



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRICOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CALIDAD SANITARIA EN LA PRODUCCIÓN DE NOPAL VERDURA (*Opuntia* sp.) EN OTUMBA, MÉXICO

TALINA OLIVIA MARTINEZ MARTINEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE :

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO


2011

La presente tesis titulada: “Calidad sanitaria en la producción de nopal verdura (*Opuntia* sp.) en Otumba, México” realizada por la alumna Talina Olivia Martínez Martínez, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:


**DOCTORA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR:


CONSEJERO:


DRA. SOCORRO ANAYA ROSALES

ASESOR:


DRA. MA. DE LOURDES AREVALO GALARZA

ASESOR:


DR. GABRIEL LEYVA RUELAS

ASESORA:


DRA. MARTHA ELVA RAMÍREZ GUZMÁN

ASESOR:


DR. J. CONCEPCIÓN RODRÍGUEZ MACIEL

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre de 2011.

CALIDAD SANITARIA EN LA PRODUCCIÓN DE NOPAL VERDURA (*Opuntia* sp.) EN OTUMBA, MÉXICO

Talina Olivia Martínez Martínez, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2011

RESUMEN

La calidad sanitaria en los productos hortofrutícolas debe considerarse una prioridad en la producción de alimentos. Actualmente en México, existe una gran preocupación por las asociaciones de productores y gobierno federal para adoptar sistemas de producción que reduzcan riesgos de contaminación (SRRC). Para la implementación de estos sistemas, es necesario cumplir con una serie de requisitos, entre ellos se encuentra la validación de procesos. Un método inmediato para efectuar este requerimiento, es la evaluación de la calidad sanitaria desde el punto de vista microbiológico y toxicológico, lo que hace necesario determinar un plan de muestreo y las técnicas apropiadas para la detección y cuantificación de patógenos indicadores. Con este propósito, en este estudio se determinó la calidad sanitaria de cladodios de nopal producido bajo un SRRC a través del recuento de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales, detección de *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*, así como la determinación de residuos de plaguicidas (organoclorados, organofosforados, organonitrogenados y piretroides). Los resultados indicaron que la carga de bacterias mesófilas y coliformes totales no rebasaron los límites permisibles y no se detectó *Salmonella*, sin embargo, se detectó *Escherichia coli*. Se encontraron residuos de bifentrina, dimetoato, ometoato, clorpirifós etílico, malatión y paratión metílico, plaguicidas no autorizados para este cultivo. Por otra parte, se evaluó la capacidad de sobrevivencia de *Salmonella* y *E. coli* en cladodios de nopal verdura desespinados y con espinas a dos temperaturas (4 y 18 °C) por 16 días, a fin de evaluar su

comportamiento una vez que han invadido a la hortaliza, bajo condiciones de manejo y almacenamiento comunes en el mercado. *Salmonella* y *E. coli* sobrevivieron durante el periodo de prueba a ambas temperaturas y condiciones de nopal, aunque la mayor sobrevivencia fue en nopal desespinado. Posteriormente, se identificaron y cuantificaron compuestos fenólicos en cladodios de nopal con potencial microbicida, se observó que ácido protocatequico y cafeíco se encontraban en mayor abundancia. En este mismo trabajo, se presenta una propuesta para elegir un tamaño de muestra para análisis microbiológicos, usando como base planes de muestreo de dos y tres clases y con referencia en el nivel de protección para el consumidor y el nivel de calidad del productor. Ambos muestreos permitieron diseñar esquemas de muestreo con un nivel de protección requerido por el mercado y comparar estadísticamente diferentes sistemas de producción de productos hortícolas.

Palabras clave: *Salmonella*, *Escherichia coli*, pesticides, phenolic compounds, survival, sample size.

SANITARY QUALITY OF CACTUS LEAVES (*Opuntia* sp.) PRODUCTION IN OTUMBA, MÉXICO

Talina Olivia Martínez Martínez, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2011

ABSTRACT

The sanitary quality of horticultural products should be considered a priority in food production. In Mexico, there is a great concern from producers association and gubernamental authorities to implement production systems for reducing contamination risks (SRCR). However, for the implementation of this systems is required to do several requirements, one them, is the process validation. An immediate way to perform this requirement is the evaluation of the sanitary quality (microbiological and toxicology assessment), for this reason, is necessary a sampling plan and appropriate techniques for pathogen detection and quantification of indicators. For this purpose, in this study was determined the sanitary quality of nopal, which was produced under a SRCR, through aerobic mesophilic bacteria and total coliforms counts, *Salmonella* sp. and *Escherichia coli* detection, and pesticide residues determination (organochlorine, organophosphorus, organonitrogen and pyrethroid). The results were: mesophilic bacteria and total coliform levels were within the permissible, *Salmonella* was not detected, but *Escherichia coli* was detected. Bifenthrin, dimethoate, omethoate, chlorpyrifos ethyl, malathion and methyl parathion were detected, these pesticides are not allowed. On the other hand, was assessed the survival capacity of *Salmonella* and *E. coli* in peeled and whit spines cactus leaves at two temperatures (4 and 18 ° C) for 16 days, in order to determine the bacterias behavior once they have invaded nopal tissue, under common management and market storage. *Salmonella* and *E. coli*

survived in this conditions, although the major survival was in peeled pads. Later, phenolic compounds with potential microbicide in nopal was identified and quantified, (protocatechuic and caffeic acids were the principal compounds. In this paper, we present a proposal to select a sample size for microbiological analysis, using two and three classes sampling and protection consumer level and the producer's quality level. Both sampling design allowed to obtain sampling schemes with a level of protection required by the market and to do statistically comparisons between different systems of production of horticultural products.

Keywords: *Salmonella*, *Escherichia coli*, pesticides, phenolic compounds, survival, sample size

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado el financiamiento para llevar a cabo mis estudios de posgrado.

Al Colegio de Postgraduados por la formación académica a través del Posgrado de Fitosanidad

A la Dra. Socorro Anaya Rosales por haberme apoyado incondicionalmente en mis estudios de posgrado, investigación, realización de la tesis y sobre todo por haberme ofrecido su valiosa amistad, tiempo y todas las grandes oportunidades para mi formación académica. Gracias por sus sabios consejos y por haber sido mi ángel de la guarda en muchísimas ocasiones.

Al Dr. José Ramón Verde Calvo, por haberme brindado la oportunidad de realizar parte de este trabajo en los laboratorios de química orgánica de la UAM-Iztapalapa (S101) y por su paciencia y dedicación durante el desarrollo de la investigación. Gracias por sus valiosos consejos y amistad.

A la Dra. Martha Elva Ramírez Guzmán por haberme apoyado con el análisis estadístico, por todo el tiempo que dedico a este trabajo sin importar que fueran fines de semana ni días festivos, pero sobre todo por la infinita paciencia para conmigo. Gracias por haberme brindado su gran amistad y por sus sabios consejos.

A la Dra. Lourdes Arevalo Galarza por su apoyo incondicional y por su gran amistad durante todo este tiempo. Gracias por estar al pendiente de este proceso de titulación y por los sabios consejos tan oportunos durante este trayecto.

Al Dr. Gabriel Leyva Ruelas por estar siempre dispuesto a explorar el campo de la microbiología y permitirme ser parte de su grupo selecto de alumnos. Gracias por su dedicación en la realización de este trabajo, sobre todo por su gran amistad, paciencia y tiempo dedicado, incluyendo fines de semana y días festivos.

Al Dr. J. Concepción por su gran amistad y apoyo en la realización de este trabajo.

A la MC. Fanny Concha por su infinita paciencia para las pruebas PCR y por la estancia en Centro de Investigación Regional “Dr. Hideyo Noguchi”. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán.

A la sociedad de productores PRONACUA de Otumba, México por habernos brindado las facilidades de realizar este trabajo. Gracias por la gran amistad que se fomento con todos los integrantes, en partícular con el Sr. Mele.

Al Comité de Sanidad Vegetal Estado de México (CESAVEM) por el apoyo que nos brindaron con los productores de nopal verdura. Gracias Ing. Ignacio Najera, Marissa Viniegra y José Luis Zapata por su valiosa ayuda con los productores durante la toma de muestras.

Al Ing. Fernando Ignacio Najera Mendoza (CESAVEM) por tu apoyo constante, amistad y tus sabios consejos.

A Marcos Ventura por ser un gran amigo y dedicar su valioso tiempo para mis trámites durante este tiempo de ausencia por el Colegio de Postgraduados.

A la familia Matus, en especial a la Sra. Inocencia por haber hecho que mi estancia en Mérida fuera tan grata. Gracias por los panuchos, cochinita pibil, relleno negro, puerco con frijoles y por los excelentes momentos.

