1969)** INTERNET. www.codexalimentarius.net/download/standards/23/cxp_001s.pdf
- CODEX ALIMENTARIUS. 2008. **Directrices para la validación de medidas de control de la inocuidad de los alimentos. (CAC/GL 69-2008).** INTERNET. www.codexalimentarius.net/download/standards/11022/cxg_069s.pdf
- CORE, J. 2005. **Washing and Sanitizing Techniques.** Agricultural Research 53(12): 17.
- COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S. & GREENBERG, E.P. 1999. **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.** Science 284: 1318-1322.
- DANYLUK, M.D.; McEGAN, R.; TURNER, A.N. & SCHNEIDER, K.R. 2014. **Outbreaks of Foodborne Illness Associated with Melons.** Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Florida, USA. INTERNET. <http://edis.ifas.ufl.edu/>.
- DELAQUIS, P.J.; FUKUMOTO, L R.; TOIVONEN, P.M.A. & CLIFF, M.A. 2004. **Implications of wash water chlorination and temperature for the microbiological and sensory properties of fresh-cut iceberg lettuce.** Postharvest Biology and Technology. 31(1): 81-91
- DEQUEIROZ, G.A. & DAY, D.F. 2007. **Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces.** Journal of Applied Microbiology 103: 794–802.
- DEZA, M.A.; ARAUJO, M. & GARRIDO M.J. 2004. **Inactivación de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* en tomates utilizando agua activada electroquímicamente.** Europest. INTERNET. http://www.europest.net/informes/agricolas/03_eurostel_anolyte_agr04_aplicacion_en_tomates.pdf

- DÍAZ-SOBAC, R. & VERNON-CARTER, J. 1999. **Inocuidad microbiológica de frutas frescas y mínimamente procesadas.** *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 2(3): 133-136.
- DORMEDY, E.S.; BRASHEARS, M.M.; CUTTER, C.N. & BURSON, D.E. 2000. **Validation of acid washes as critical control points hazard analysis and critical control point systems.** *Journal of Food Protection* 63(12): 1676-1680.
- DOYLE, M.P. & ERICKSON, M.C. 2008. **Summer meeting 2007 – the problems with fresh produce: an overview.** *Journal of Applied Microbiology* 105: 317-330.
- EBLEN, B.S., WALDERHAUG, M.O., EDELSON-MAMMEL, S., CHIRTEL S.J., DE JESUS, A., MERKER, R.I., BUCHANAN, R.L. & MILLER, A.J. 2004. **Potential for internalization, growth, and survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in oranges.** *Journal of Food Protection* 67(8):1578-84.
- EITENMILLER, R.R.; JOHNSON, C.D.; BRYAN, W.D.; WARREN, D.B. & GEBHARDT, S.E. 1985. **Nutrient composition of Cantaloupe and Honeydew melons.** *Journal of Food Science* 50(1)136-138.
- FAN, X.; ANNOUS, B.; KESKINEN, L. & MATTHEIS, J. 2009. **Use of chemical sanitizers to reduce microbial populations and maintain quality of whole and Fresh-Cut Cantaloupe.** *Journal of Food Protection* 72(12): 2453-2460.
- FAO. 2011. **Microbiological hazards and melons.** INTERNET. ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jemra/Microbiological_hazards_and_melons_Nov08.pdf
- FDA. 1998. **Guidance for industry: Guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables.** INTERNET. www.foodsafety.gov/~dms/prodguid.html. 43p.

FDA/CFSAN. 2001. **Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce.** U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. INTERNET. <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift3-3.html>

FDA/CFSAN. 2002. **Bacteriological analytical manual *Online*. Chapter IV: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria.** U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. INTERNET. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>

FIGUEROA AGUILAR, G.A.; GONZÁLEZ RAMÍREZ, M.; MOLINA GARCÍA, A.; YÁÑEZ GONZÁLEZ, R.; ESPINOZA NAVARRETE, J.; SERNA ESCUTIA, M.C. & CARRANZA MADRIGAL, J. 2005. **Identificación de *Salmonella* spp. en agua, melones cataloupe y heces fecales de iguanas en una huerta melonera.** Medicina Interna de México. 21: 255-258.

FORSYTHE, S.J. & HAYES, P.R. 2000. **Higiene de los alimentos microbiología y HACCP.** 2da Edición. Zaragoza, España, Editorial Acribia.