A Nuvía por su gran amistad y apoyo en todos lo momentos, incluyendo fines de semana y días festivos.

A Rene García, Alba Soberanes y Francisco Marquez por su valiosisimo apoyo para mis trámites finales. Muchas gracias.

A todo el personal académico y administrativo del IFIT que participó en mi formación académica.

A todos mis amigos: Nuvia, Jorge, Elena, Rosario (Comadre), Lucy, Julio A., Hilda, Carolina, Jhoni, Vero, Gama, Gaby R., Fabi, José Luis E., José Luis Z., Alba, René, Delia, Bere, Memo, Angelica B., Angelica H., Cristóbal G. Juan y Siddharta por su gran apoyo y porras para culminar con este trabajo.

DEDICATORIA

A Dios por guiar mi camino siempre y por permitirme llegar a culminar esta etapa de mi vida.

A mis amados padres: Catarino Martínez G. y Rufina Martínez G. por su siempre apoyo incondicional, por su infinita paciencia y por el gran amor que han tenido para sus hijas.

A mis hermanas: Fidelfa, Lilián y Nallely . Mis amigas, consejeras y eternas luchadoras por ser cada día mejor

A Arely Martínez, el ángelito de la familia

A mis abuelos que se han ido recientemente: Isidra, Isabel, Antonio y Juana, donde quiera que estén siempre vivirán en mi corazón.

A ti mi pequeño Os...te extraño.

CONTENIDO

	Página
CAPITULO I. REVISIÓN DE LITERATURA	
1.1. Importancia del nopal	7
1.2 Producción Nacional	9
1.3 Producción de nopal bajo sistemas de reducción de riesgos de contaminación	11
1.4 Validación de los SRRC	13
1.5 Evaluación del proceso de producción	15
1.6 Teoría de extremos	18
1.7 LITERATURA CITADA	21
CAPITULO II. EVALUACIÓN DE LA REDUCCIÓN DE PELIGROS EN NOPAL VERDURA (<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill) var. Atlixco MEDIANTE UN SISTEMA DE REDUCCIÓN DE RIESGOS DE CONTAMINACIÓN	
2.1 RESUMEN	24
2.2 ABSTRACT	26
2.3 INTRODUCCIÓN	27
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.4.1 Toma de muestra	28
2.4.2 Cuenta total de bacterias mesófilas aerobias (BMA) y coliformes totales (CT) y fecales (CF)	29
2.4.3 Detección de <i>Salmonella</i>	30
2.4.4 Diseño experimental y Análisis estadístico	32
2.4.5 Análisis de Residuos de Plaguicidas	33
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
2.5.1 Calidad microbiológica de cladodios de nopal verdura	34
2.5.1.1 Cuenta de BMA	34
2.5.1.2 Cuenta de CT, detección de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i>	38
2.5.2 Detección de residuos de plaguicidas	45
2.6. CONCLUSIÓN	49
2.7 LITERATURA CITADA	50
CAPITULO III. SOBREVIVENCIA DE <i>Salmonella</i> y <i>Escherichia coli</i> en nopal verdura y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENOLICOS EN NOPAL [<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill] var. Atlixco Y PERICARPIO DE TUNA (<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar) var. Alfajayucan y Villanueva	
3.1 RESUMEN	56
3.2 ABSTRACT	58
3.3 INTRODUCCIÓN	59

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS	60
3.4.1 Evaluación de la sobrevivencia de <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i>	60
3.4.1.1 Inóculo	60
3.4.1.2 Preparación e inoculación de cladodios	60
3.4.1.3 Determinación de sobrevivencia de <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> .	61
3.4.1.4 Diseño experimental y análisis estadístico	61
3.4.2. Cuantificación de compuestos fenolicos	62
3.4.2.1 Material vegetal	62
3.4.2.2 Reactivos	62
3.4.2.3 Preparación de la muestra	63
3.4.2.4 Determinación de compuestos fenólicos	63
3.4.2.5 Identificación de ácidos fenólicos por HPLC	64
3.4.2.6 Cuantificación de Compuestos fenólicos	65
3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
3.5.1 Evaluación de la sobrevivencia de <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i>	65
3.5.2 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos	74
3.6 CONCLUSIONES	80
3.7 LITERATURA CITADA	81
CAPITULO IV. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE MUESTRA PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE NOPAL VERDURA (<i>Opuntia</i> sp.)	85
4.1 RESUMEN	85
4.2 ABSTRACT	87
4.3 INTRODUCCIÓN	88
4.4 MATERIALES Y METODOS	91
4.4.1 Planes de muestreo	91
4.4.2 Planes de muestreo de dos clases	91
4.4.3 Planes de muestreo de tres clases	91
4.4.4. Distribución Pert	94
4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	95
4.5.1 El experimento	95
4.5.2 Estimación del tamaño de muestra	96
4.5.3 Determinación del NCA para diferentes niveles de protección en un sistema de producción de nopal con SRRC	97
4.5.4 Simulación Montecarlo para comparar dos esquemas de producción de nopal verdura	97
4.6 CONCLUSIONES	100
4.7 LITERATURA CITADA	101
5. CONCLUSIONES FINALES	103

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Composición química de cladodios de nopal verdura	8
Cuadro 2. Planes de muestreo para combinaciones de diferente grado de riesgo para la salud y diversas condiciones de manipulación	16
Cuadro 3. Índices de capacidad de procesos	18
Cuadro 4. Análisis de varianza para la cuenta de BMA en nopal verdura de unidades de producción con SRRC en Otumba, México de marzo de 2008 a mayo de 2009.	35
Cuadro 5. Comparación de medias de la cuenta de BMA en nopal verdura de unidades de producción con SRRC en Otumba, México de marzo de 2008 a mayo de 2009.	35
Cuadro 6. Análisis de varianza para la cuenta de CT en nopal verdura de unidades de producción con SRRC en Otumba, México de marzo de 2008 a mayo de 2009.	38
Cuadro 7. Comparación de medias de la cuenta de CT en nopal verdura de unidades de producción con SRRC en Otumba, México de marzo de 2008 a mayo de 2009.	40
Cuadro 8. Calidad microbiológica de nopal verdura en Otumba, México durante marzo de 2008 a mayo de 2009.	41
Cuadro 9. Concentración de insecticidas encontrados en nopal verdura en Otumba, México en marzo de 2008 a mayo 2009.	46
Cuadro 10. ANOVA de medidas repetidas, efecto entre factores en la sobrevivencia de <i>Salmonella</i> .	66
Cuadro 11. ANOVA de medidas repetidas, efecto entre factores en la sobrevivencia de <i>E. coli</i> .	66
Cuadro 12. ANOVA de medidas repetidas, efecto del tiempo, temperatura y presentación de nopal en la sobrevivencia de <i>Salmonella</i> .	67
Cuadro 13. ANOVA de medidas repetidas, efecto del tiempo, temperatura y presentación de nopal en la sobrevivencia de <i>E. coli</i> .	67
Cuadro 14. Comparación de medias de la sobrevivencia de <i>Salmonella</i> en nopal con espinas y desespinado a 4 y 18 °C.	68
Cuadro 15. Comparación de medias de la sobrevivencia de <i>E. coli</i> en nopal con espinas y desespinado a 4 y 18 °C.	68
Cuadro 16. Concentración de compuestos fenólicos analizados por HPLC en extractos de nopal 'Atlixco' y pericarpio de tuna 'Alfajayucan' y 'Villanueva'.	77
Cuadro 17. Tamaños de muestra para determinar un nivel de protección al consumidor	96
Cuadro 18. Estimación del nivel de calidad aceptable (NCA) para diferentes niveles de	98

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Zonas productoras de nopal verdura en México	11
Figura 2. Capacidad del proceso de producción de nopal verdura basada en la carga microbiana (BMA).	37
Figura 3. Capacidad del proceso de producción de nopal verdura basada en la cuenta de coliformes totales.	42
Figura 4. Identificación de <i>Salmonella</i> por PCR.	43
Figura 5. Sobrevivencia de <i>Salmonella</i> sp y <i>E. coli</i> a 4 y 18 °C	69
Figura 6. Cromatograma HPLC del extracto metanólico de cladodio de nopal 'Atlixco'.	75
Figura 7. Cromatograma HPLC del extracto metanólico de tuna 'Alfajayucan'.	78
Figura 8. Cromatograma HPLC del extracto etanólico de pericarpio de tuna 'Villanueva'.	79
Figura 9. Función de probabilidad de rechazo con dos sistemas de producción de nopal verdura, SRRC: (p0= 94.19, p1= 5.80 y p2=0 %) y ST (p0= 18.33, p1= 81.66 y p2=0 %).	99

INTRODUCCIÓN GENERAL

En las últimas décadas, se han incrementado los casos de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), situación que se agudizó por el cambio de hábitos alimenticios, prácticas de producción y la emergencia de nuevos patógenos (Ávila-Quezada *et al.*, 2010). Los brotes donde se ha involucrado a productos hortofrutícolas mexicanos en su mayoría se han relacionado con bacterias, principalmente *Salmonella* y *Escherichia coli* (Johnston *et al.*, 2006).

México como país exportador de hortalizas, estableció a partir del año 2000 prácticas que reducen los riesgos de contaminación. En el 2007, se modificó la Ley Federal de Sanidad Vegetal, con el propósito de tipificar como delito los actos que ponen en riesgo la salud humana y se estableció la implementación de sistemas de reducción de riesgos de contaminación (SRRC) en la producción primaria de vegetales (LFSV, 2007). La implementación de estos sistemas previene la introducción de peligros de contaminación a lo largo de la cadena de producción de alimentos y asegura de que se cumplan con los niveles de protección establecidos por el consumidor (Gorris, 2006).

Actualmente, como una medida para la protección de la salud de los consumidores, se están implementando sistemas de reducción de riesgos de contaminación (SRRC) en la producción de nopal verdura, esto se debe en gran parte al incremento en el consumo de esta hortaliza en Estados Unidos de América, tal solo en el período 2000-2005 las ventas de nopal aumentaron en 128.6 % (Callejas *et al.*, 2009). Las unidades de producción certificadas han mejorado sus posibilidades de comercialización a nivel nacional e internacional.

Las reglas de operación para los SRRC a nivel nacional, exigen que los procedimientos sean validados a nivel microbiológico y toxicológico para asegurar la efectividad del sistema (SENASICA, 2010). Es por eso que, en este estudio se evaluó la calidad microbiológica y toxicológica de nopal verdura de una sociedad de productores que tienen implementado un programa de inocuidad agrícola y de esta forma, determinar la efectividad del sistema en la reducción de riesgos de contaminación.

Para la validación y verificación de dichos procedimientos, se debe emplear un plan de muestreo (Whiting *et al.*, 2006; ANMAT, 2005). En el aspecto de calidad microbiológica, la ICMSF (2002) sugiere planes de muestreo diseñados de acuerdo con el riesgo que representa el patógeno, tipo de alimento, condiciones de manejo y población a la que va dirigido. Al respecto, en este trabajo se presenta una propuesta para elegir un tamaño de muestra adecuado al nivel de protección requerido por el consumidor basada en planes de muestreo de dos y tres clases.

Finalmente, en todo sistema de producción de alimentos se hace necesario prevenir riesgos de contaminación para evitar la incidencia de patógenos en los productos hortofrutícolas. Diversos autores indican que los patógenos como *E. coli* y *Salmonella* puede reproducirse de forma masiva en vegetales a temperaturas entre 4 °C y cercanas a 30 °C (Kroupitski *et al.*, 2009) y pueden sobrevivir hasta por 52 semanas a 5°C (Beuchat y Scouten, 2002). Los mecanismos de sobrevivencia son diversos, desde regulación en la expresión de genes, formación de resistencia a agentes microbicidas y formación de biopelículas microbianas (O'Toole *et al.*, 2000).

También se ha detectado que la sobrevivencia depende de la composición química del producto invadido, algunos autores señalan la presencia de compuestos con potencial bactericida que inhiben o limitan la supervivencia y crecimiento del patógeno (Chang *et al.*, 2008). Este trabajo presenta el comportamiento de sobrevivencia que tiene *Salmonella* y *E. coli* a dos temperaturas comunes de manejo postcosecha (4 y 18 °C) durante 16 días, con el fin de proporcionar evidencia de la persistencia de ambas bacterias en el producto una vez que el producto se contamina durante su manejo en cadena de producción.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la calidad sanitaria de nopal verdura (*Opuntia* sp.) que se produce en un sistema de reducción de riesgos de contaminación en Otumba, México.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar la calidad microbiológica y toxicológica de nopal verdura durante marzo 2008 a marzo 2009 para determinar la efectividad de la implementación de un sistema de reducción de riesgos de contaminación (SRRC)
- Determinar la capacidad de sobrevivencia de *Salmonella* y *E. coli* a 4 y 18 °C durante 16 días, con el fin de proporcionar evidencia de la persistencia de ambas bacterias en el producto, una vez que el producto se contamina durante su manejo en cadena de producción.
- Identificar y cuantificar compuestos fenólicos con potencial microbicida en nopal verdura.
- Determinar un tamaño de muestra en función del nivel de protección requerido por el consumidor y de planes de muestreo de dos y tres clases.

LITERATURA CITADA

- ANMAT. 2005. Guía de Interpretación de Resultados Microbiológicos de Alimentos. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. Argentina. 21 p.
- Ávila-Quezada G., Sánchez E, Gardea-Béjarb A. A. and Acedo-Félix E. 2010. *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*: survival and growth in plant tissue. N. Z. J. Crop Hortic. Sci. 38(2):47-55
- Beuchat L. R. and Scouten A. J. 2002. Combined effects of water activity, temperature and chemical treatments on the survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. J. Appl. Microbiol. 92:382-395.
- Callejas-Juárez N., Matus-Gardea J. A., García-Salazar J. A., Martínez-Damián M. Á. y Salas-González J. M. Situación actual y perspectivas de mercado para la tuna, el nopalito y derivados en el Estado de México, 2006. Agrociencia 43(1):73-82.
- Chang S. F., Hsieh C. L., Yen G. C. 2008. The protective effect of *Opuntia dillenii* Haw fruit against low-density lipoprotein peroxidation and its active compounds. Food Chem. 106:569–575.
- DOF. 2007. Ley Federal de Sanidad Vegetal. Diario Oficial de la Federación. URL: <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Federal/Combo/L-121.pdf>.
- Gorris L. G. M. 2006. Food safety objective: An integral part of food chain management. Food Control 16:801-809
- ICMSF. 2002. Microorganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Management. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Kluwer. Academic/Plenum Publishers (ed). New York, USA. 362 p.
- Johnston L. M. Jaykus L.-A. and Moll D. 2006. A field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin. International J. Food Microbiol. 112:83–95.
- Kroupitski Y., Golberg D., Belausov E., Pinto R., Swartzberg D., Granot D. and Sela S. 2009. Internalization of *Salmonella enterica* in Leaves Is Induced by Light and Involves Chemotaxis and Penetration through Open Stomata. Appl. Environ. Microbiol. 75(19):6076-6086.
- O'Toole G, HB Kaplan and R Kolter. 2000. Review. Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. 54: 49-79.
- SENASICA. 2010. Lineamientos generales para la operación y certificación de sistemas de reducción de riesgos de contaminación en la producción primaria de alimentos de origen agrícola. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.

Whiting, R.C., A. Rainosek, R. L. Buchanan, M. Miliotis, D. LaBarre, W. Long, A. Ruple and S. Schaub. 2006. Determining the microbiological criteria for lot rejection from the performance objective or food safety objective. *Int. J. Food Microbiol.* 110: 263–267.

CAPITULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Importancia del nopal

El nopal es una planta de la familia Cactaceae que se caracteriza por sus hojas modificadas conocidas como cladodios, los cuales se encuentran protegidos por una cutícula gruesa cubierta de cera cuya función es disminuir la pérdida de agua, (Flores-Valdez, 2003). Están representados por aproximadamente 74 especies y 14 subespecies del subgénero *Opuntia* y 10 especies del subgénero *Nopalea* (Bravo-Hollis, 1978). Dentro del *Opuntia*, hay solo 10 o 12 especies utilizadas por el hombre para la producción de nopal verdura (brotes tiernos), fruta (tunas), forraje o para la producción de grana cochinilla para la obtención de colorante (Saenz-Hernández, 2006). Algunas especies para la producción de nopal verdura son *O. ficus-indica*, *O. robusta* y *O. leucotricha*; para fruta se emplea con mayor frecuencia a *O. megacantha*, *O. streptacantha*, *O. ficus-indica* y *O. hyptiacantha*, mientras que para producción de cochinilla *O. robusta*, *O. leucotricha* y *O. ficus-indica* (Flores-Valdez, 2003).