FRAZIER, W.C. & WESTHOFF, D.C. 1993. **Microbiología de los alimentos.** 4ta Edición. Zaragoza, España, Editorial Acribia.

GARRETT, E.H.; GORNY, J.R.; BEUCHAT, L.R.; FABER, J.N.; HARRIS, L.J.; PARISH, M.E.; SUSLOW, T.V. & BUSTA, F.F. 2003. **Chapter I: Microbiological safety of fresh and fresh-cut produce: Description of the situation and economic impact.** Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2: 13-37.

GORNY, J. 2006. **Microbial Contamination of Fresh Fruits and Vegetables Microbiology of Fruits and Vegetables.** Gorny, J.; Yousef, A. & Sapers G. eds. Microbiology of Fruits and Vegetables. CRC Press 2005. INTERNET. eBook ISBN: 978-1-4200-3893-4

- HARRIS, L.J.; FABER, J.N.; BEUCHAT, L.R.; PARISH, M.E.; SUSLOW, T.V.; GARRETT, E.H. & BUSTA, F.F. 2003. **Outbreaks associated with fresh produce: Incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce.** *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2: 79-141.
- HOPKINS, D.L. & THOMPSON, C.M. 2003. **Wet seed treatment with peroxyacetic acid for the control of bacterial fruit blotch and other seedborne diseases of watermelon.** *Plant Disease* 87(12):1495-1499.
- IBARRA SÁNCHEZ, L.S.; ALVARADO CASILLAS, S.; RODRÍGUEZ GARCÍA, M.O.; MARTÍNEZ GONZÁLEZ, N.E. & CASTILLO, A. 2004. **Internalization of bacterial pathogens in tomatoes and their control by selected chemicals.** *Journal of Food Protection* 67(7): 1353-1358.
- INFOAGRO SYSTEMS S.L. s.f. **El cultivo del melón (*Cucumis melo*).** INTERNET. http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tradicionales/melon2.htm
- KADER, A.A. ed. 2002. **Postharvest technology of horticultural crops.** 3 ed. University of California Agricultural and Natural Resources. USA.
- KUMAR, M.; HORA, R.; KOSTRZYNSKA, M. & WARRINER, K. 2007. **Mode of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 inactivation by a stabilized oxychloro-based sanitizer.** *Journal of Applied Microbiology* 102 (2007) 1427–1436.
- LAÍNEZ, D. & KRARUP, C. 2008. **Caracterización en pre y poscosecha de dos cultivares de melón reticulado del tipo Oriental (*Cucumis melo* grupo *Cantalupensis*).** *Ciencia e Investigación Agraria* 35(1):59-66.
- LEAMAN, S. & WETHERINGTON, D. 2013. **National Food Safety Guidelines: Cantaloupes and Other Netted Melons.** National Cantaloupe Guidance. USA. INTERNET.

<http://www.cantaloupeguidance.org/docs/nationalcommodityspecificfoodsafety-guidelinescantaloupesandnettedmelons>

- LIAO, C.H. & SAPERS, G.M. 2000. **Attachment and growth of *Salmonella* Chester on apple fruits and in vivo response of attached bacteria to sanitizer treatments.** *Journal of Food Protection* 63(7): 876-883.
- MAHOVIC, M.; BARTZ, J.A.; BERRY, A.D. & SARGENT, S.A. 2006. **Postharvest treatment of Tomato fruit with chlorine dioxide gas: dose affects fruits quality.** *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 199: 340-342.
- MARI, M.; CEMBALI, E.; BARALDI, E. & CASALINI, L. 1999. **Peracetic acid and chlorine dioxide for postharvest control of *Monilinia laxa* in stone fruits.** *Plant Disease* 83(8):773-776.
- MARI, M.; GREGORI, R. & DONATI, I. 2004. **Postharvest control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in stone fruit by peracetic acid.** *Postharvest Biology and Technology*. 33: 319–325.
- McCOLLUM, J. 2013. **Multistate outbreak of Listeriosis associated with cantaloupe.** *The New England Journal of Medicine* 369: 944-953.
- McDONNELL, G. & RUSSELL, D. 1999. **Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance.** *Clinical Microbiology Reviews* 12(1): 147-179.
- MENDOCA, A. 2005. **Bacterial Infiltration and Internalization in Fruits and Vegetables.** Ukuku, D.; Imam, S. & Lamikanra, O. eds. *Produce Degradation: Pathways and Prevention.* CRC Press 2005. INTERNET. eBook ISBN: 978-1-4200-3961-0
- MINISTERIO DE COMERCIO EXTERIOR (MCE). 2015. INTERNET: <http://www.comex.go.cr/estadisticas/exportaciones.aspx>