Existen evidencias que demuestran que el nopal se ha utilizado desde hace 7000 y 9000 años de atrás para fines de alimentación, al parecer las grandes nopaleras silvestres fueron los recursos naturales que permitieron el establecimiento de los pueblos en la región de Mesoamérica, incluido el gran Imperio Azteca, Tenochtitlan (Cervantes-Herrera y Gallegos-Vázquez, 2008).

Como alimento, el nopal es una fuente excepcional de nutrientes, tiene altos contenidos de fibra, minerales y vitaminas, además de otros compuestos como

antioxidantes (Saenz, 2006). La composición química de cladodios de nopal, varía en función de la variedad de la planta, factores edáficos de sitio del cultivo, época de siembra y la edad de la planta (18-20). Stintzing y Carle (2005) determinaron la siguiente composición en base a investigaciones de diversos autores (Cuadro 1):

Cuadro 1. Composición química de cladodios de nopal verdura

	Materia seca (g 100 g ⁻¹)	Peso fresco (g 100 g ⁻¹)
Agua	-	88-95
Carbohidratos	64-71	3-7
Cenizas	19-23	1-2
Fibra	18	1-2
Proteínas	4-10	0.5-1
Lípidos	1-4	0.2

Dentro de los minerales que se encuentran en mayor proporción en nopal verdura son potasio (166 mg 100 g⁻¹ peso fresco), calcio (93 mg 100 g⁻¹), sodio (2 mg 100 g⁻¹) e hierro (1.6 mg 100 g⁻¹) [Muñoz de Chávez *et al.*, 1995]. Se ha determinado la presencia de los ácidos orgánicos: malónico, cítrico y tartárico (Teles *et al.*, 1984). Otros compuestos son aminoácidos y aminos, entre los que ácido glutámico y asparagínico, leucina, alanina, valina, prolina, lisina, arginina, isoleucina, fenilalanina, glicina, treonina, serina, tirosina, histidina, metionina y cisteína (Stintzing y Carle, 2005). Dentro de las vitaminas, destaca la presencia de niacina, riboflavina, tiamina y β -caroteno (Guevara *et al.*, 2001). En compuestos fenólicos se encuentran quercitina, ácido p-hidroxibenzoico, felurico, protocatequico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico), vanílico, malico, entre otros (Stintzing y Carle, 2005). Otros estudios en cladodios de *O. ficus-indica*, señalan la presencia de ácido protocatéquico (0.06-2.5 mg 100 g⁻¹), gálico (0.64

mg 100 g⁻¹), 4-hidroxibenzoico (0.5-3.19 mg 100 g⁻¹), felúrico (0.56-4.32 mg 100 g⁻¹) y quercitina (forma iso-quercitina: 22.9-32.21 mg 100 g⁻¹) [Guevara-Figueroa, 2007]. En *O. dillenii*, se han detectado ácido protocatéquico (0.358 mg 100 g⁻¹), 4-hidroxibenzoico (2 mg 100 g⁻¹), felúrico (0.47 mg 100 g⁻¹), quercitina (forma isoquercitina: 7 mg 100 g⁻¹) y, sin especificar cantidad, trazas de ácido 4-hidroxibenzoico, trans-ferúlico y trans y cis p-coumárico (Qiu *et al.*, 2003; Ginestra *et al.*, 2009). La mayoría de estos compuestos son reconocidos por su actividad antimicrobiana y antioxidante, antiviral, anticancerígena, antimutágena y ansiolítica (Tung *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2001; Birošová *et al.*, 2005; Schroeter *et al.*, 2006; Yoon *et al.*, 2007; Itoh *et al.*, 2010; Othman *et al.*, 2010).

El nopal se caracteriza por poseer propiedades terapéuticas entre las que se encuentran: es un hipoglucemiante natural, protege la mucosa gastrointestinal de la producción excesiva de ácido gástrico, es una fuente de fibra soluble (Saenz, 2006). Algunas especies como *O. fuliginosa* y *O. streptacantha* se usan para el control de gastritis, fatiga, dispepsia y para fortalecer al hígado dañado por el abuso de alcohol (Sahpiro y Gong, 2002). También se aplica en tratamientos contra desordenes reumáticos, eritema, infecciones crónicas de la piel, acidosis y arterioesclerosis (Muñoz de Chávez *et al.*, 1995; Saenz, 2006).

1.2 Producción Nacional

La producción de nopal en México, se divide en tres sistemas: nopaleras silvestres, huertos familiares y plantaciones comerciales (Flores-Valdez, 2003). Se

estima que existen alrededor de 3 millones de ha de nopaleras naturales y 60,000 ha de nopal cultivado (Cervantes-Herrera y Gallegos-Vázquez, 2008).

Las principales zonas productoras de nopal de acuerdo a Cervantes-Herrera y Gallegos-Vázquez (2008) se localizan en tres regiones (Figura 1):

a) Región Centro-norte: Zacatecas, San Luís Potosí, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro y Jalisco. Recientemente, Durango, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Sonora, Chihuahua, Baja California y Baja California Sur.

b) Región Central: Distrito Federal, Morelos, Estado de México, Tlaxcala, Hidalgo, Morelos y Michoacán.

c) Región Sur: Puebla, Oaxaca, Veracruz. Esta zona cuenta con las mejores condiciones ambientales para la producción, debido a la baja ocurrencia de heladas

Al respecto, el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesca (SIAP, 2011) registró para el año 2010 una superficie cultivada de nopal verdura de 12, 472.59 ha, con una producción de 723, 815. 42 ton, situación que generó un valor de la producción de 1,671, 212. 70 miles de pesos. De acuerdo a esta información los estados con mayor producción de la hortaliza fueron Distrito Federal con 4,337 has y Morelos con 3,255 ha. En este año, otros estados con mayor producción fueron: Tamaulipas (661.98 has), Baja California (608.5 ha), Jalisco (454.75 ha), San Luis Potosi (436 ha), Zacatecas (409.25 ha), Guanajuato (237.18 ha), Puebla (147.5 ha) y Oaxaca (121.9 ha).



Figura 1. Zonas productoras de nopal verdura en México

Las principales variedades que se cultivan en México de acuerdo con Flores-Valdez (2003), son: Milpa Alta (Distrito Federal, Morelos), Atlixco (Puebla, México), Copena V1 (Baja California, San Luis Potosí, Sonora, Hidalgo, México), Copena F1 (Sonora, Baja California, México) Moradilla (México), Blanco (Michoacán, Guanajuato), Negro (Michoacán), Blanco con espinas (Guanajuato), Polotitlán (México), Manso (Sonora), Oaxaca (Oaxaca), Oreja de elefante (Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas), Tamazunchale (San Luis Potosí, Tamaulipas), Tapón y Duraznillo (San Luis Potosí, Zacatecas, Guanajuato, Durango, Jalisco, Aguascalientes y Querétaro).

1.3 Producción de nopal bajo sistemas de reducción de riesgos de contaminación

Los sistemas de reducción de riesgos de contaminación son un conjunto de elementos, métodos y herramientas eficaces, diseñadas y aplicadas bajo condiciones

naturales de producción y/o manejo de un alimento con la finalidad de reducir las probabilidades de que un contaminante de origen biológico, químico y/o físico se posicione sobre éste y comprometa la salud de quien lo consume (LFSV, 2007).

Desde el año 2000, el sector federal ha impulsado estrategias para reducir la incidencia de brotes de enfermedades gastrointestinales atribuidas al consumo de hortalizas frescas crudas. Entre ellas se encuentra, la implementación de Sistemas de Reducción de Riesgos de Contaminación (SRRC) en los procesos de producción. A partir del 2001, la SAGARPA a través de su reglamento interior, adquiere competencia en materia de inocuidad de los alimentos y en Enero del 2003 crea la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera (DGIAAP), la cual tiene como objetivo: promover la aplicación y certificación de Sistemas de Reducción de Riesgos de Contaminación (SRRC) en las unidades de producción, manejo y procesamiento primario de alimentos. Para desarrollar este programa en el área agrícola, la DGIAAP se apoya en los organismos auxiliares, como los Comités Estatales de Sanidad Vegetal de todos los Estados de la República Mexicana (SENASICA, 2010).

En México, los SRRC se encuentran implementados en productos hortícolas que tienen importancia económica como jitomate, ajo, calabaza, cebolla, cilantro, tomate, pepino, cebollín, lechuga, chicharo, albaca, dill, chile, tomatillo, hierbas aromáticas, limón, pimienta, brocoli, apio, aguacate, menta, salvia, tomillo, jicama, verdolaga, haba, acelga, ejte, espinaca, esparrago, zanahoria, coliflor, repollo y recientemente en nopal verdura (SENASICA, 2011). En este último cultivo, son pocas las unidades de producción que se han integrado a este sistema, sin embargo, se prevee que en corto

plazo se integren más unidades al programa, conforme se demuestran los beneficios que confiere a la salud humana.

1.4 Validación de los SRRC

La eficacia de los Sistemas de Reducción de Riesgos de Contaminación se sustenta en un diagnóstico de las condiciones productivas del alimento, un análisis de riesgos para valorar y sustentar los riesgos de contaminación (directos o indirectos), un plan técnico de ejecución, el diseño y aplicación de soluciones adecuadas y viables, y la validación de los procedimientos aplicados (SENASICA, 2010).

Durante la validación de los procesos, las unidades de producción o empaque demuestran que las medidas de control aplicadas durante el proceso de producción, cosecha y/o empaque de un alimento de origen agrícola son eficaces para reducir los riesgos de contaminación. Los lineamientos generales para la operación y certificación de sistemas de reducción de riesgos de contaminación en la producción primaria de alimentos de origen agrícola, establecen que la validación de procesos debe hacerse al menos una vez por ciclo productivo y consisten en evaluar que las superficies de contacto no vivas (mesas de empaque, cajas de campo, contenedores de cosecha, herramientas e cosecha, paredes interiores de depósitos de agua para consumo humano y aspersiones, como mínimo) y manos de trabajadores no presenten coliformes fecales, *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*. En agua para aspersiones, uso y consumo humano y aguas para riego se evalúa que no contengan indicadores de contaminación previstos en la NOM-127-SSA1-1994. En tanto en los frutos durante la fase de cosecha, deben demostrar la ausencia de plaguicidas no autorizados en

nuestro país y/o mercado destino, cumplimiento de los LMR de productos autorizados para su uso y la no presencia de organismos patógenos como *Salmonella* spp. y *E. coli* (SENASICA, 2010).

Durante la validación de los procesos para la detección de contaminantes biológicos, es frecuente la incertidumbre en la elección del tamaño de la muestra. Autores como Dahm (2004) y Johnston *et al.* (2006), señalan la necesidad de considerar el tamaño de muestra en función del patógeno asociado al alimento, así como de su nivel de incidencia en el alimento y nivel de protección para el consumidor (Whiting *et al.*, 2006). La preocupación de tomar una muestra que representará a todo un lote, denota la importancia de establecer un plan de muestreo acorde al alimento y a los microorganismos de interés. La Comisión Internacional para la Especificación Microbiológica de Alimentos (ICMSF, 2002), propone dos tipos de muestreo de atributos: de dos y tres clases. Los primeros se emplean para determinar la presencia o ausencia de un microorganismo patógeno, o en su defecto que no exceda un límite crítico. Se aplican cuando se determina la presencia o ausencia de un microorganismo patógeno o las toxinas que derivan de su metabolismo. Se sugiere usar el plan de muestreo de dos clases cuando el analista está seguro de que los microorganismos están uniformemente distribuidos en el lote. En este plan de muestreo se designa con n el número de muestras unitarias que deben examinarse y con c , el número máximo de muestras unitarias que pueden contener un número máximo de microorganismos o concentraciones de toxina, por debajo del máximo tolerable m (Legan *et al.*, 2001). Mientras que el de tres clases, se asume que la distribución de los patógenos sigue una distribución heterogénea y considera criterios microbiológicos que permiten dividir

la calidad del lote de alimentos en tres categorías: satisfactoria, marginalmente aceptable e inaceptable (Forsythe, 2003). Este plan de muestreo se emplea para examinar la presencia de indicadores de higiene, coliformes totales y fecales, así como bacterias mesófilas aerobias entre otros (Forsythe, 2003; Legan *et al.*, 2001).

La ICMSF (2002) indica que para la elección del plan de muestreo se considera el peligro, de tal forma que surgen 15 situaciones que se conocen como “casos” o “categorías”. La elección del caso y el plan de muestreo está en función de los microorganismos implicados, de la posibilidad de destrucción, supervivencia o multiplicación de los microorganismos durante la manipulación normal del alimento y la población a la cual va dirigida el alimento (Forsythe, 2003). En el Cuadro 2, se presenta la clasificación de los planes de muestreo en base al peligro de contaminación.

1.5 Evaluación del proceso de producción

Dentro de todo proceso de producción es importante asegurar que el proceso sea capaz de mantener sus estándares de calidad dentro de los límites permisibles.

Una de las herramientas estadísticas que permiten predecir el grado de cumplimiento de las especificaciones requeridas y la variabilidad en el proceso se conoce como capacidad del proceso ó habilidad del proceso y proporciona una predicción cuantitativa de qué tan adecuado es un proceso. El análisis de capacidad del proceso es una parte esencial en el control de calidad (Kane, 1986; Montgomery, 2006).

Cuadro 2. Planes de muestreo para combinaciones de diferente grado de riesgo para la salud y diversas condiciones de manipulación

Condiciones de manipulación del alimento tras el muestreo			
Tipo de Riesgo	Reducen el riesgo	Riesgo sin cambios	Pueden aumentar el riesgo
Sin riesgo para la salud Vida útil y alteración	Categoría 1 3 clases n= 5, c= 3	Categoría 2 3 clases n= 5, c= 2	Categoría 3 3 clases n= 5, c= 1
Riesgo para la salud bajo, indirecto (indicadores)	Categoría 4 3 clases n= 5, c= 3	Categoría 5 3 clases n= 5, c= 2	Categoría 6 3 clases n= 5, c= 1
Moderado directo, difusión limitada	Categoría 7 3 clases n= 5, c= 2	Categoría 8 3 clases n= 5, c= 1	Categoría 9 3 clases n= 10, c= 1
Moderado, directo, difusión potencialmente extensa	Categoría 10 2 clases n= 5, c= 0	Categoría 11 2 clases n= 10, c= 0	Categoría 12 2 clases n= 20, c= 0
Grave, directo	Categoría 13 2 clases n= 15, c= 0	Categoría 14 2 clases n= 30, c= 0	Categoría 15 2 clases n= 60, c= 0

Para el cálculo de la capacidad de un proceso existen técnicas gráficas y matemáticas, dentro de las primeras se encuentran las cartas de control, histogramas, gráficas de probabilidad y experimentos diseñados. En el segundo caso, se utilizan los índices de capacidad, determinados por los cocientes entre la variación natural del proceso y el nivel de variación especificada. En el estudio de la capacidad del proceso se miden los parámetros funcionales del producto, no del proceso en sí (Montgomery, 2006; Bautista-Peréz *et al.*, 2003).

Las técnicas estadísticas para calcular los índices de capacidad toman como referencia que la variable en estudio asume una distribución normal y calculan tanto la variación a corto plazo como la variación a largo plazo (Bothe, 1997). La variabilidad a corto plazo o inherente del proceso, se refiere a la variabilidad que se presenta por causas comunes. Mientras que la variabilidad a largo plazo es resultante de todas las causas de variabilidad (causas comunes y especiales), en la que se tienen en cuenta factores como el desgaste, cambios de lote de materia prima, etc. (Bothe, 1997; Montgomery, 2006). Cuando los datos del proceso asumen distribuciones no normales, los cálculos se basan frecuentemente en el modelo de la distribución Weibull (Kotz *et al.*, 2002; Bautista-Peréz *et al.*, 2003), aunque no se descarta el uso de otros modelos como la distribución de valor extremo.

Los estadísticos o índices de capacidad asociados a la variación a corto plazo son C_p , C_{pk} , CPU, y CPL, estiman la capacidad potencial o a corto plazo y predicen el comportamiento del proceso si se eliminará la variabilidad entre los distintos subgrupos. Por otro lado, los índices de capacidad asociados a la variación a largo plazo son P_p , P_{pk} , PPU, y PPL, estiman la capacidad global o a largo plazo del proceso e indica el comportamiento del proceso respecto a las especificaciones definidas (límites). Los análisis basados en el modelo normal calculan tanto la variación a corto plazo como la variación a largo plazo, mientras que los basados en modelos no normales, como el modelo Weibull sólo calculan la variación a largo plazo (Kotz *et al.*, 2002). En el Cuadro 3, se presentan los índices de capacidad de procesos (Kane, 1986; Kotz *et al.*, 2002).