- MINISTERIO DE ECONOMÍA Y COMERCIO (MEC). 1988. **Decreto Nº 18461-MEC**. La Gaceta, San José. Octubre. INTERNET. <http://www.mag.go.cr/legislacion/1988/de-18461.pdf>
- MOHLE-BOETANI, J.C.; REPORTER, R.; WERNER, S.B.; ABBOTT, S.; FARRAR, J.; WATERMAN, S.H. & VUGIA, D.J. 1999. **An outbreak of *Salmonella* serogroup Saphre due to cantaloupes from México**. The Journal of Infections Diseases 180: 1361-1364.
- MYRON L COMPANY. 2008. **Oxidation-Reducción potential (ORP)/REDOX**. INTERNET: http://www.myronl.com/PDF/application_bulletins/orp_ab.pdf
- ONU. 2007. **Safety and quality of fresh fruit and vegetables: A training manual for trainers**. ONU. New York and Genova. INTERNET. http://www.unctad.org/en/docs/ditccom200616_en.pdf.
- PARISH, M.E.; BEUCHAT, L.R.; SUSLOW, T.V.; HARRIS, L.J.; GARRETT, E.H.; FARBER, J.N. & BUSTA, F.F. 2003. **Chapter V: Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fres-cut produce**. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2: 161-173.
- PARK C.M. & BEUCHAT L.R. 1999. **Evaluation of sanitizers for killing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and naturally occurring microorganisms on cantaloupes, honeydew melons, and asparagus**. Dairy, Food and Environmental Sanitation 19:842-7.
- PARNELL, T.; SUSLOW, T.V. & HARRIS L.J. 2003. **Cantaloupe: Safe methods to store, preserve and enjoy**. UC University of California Division of Agriculture and Natural Resources, Publication 8095. USA. INTERNET. <http://vric.ucedavis.edu>.
- PARNELL, T.L.; HARRIS, L.J.; SUSLOW, T.V. 2005. **Reducing *Salmonella* on cantaloupes and honeydew melons using wash practices applicable to postharvest handling, foodservice, and consumer preparation**. International Journal of Food Microbiology 99:59– 70.

- PENTEADO, A.L.; EBLEN, B.S. & MILLER, A.J. 2004. **Evidence of *Salmonella* internalization into fresh mangos during simulated postharvest insect disinfestation procedures.** *Journal of Food Protection* 67(1): 181-184.
- PRODUCE MARKETING ASOCIATION (PMA). 2005. **Lineamientos de inocuidad específicos para la cadena de abastecimiento del melón.** USA, PMA & United Fresh Association. INTERNET. www.pma.com/view_document.cfm?docID=115
- PULSE INSTRUMENTS. s.f. **Wash water sanitation by ORP: Fruits and vegetables.** Pulse Instruments, Instruments for measurements and control. C.A, USA. INTERNET. http://www.orp-meter.com/orp_freshproduce.htm.
- QIANG, Z.; DEMIRKOL, O.; ERCAL, N. & ADAMS, C. 2005. **Impact of food disinfection on beneficial biothiol contents in vegetables.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(25): 9830-9840.
- RICHARDS, G.M. & BEUCHAT, L.R. 2004. **Attachment of *Salmonella Poona* to cantaloupe rind and stem scar tissues as affected by temperature of fruit and inoculums.** *Journal of Food Protection* 67(7): 1359-1364.
- RICHARDSON, S.D.; THRUSTON JR, A.D.; CAUGHRAN, T.V.; COLLETTE, T.W.; PATTERSON, K.S. & LYKINS JR, B.W. 1998. **Chemical by products of chlorine and alternative disinfectants.** *Food Technology* 52(4): 58-61.
- ROBERTS, R.G. & REYMOND, S.T. 1994. **Chlorine dioxide for reduction of postharvest pathogen inoculums during handling of tree fruits.** *Applied and Environmental Microbiology* 60(8): 2864-2868.
- ROCHA BASTOS, M.S.; FERREIRA SOARES, N.F.; DE ANDRADE, N.J.; ARRUDA, A.C. & ALVES, R.E. 2005. **The effect of the association of sanitizers and surfactant in the microbiota of the Cantaloupe (*Cucumis melo* L.) melon surface.** *Food Control* 16: 369-373.