Cuadro 3. Índices de capacidad de procesos

Índice	Uso	Definición	Formula
Cp o Pp	El proceso está centrado en los límites de especificación	Es el radio entre la amplitud (distancia entre los límites de especificación) y la amplitud natural	$(LES-LEI)/6\sigma$ El índice C_p Y P_p debe ser ≥ 1.33 para tener el potencial de cumplir con especificaciones (LIE, LSE)
Cpk o Ppk	El proceso no está centrado en los límites de especificación, pero está contenidos en ellos	Es el cociente entre la amplitud permitida y la amplitud natural, teniendo en cuenta la media del proceso respecto al punto medio de ambas límites de especificación	$\text{Min}\{ (LES - \mu)/3\sigma , (\mu - LEI)/3\sigma \}$ Para que el proceso cumpla con las especificaciones, el C_{pk} y P_{pk} deben de ser ≥ 1.33 .
CPU o PPU	El proceso sólo tiene un límite de especificación superior		$(LES - \mu) / 3\sigma$ Para que el proceso cumpla con las especificaciones el CPU y PPU deben de ser ≥ 1.33 .
CPL o PPL	El proceso sólo tiene un límite de especificación inferior		$(\mu - LEI) / 3\sigma$

1.6 Teoría de extremos

La teoría de extremos desarrolla procedimientos, estadísticamente justificables, para estimar el comportamiento de un proceso de una distribución desconocida, F, a partir de una muestra de datos. El interés principal no está en el promedio, sino en los valores más bajos o más altos de la variable, es decir, en los eventos asociados a la

cola de la distribución. Se aplica en estudios donde es necesario analizar variables con respuestas extremas, como en climatología, hidrología, finanzas, ingeniería, etc. (Mun, 2011). Los principales problemas con los que hay que enfrentarse para realizar esa estimación son: escasez de datos en la cola de la distribución (principalmente datos extremos), precisión para extrapolar la inferencia a situaciones extremas (por ejemplo, la determinación de las condiciones extremas para que una construcción colapse) y la imposibilidad de usar la mayor parte de las técnicas de estimación estándar, que suelen producir estimadores de colas muy sesgados (Cebrián, 1999; Kotz y Nadarajah, 2000).

De acuerdo con Cebrián (1999), el comportamiento del valor máximo (M_n) se basa en la teoría de Gumbel (valor del extremo más grande), donde se hace referencia a caracterizar el comportamiento del máximo de muestras. Dada una serie X_1, X_2, \dots, X_n con distribución F , donde el comportamiento del máximo es:

$$M_n = \max \{X_1, X_2, \dots, X_n\}, \text{ de forma que } P(M_n \leq x) = F_n(x).$$

El objetivo principal, fue caracterizar el comportamiento asintótico de M_n , en particular cuando $n \rightarrow \infty$. De esta manera, la función de distribución de Valor extremo, VE, se divide en tres tipos: 0 (VE0), 1 (VE1) o 2 (VE2), o Gumbel, Fréchet y Weibull, respectivamente.

Las características de estas distribuciones son diferentes, pero existe una relación funcional entre ellas y se expresa

$$X \sim \text{VE1}(\alpha) \Leftrightarrow \alpha \ln(X) \sim \text{VE0} \Leftrightarrow -X^{-1} \sim \text{VE2}(\alpha)$$

Para adoptar una parametrización que comprenda a las tres distribuciones se introduce el parámetro γ , de tal forma que:

$$G(x; \gamma) = \exp \left[- (1 + \gamma x)^{-1/\gamma} \right] \text{ para } 1 - \gamma x > 0$$

Esta distribución se puede generaliza añadiendo los parámetros de localización, μ (media), y escala σ (desviación estándar):

$$G(x; \gamma; \mu; \sigma) = G \left(\frac{x-\mu}{\sigma}; \gamma \right)$$

Tanto VE1 y VE2 corresponden, respectivamente, a los casos $\gamma > 0$ y $\gamma < 0$. La distribución Gumbel, o tipo 0, se obtiene como el límite de $G(x; \gamma)$ cuando $\gamma \rightarrow 0$. Con esta notación, la relación entre las dos parametrizaciones es:

$$G(x; \gamma) = \begin{cases} G_1 \left(x; \frac{1}{\gamma}, \frac{1}{\gamma}, -\frac{1}{\gamma} \right) & \text{si } \gamma > 0 \\ G_2 \left(x; -\frac{1}{\gamma}, -\frac{1}{\gamma}, -\frac{1}{\gamma} \right) & \text{si } \gamma < 0 \\ G_0(x; 1, 0) & \gamma = 0 \end{cases}$$

Kotz y Nadarajah (2000) presentan las funciones de esta distribuciones de la siguiente forma:

$$\text{VE0: } \Pr [X \leq x] = \exp \left[-e^{(x-\mu)/\sigma} \right]$$

$$\text{VE1} = \Pr [X \leq x] = \begin{cases} 0; \\ \exp \left\{ - \left(\frac{x-\mu}{\sigma} \right)^\varepsilon \right\} \end{cases} x < \mu, \quad x \geq \mu$$

$$\text{VE2} = \Pr [X \leq x] = \begin{cases} \exp \left\{ - \left(\frac{x-\mu}{\sigma} \right)^\varepsilon \right\}; \\ 0 \end{cases} x \leq \mu, \quad x > \mu$$

Donde los parámetros son: μ , σ (>0) y ε (>0).

1.7 LITERATURA CITADA

- Bautista Pérez G., Duart Montoliu J. M. y Juan Pérez A. A. 2003. Capacidad de procesos. Universitat Oberta de Catalunya. Estudios de Informática y Multimedia, Estudios de Psicopedagogía y Estudios de Documentación.
- Birošová L., Mikulášová M. and Vaverková S. 2005. Antimutagenic effect of phenolic acids. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 149(2):489-491.
- Bothe D. R. 1997. Manufacturing processes; Quality control; Statistical methods McGraw-Hill. New York, USA. 897 p.
- Bravo H. H. 1978. Las cactáceas de México. Vol 1. UNAM, México. D. F. 743 p.
- Cebrian G. A. Análisis, modelización y predicción de episodios de sequía. Departamento de Métodos Estadísticos. Universidad de Zaragoza. Tesis Doctoral. Zaragoza, España . 203 p.
- Cervantes-Herrera J. y Gallegos-Vázquez C. 2008. El nopal: símbolo y sustento. In: Recursos Filogenéticos de Nopal (*Opuntia* spp.) en México: 2002-2005. Universidad Autónoma Chapingo. Dirección de Centros Regionales. Centro Regional Universitario Centro Norte.
- Dahm, S. 2004. Microbiological sampling plans-Statistical aspects. Mitt. Lebensm. Hyg. 95: 32-44.
- Flores-Valdez C. A. 2003. Importancia del nopal. In: Nopalitos y Tunas. C. A. Florez-Valdez. Universidad Autónoma Chapingo-CIESTAAM- Programa Nopal. 1-18 pp.
- Forsythe, S. 2003. Alimentos Seguros: Microbiología. 3a. ed. Acribia. Zaragoza, España. 404 p.
- Ginestra G., Parker M. L, Bennett R. N, Robertson J., Mandalari G., Nabad A., Lo Curto R. B, Bisignano G., Faulds C. B. and Waldron K. W. 2009. Anatomical, Chemical, and Biochemical Characterization of Cladodes from Prickly Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. J. Agric. Food Chem. 57, 10323-10330.
- Guevara J. C., Yahia E. M., Brito de la Fuente E. 2001. Modified atmosphere packaging of prickly pear cactus stems (*Opuntia* spp.). Lebensm. Wiss. Technol. 34:445-451.
- ICMSF. 2002. Microorganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Management. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Kluwer. Academic/Plenum Publishers (ed). New York, USA. 362 p.
- Itoh A., Isoda K., Kondoh M., Kawase M., Watari A., Kobayashi M., Tamesada M. and Yagi K. 2010. Hepatoprotective Effect of Syringic Acid and Vanillic Acid on CCl₄-Induced Liver Injury. Biol. Pharm. Bull. 33(6) 983-987