- RUSHING, J.W.; ANGULO, F. & BEUCHAT, L.R. 1996. **Implementation of a HACCP program in commercial fresh-market tomato packinghouse: a model for the industry.** Dairy, food and environmental sanitation 16(9): 549-553.
- SAPERS, G.M. 2001. **Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetables products.** Food Technology and Biotechnology 39(4): 305-311.
- SAPERS, G.M.; MILLER, R.L.; PILIZOTA, V. & MATTRAZZO, A.M. 2001. **Antimicrobial treatments for minimally processed Cantaloupe melon.** Journal of Food Science 66(2): 345-349.
- SAPERS, G.M.; MILLER, R.L.; ANNOUS, B.A. & BURKE, A.M. 2002. **Improved antimicrobial wash treatments for decontamination of apples.** Journal of Food Science 67(5): 1886-1891.
- SAPERS, G.M. 2003a. **Washing and Sanitizing Raw Materials for Minimally Processed Fruit and Vegetable Products.** Juneja, V.; Sapers, G. & Novak, J. eds. Microbial Safety of Minimally Processed Foods. CRC Press 2002. INTERNET. eBook ISBN: 978-1-4200-3185-0
- SAPERS, G.M. 2003b. **Hydrogen peroxide as an alternative to chlorine for sanitizing fruits and vegetables.** FoodInfo Online Features. INTERNET. <http://www.foodsciencecentral.com/fsc/ixid12433>.
- SAPERS, G.M. & SITES, J.E. 2003. **Efficacy of 1 % hydrogen peroxide wash in decontaminating apples and cantaloupe melons.** Journal of Food Science 68(5):1793–1797.
- SAPERS, G.M.; GORNY, J.R. & YOUSEF, A.E. 2005. **Microbiology of Fruits and Vegetables.** USA, CRC Press. INTERNET. http://books.google.co.cr/books?id=IPQvVJwoGDwC&source=gbs_navlinkss

- SAPERS, G. 2006. **Washing and Sanitizing Treatments for Fruits and Vegetables**. Gorny, J.; Yousef, A. & Sapers G. eds. *Microbiology of Fruits and Vegetables*. CRC Press 2005. INTERNET. eBook ISBN: 978-1-4200-3893-4
- SCOTT, V.N. 2005. **How does industry validate elements of HACCP plans?** *Food Control* 16: 497–503.
- SECRETARÍA EJECUTIVA DE PLANIFICACIÓN SECTORIAL AGROPECUARIA (SEPSA). 2014. **Boletín Estadístico Agropecuario N° 24**. San José, Costa Rica. 188p.
- SEEMAN, B.K.; SUMNER, S.S.; MARINI, R. & KNIEL, K.E. 2002. **Internalization of *Escherichia coli* in apples under natural conditions**. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 22(9): 667-673.
- SELMA, M.V.; IBAÑEZ, A.M.; CANTWELL, M. & SUSLOW, T. 2008. **Reduction by gaseous ozone of *Salmonella* and microbial flora associated with fresh-cut cantaloupe**. *Food Microbiology* 25: 558– 565.
- SEO, K.H. & FRANK, J.F. 1999. **Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine treatment as demonstrated by using confocal scanning laser microscopy**. *Journal of Food Protection* 62(1): 3-9.
- SINGH, M.; GILL, V.S.; THIPPAREDDI, H.; PHEBUS, R.K.; MARSDEN, J.L.; HERALD, T.J. & NUTSCH, A.L. 2005. **Antimicrobial activity of cetylpyridinium chloride against *Listeria monocytogenes* on frankfurters and subsequent effect on quality attributes**. *Journal of Food Protection* 68(9): 1823–1830.
- SIVAPALASINGAM, S.; BARRET, E.; KIMURA, A.; VAN DUYNE, S.; WITT, W. De; YING, M.; FRISCH, A.; PHAN, Q.; GOULD, E.; SHILLAM, P.; REDDY, V.; COOPER, T.; HOEKSTRA, M.; HIGGINS, C.; SANDERS, J.P.; TAUXE, R.V. & SLUTSKER, L. 2003. **A multistate outbreak of *Salmonella enterica* serotype Newport infection linked to Mango consumption:**

- Impact of water-dip disinfection technology.** *Clinical Infectious Diseases* 37: 1585-1590.
- SMILANICK, J.L.; CRISTO, C. & MLIKOTA, F. 1999. **Postharvest use of ozone on fresh fruit.** *Perishables Handling Quarterly Issue* 99: 10-14.
- SOTO, M.; CHAVEZ, G.; BAEZ, M.; MARTINEZ, C. & CHAIDEZ, C. 2007. **Internalization of *Salmonella Typhimurium* into mango pulp and prevention of fruit pulp contamination by chlorine and copper ions.** *International Journal of Environmental Health Research* 17(6): 453 – 459.
- SPERBER, W.H. 2005. **HACCP does not work from Farm to Table.** *Food Control* 16: 511–514.
- SUSLOW, T.V. 1998a. **Introduction to ORP as the standard of postharvest water disinfection monitoring.** UC Davis, Vegetables Research and Information Center. INTERNET. <http://vric.ucdavis.edu>.
- SUSLOW, T.V. 1998b. **Prevention of postharvest water infiltration into fresh market tomatoes: Food safety and spoilage control practices.** UC Davis, Vegetables Research and Information Center. INTERNET. <http://vric.ucdavis.edu>.
- SUSLOW, T.V. 2001. **Water disinfection: A practical approach to calculating dose values for preharvest and postharvest applications.** University of California Division of Agriculture and Natural Resources, Publication 7256. USA. INTERNET. http://groups.ucanr.org/UC_GAPs/documents/Water_Disinfection1_893.pdf.
- SUSLOW, T.V. 2002. **Postharvest chlorination: Basic properties and key points for effective disinfection.** University of California Division of Agriculture and Natural Resources, Publication 8003. USA. INTERNET. <http://anrcatalog.ucdavis.edu>.

- SUSLOW, T.V. 2003. **Key point of control and management of microbial food safety: Information for producers, handlers and processors of melons.** University of California Division of Agriculture and Natural Resources, Publication 8103. USA. INTERNET. <http://anrcatalog.ucdavis.edu>.
- SUSLOW, T.V. 2004a. **Minimizing the risk of foodborne illness associated with Cantaloupe production and handling in California.** California Melon Research Board and University of California Division of Agriculture and Natural Resources. USA. INTERNET. <http://www.cmrb.org/index.php?page=home&id=home>.
- SUSLOW, T.V. 2004b. **Oxidation-Reduction Potential (ORP) for water disinfection monitoring, control and documentation.** University of California Division of Agriculture and Natural Resources, Publication 88149. USA. INTERNET. <http://anrcatalog.ucdavis.edu>.
- SUSLOW, T.V. s.f. **Using oxidation reduction potential (ORP) for water disinfection monitoring, control and documentation.** INTERNET: http://ucce.ucdavis.edu/freeform/UC_GAPs/documents/Water_Disinfection1892.pdf
- TAUXE, R.V. 1997. **Emerging foodborne diseases: An evolving public health challenge.** *Emerging Infectious Diseases* 3(4): 425-434.
- UKUKU, D.O. & SAPERS, G.M. 2001. **Effect of sanitizer treatments on Salmonella Stanley attached to the surface of Cantaloupe and cell transfer to Fresh-Cut tissues during cutting practices.** *Journal of Food Protection* 64(9): 1286-1291.
- UKUKU, D.O. & FETT, W.F. 2002. **Relationship of cell surface charge and hydrophobicity to strength of attachment of bacteria to cantaloupe rind.** *Journal of Food Protection* 65(7): 1093-1099.

- UKUKU, D.O. 2004. **Effect of hydrogen peroxide treatment on microbial quality and appearance of whole and fresh-cut melons contaminated with *Salmonella* spp.** *International Journal of Food Microbiology* 95: 137-146.
- UKUKU, D.O.; BRIB, M.L.; KAWAMOTO, S. & ISSHIKIB, K. 2005. **Use of hydrogen peroxide in combination with nisin, sodium lactate and citric acid for reducing transfer of bacterial pathogens from whole melon surfaces to fresh-cut pieces.** *International Journal of Food Microbiology* 104: 225– 233.
- UKUKU, D. & SAPERS, G. 2006. **Microbiological Safety Issues of Fresh Melons.** Gorny, J.; Yousef, A. & Sapers G. eds. *Microbiology of Fruits and Vegetables*. CRC Press 2005. INTERNET. eBook ISBN: 978-1-4200-3893-4
- UKUKU, D.O. 2006. **Effect of sanitizing treatments on removal of bacteria from cantaloupe surface, and re-contamination with *Salmonella*.** *Food Microbiology* 23: 289–293.