- Jiang Y.; Satoh K. and Watanabe S. 2001. Inhibition of chlorogenic acid induced cytotoxicity by CoC12. *Anticancer Res.* 21:3349-3353.
- Johnston, L. M., L. Jaykus, D. Moll, J. Anciso, B. Mora and C. L. Moe. 2006. A field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin. *Int. J. Food Microbiol.* 112:83–95.
- Kane V. 1986. Process capability indices. *J. Qual. Technol.* 18(1):41-52
- Kotz S., Johnson N. L., Hubele N. F., Spiring F., Cheng S., Yeung A., Leung B., Rodriguez R. N., Bothe D. R., Lu M. W., Rudy R. J., Vannman K., Boyles R. A. and Ramberg J. S. 2002. Process capability indices: A review, 1992-2000. Discussions. *J. Qual. Technol.* 34(1):2-53.
- Kotz S. and Nadarajah S. 2000. Extreme value distribution. Theory and applications. Imperial College Press. London, UK. 191 p.
- Legan, J. D., M. H. Vandeven, S. Dahms and M. B. Cole. 2001. Determining the concentration of concentration of microorganisms controlled by attributes sampling plans. *Food Control* 13:137-147.
- Montgomery D. C. 2006. Control estadístico de la calidad. Tercera edición. México. Editorial Limusa Wiley. 797 p.
- Mun J. 2011. Simulador de Riesgo. Manual de Usuario en Español. Real Options Valuation, Inc.
- Muñoz de Chávez M., Chávez A., Valles V. and Roldán J. A. 1995. The nopal: a plant of manifold qualities. *World Rev. Nutr. Dietetics.* 77:109–134.
- Othman A., Mhd Jalil A. M., Weng K .K., Ismail A., Ghani N. A. and Adenan I. 2010. Epicatechin content and antioxidant capacity of cocoa beans from four different countries. *Afr. J. Biotechnol.* 9(7):1052-1059.
- Qiu Y., Chen Y., Pei Y., Matsuda H. and Yoshikawa M. 2003. New Constituents from the Fresh Stems of *Opuntia dillenii*. *J. Chin. Pharm. Sci.* 12: 1-5.
- Rodríguez-Felix A. and Cantwell M. 1988. Developmental changes in composition and quality of prickly pear cactus cladodes (nopalitos). *Plant Foods Hum. Nutr.* 38:83-93.
- Saenz C. 2006. *Opuntia* spp. Bioactive Compounds in Foods: a Plus for Health. In: Proc. Vth Int'l. Congress on Cactus Pear and Cochineal. Acta Hort. 728, ISHS.
- Sáenz-Hernández 2006. Los nopales como recurso natural. In: Utilización agroindustrial del nopal. C. Saenz, H. Berger, J. Corrales-García, L. Galletti, V. García de Cortázar, A. Rodríguez-Felix, E. Sepúlveda, M. T. Varnero (eds). Boletín de servicios agrícolas de la FAO. FAO. Roma, Italia. 1.6 p

- Schroeter H., Heiss C., Balzer J., Kleinbongard P., Keen C. L., Hollenberg N. K., Sies H., Kwik-Urbe C., Schmitz H. H. and Kelm M. 2006. (-)-epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *PNAS*. 103(4):1024–1029.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2007. Ley Federal de Sanidad Vegetal Diario Oficial de la Federación.
- SENASICA. 2010. Lineamientos generales para la operación y certificación de sistemas de reducción de riesgos de contaminación en la producción primaria de alimentos de origen agrícola. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.
- SENASICA. 2011. Directorio de empresas reconocidas en SRRC. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.
- Shapiro K. and Gong W. C. Use of herbal products for diabetes by Latinos. *J. Am. Pharmaceut. Assoc.* 42:278–279.
- SIAP. 2011. Cierre de la producción agrícola de nopal verdura. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesca. SAGARPA. México. SAGARPA, México.
- Stintzing F. C. and Carle R. 2005. Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Mol. Nutr. Food Res.* 49:175-194.
- Teles F. F. F., Stull J. W., Brown W. H. and Whiting, F. M. 1984. Amino and organic acids of the prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* L.). *J. Sci. Food Agric.* 35:421-425.
- Tung Y. T., Wu J. H., Kuo Y.H. and Chang S. T. 2007. Antioxidant activities of natural phenolic compounds from *Acacia confusa* bark. *Bioresour. Technol.* 98:1120–1123
- Whiting, R.C., A. Rainosek, R. L. Buchanan, M. Miliotis, D. LaBarre, W. Long, A. Ruple and S. Schaub. 2006. Determining the microbiological criteria for lot rejection from the performance objective or food safety objective. *Int. J. Food Microbiol.* 110: 263–267.
- Yang J. F., Yang C. H., Chang H. W., Yang C. S., Lin C. W. and Chuang L. Y. 2009. Antioxidant and antibacterial properties of *Pericarpium trichosanthis* against nosocomial drug resistant strains of *Acinetobacter baumannii* in Taiwan. *J. Medical. Plants Res.* 3(11):982-991.
- Yoon B. H., Jung J. W., Lee J. J., Cho Y. W., Jan C. G., Jin C., Oh T. H., Ryu J. H.. 2007. Anxiolytic-like effects of sinapic acid in mice. *Life Sci.* 81:234-240.

CAPITULO II

EVALUACIÓN DE LA REDUCCIÓN DE PELIGROS EN NOPAL VERDURA (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill) var. Atlixco MEDIANTE UN SISTEMA DE REDUCCIÓN DE RIESGOS DE CONTAMINACIÓN

2.1 RESUMEN

El cladodio de nopal verdura se usa principalmente como alimento y para fines terapéuticos (tratamiento de enfermedades crónico degenerativas, diabetes y obesidad). De allí el incremento en la demanda tanto en el mercado nacional como internacional. Lo que ha derivado en la aplicación de medidas de reducción de riesgos de contaminación, con el objetivo de asegurar que no cause daño al consumidor. Por ello, en los últimos años se han implementado sistemas de reducción de riesgos de contaminación en su producción, con el objetivo de asegurar que no cause daño al consumidor. Es obligación del productor y autoridades sanitarias validar que estas medidas sean efectivas en el control de peligros de contaminación. En este trabajo, se evaluó la calidad sanitaria de nopal verdura producido bajo un sistema de reducción de riesgos de contaminación en la región de Otumba, México. Durante marzo de 2008 a mayo de 2009, se determinó la carga microbiológica de la hortaliza y se evaluó el riesgo toxicológico derivado de los insecticidas que se aplican en la región de estudio. La comparación de medias mostraron que no se excedieron las cargas de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales, sin embargo, el análisis de datos individuales indicó valores fuera de límite y variabilidad de las cargas microbianas de producto entre los productores. El cálculo del índice de la capacidad general del proceso mostró que el proceso de producción a largo plazo podría generar producto con niveles

microbiológicos arriba del límite. Se detectó la presencia de *Escherichia coli* y no se detectó a *Salmonella*. Se encontraron residuos de bifentrina, dimetoato, ometoato, clorpirifós etílico, malatión y paratión metílico, plaguicidas no autorizados a nivel mundial.

Palabras clave: nopal verdura, calidad microbiológica, residuos de plaguicidas.

2.2 ABSTRACT

In México, the principal uses of cactus leaves are alimentary and medicinal purposes, in treatment of chronic degenerative diseases such as diabetes and obesity. Therefore, in the last years measures to reduce contamination risks are implemented by farmers and governmental authorities in order to ensure the consumers safety. In this study, sanitary quality of cactus leaves from a contamination risk reduction system was evaluated. During March 2008 to May 2009, microbiological load of cactus leaves and toxicological risk from pesticides applied were determined. Comparison of means showed mesophilic bacteria and total coliforms in allowable limit; however, individual analyses exhibited values outside the limit and variability. The capacity of the process index showed that the production process could generate product (cactus leaves) with high microbiological levels. *Escherichia coli* was detected, but *Salmonella* was not detected. Pesticide residues not approved by Mexico, United States of America or Europe requirements Bifenthrin, dimethoate, omethoate, chlorpyrifos ethyl, malathion and methyl parathion were found in the product. These pesticides are not approved in the world.

Keywords: cactus leaves, microbiological quality, pesticide residues.

2.3 INTRODUCCIÓN

En México, el nopal es un alimento que se incluye en la dieta diaria de los mexicanos y se utiliza como un agente terapéutico (Sáenz-Hernández *et al.*, 2002). Con el aumento de enfermedades tipo degenerativas, el nopal se emplea para regular niveles de glucosa y colesterol en sangre, problemas de obesidad, gastritis, desórdenes reumáticos, acidosis, arterosclerosis, entre otros (Sáenz-Hernández *et al.*, 2002; Piga, 2004; Rodríguez *et al.*, 2008). Durante el tratamiento, es muy común el consumo de nopal fresco (Sáenz-Hernández *et al.*, 2002; Nefzaoui *et al.*, 2008), lo que hace necesario garantizar que no cause daño al consumidor (Leifert *et al.*, 2008). Al respecto, en brotes epidemiológicos por enfermedades transmitidos por la ingesta de alimentos, existen datos que señalan la frecuencia de contaminación de tipo biológico por la presencia de patógenos (González y Rojas, 2005) y químico por residuos de plaguicidas (Henao y Arbelaez, 2001). La mayoría de patógenos tienen mecanismos para alojarse en sitios protectores dentro del material vegetal y continuar su proliferación (Fernández-Escartín, 2008). En tanto que los residuos tóxicos, en particular plaguicidas, pueden estar presentes en el producto si no se respeta el intervalo de seguridad, cuando se rebasa la cantidad de aplicación permitida y en algunas ocasiones, cuando hay contaminación cruzada con áreas aledañas (Aldama-Madrid *et al.*, 2008). Desde el año 2000, el sector federal ha impulsado estrategias para reducir la incidencia de brotes de enfermedades gastrointestinales atribuidas al consumo de hortalizas frescas crudas. Entre ellas se encuentra, la implementación de Sistemas de Reducción de Riesgos de Contaminación (SRRC) en los procesos de producción. El presente estudio tuvo como objetivo determinar si la aplicación de un

SRRC reduce el riesgo de contaminación por patógenos y residuos tóxicos. Con este propósito, en este estudio se determinó la calidad sanitaria de nopal producido bajo un SRRC a través del recuento de bacterias mesofilas aerobias y coliformes totales, detección de *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*, así como la determinación de residuos de plaguicidas (organoclorados, organofosforados, organonitrogenados y piretroides).

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1 Toma de muestra

Se eligieron al azar 14 productores (n=14) de nopal verdura, que contaban con unidades de producción certificadas bajo un SRRC, ubicadas en el municipio de Otumba, México, los muestreos se realizaron durante marzo, junio, septiembre y octubre de 2008; enero y mayo de 2009 (un muestreo en cada mes). Para el análisis microbiológico (AM), se utilizaron 60 unidades experimentales, con un tamaño de muestra de 1 kg de nopal, que fueron colectadas asépticamente en bolsas de polietileno de 25 x 33 cm, esterilizadas previamente con luz UV a 265 nm y se mantuvieron a 4°C para su traslado al laboratorio de Microbiología del Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Autónoma Chapingo. Para el análisis de residuos de plaguicidas (ARP), se tomaron 24 muestras (24 kg de cladodios) al azar, de diferentes cajas y puntos de localización, el tamaño de muestra fue de 3 kg, que se mantuvieron en congelación, para su envío inmediato a un laboratorio privado en Matamoros, Tamaulipas.

2.4.2 Cuenta total de bacterias mesófilas aerobias (BMA) y coliformes totales (CT) y fecales (CF)

Para preparar una solución inicial, en una licuadora se homogeneizaron 25 g de muestra con 225 mL de peptona de caseína (BD BIOXON®) al 0.1% por 1 minuto a 200 rpm. Posteriormente, se prepararon diluciones decimales de 10^{-1} a 10^{-4} . Para la determinación de BMA, se hizo el recuento en placas Petrifilm™ 3M (Saint Paul, MN, USA), que consistió en la siembra por triplicado de alícuotas de 1 mL de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} en placas Petrifilm™ 3M y la incubación a 37°C durante 24 horas. El recuento de las placas se realizó conforme a la guía de interpretación Petrifilm™ 3M. Los resultados se expresaron como \log_{10} de unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (\log UFC g^{-1}).

Los CT se determinaron conforme a la NOM-112-SSA1-1994 por la técnica del número más probable (NMP), los resultados se expresaron como \log_{10} del número más probable por gramo de muestra (\log NMP g^{-1}). Los coliformes fecales se diferenciaron de los totales a través de la siembra de las muestras positivas en caldo EC (Merck®), se incubaron a 45.5 °C en baño María por 48 h. Los tubos positivos (Con gas en los tubos Durham) se consideraron para el recuento de *E.coli* y su presencia se determinó en el medio de caldo lauril sulfato de sodio, después se sembró en placas con agar eosina azul de metileno [EMB, BD BIOXON®], para definir las características coloniales y microscópicas. Finalmente, la confirmación se hizo mediante las pruebas bioquímicas IMViC (Pascual y Calderón, 2000).

2.4.3 Detección de *Salmonella*

La detección de *Salmonella* spp., la identificación bioquímica y serológica se realizó conforme lo señala la Norma NOM-114-SSA1-1994. A continuación se describe la metodología:

Preenriquecimiento. Se tomaron 25 g de muestra y se mezclaron con 225 mL de caldo lactosado (BD Bioxon[®]), se incubó a 37 °C por 48 horas.

Enriquecimiento. Tubos con caldo tetrionato (Difco[®]) y caldo selenito cistina (Difco[®]) se inocularon con 1 mL del cultivo de preenriquecimiento y se incubaron a 37 °C por 24-48 horas.

Aislamiento. Se tomaron muestras de los cultivos de caldo tetrionato (Difco[®]) y caldo selenito cistina (Difco[®]) y se sembraron por triplicado en placas con medios selectivos de aislamiento: agar sulfito bismuto (Difco[®]), agar XLD (Difco[®]), agar entérico hektoen (Difco[®]) y CHROMagar (BBLTM) para *Salmonella*. La incubación se llevó a 37 °C por 24 horas, pasado este tiempo se caracterización las colonias típicas para *Salmonella* y se les realizó tinción de Gram.

Identificación bioquímica. Las colonias sospechosas de *Salmonella* que se obtuvieron en el aislamiento, se sembraron por triplicado en tubos con agar triple azúcar y hierro (BD Bioxon[®]), agar lisina hierro (Difco[®]), agar citrato de simmons (Difco[®]), agar SIM (Difco[®]), caldo urea (BD Bioxon[®]), caldo rojo fenol lactosa (BD Bioxon[®]), caldo rojo fenol sacarosa (BD Bioxon[®]), caldo rojo fenol dulcitol (BD Bioxon[®]) y solución de cianuro de potasio (Merck[®]), la incubación se realizó a 37 °C por 24

horas. También se hicieron las pruebas de indol, rojo de metilo y Voges-Proskauer (Pascual y Calderón, 2000).

Pruebas serológicas. Se emplearon kits comerciales de antisueros somáticos (O) y flagelares (H) para *Salmonella* (DIFCO®). Sobre un portaobjetos cóncavo se colocaron azadas de cultivo joven (18 h) y se agregó aproximadamente de 0.5 mL de los antisueros, la mezcla se dejó reposar por 1 a 2 min y se observó si había formación de aglutinación.

Identificación de *Salmonella* mediante PCR. Para la identificación molecular de *Salmonella*, las cepas sospechosas se trasladaron al laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación Regional “Dr. Hideyo Noguchi”. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, donde se establecieron pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Para la extracción de ADN se tomaron 1.5 mL del medio en caldo LBB y se colocaron en tubos Eppendorf. La muestra se centrifugó a 8000 rpm por 5 min, se desechó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con agua desionizada. Posteriormente, se agregó 1 mL de agua destilada para resuspender la pastilla bacteriana y se calentó a baño maría a 95 °C durante 5 min. Una vez fría la muestra, se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min. El sobrenadante se transfirió a tubos Eppendorf para su réplica en PCR.

Para el análisis PCR se emplearon los Oligos Stn 571 (5' GCG GTC GGT CCC ACT TTC TTT TG 3') y Stn 971 (5' ACT ACC TGC TCT CGC CCA ATG CTT 3'), en un volumen final de 30 µL, que contenían; 5 µL de los ADNs problema, 1 µL de los Oligos *Stn*, 3 µL de buffer para Taq Polimersa y 17.1 µL de H₂O, esta mezcla se colocó en el

termociclador (BIORAD®) y se sometió a los siguientes tratamientos térmicos: 94°C, por 5 min; 94°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72 °C, 1 min. y finalmente 72°C por 5 min. Se utilizó un control positivo (ADN snt+) y otro negativo (ADN snt-). Todos los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio. Los resultados se obtuvieron mediante la observación del gel en un transiluminador de luz UV. Finalmente, un marcador de peso molecular de 100 pb (Gibco BRL Rockville, Md) fue utilizado para la detección de los pesos moleculares de los productos de PCR.

2.4.4 Diseño experimental y Análisis estadístico

El modelo experimental consistió en un diseño completamente al azar (DCA). Para el AM se incluyeron 10 tratamientos (productores de nopal verdura) y 4 tratamientos para el ARP, con 6 repeticiones, originando 60 y 24 unidades experimentales, respectivamente, para un total de 84 muestras de nopal verdura.

Las cuentas de BMA y CT en nopal verdura, se analizaron estadísticamente con el programa SAS 9.1 (SAS Institute Inc., 2002). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

El modelo que se empleó para el análisis fue:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde, Y_{ij} es el valor observado de la variable respuesta correspondiente al tratamiento i en su repetición j

μ es la media general

τ_i = efecto del i-ésimo tratamiento, $j=1,2,3,4,5,6$

ε_{ij} = error asociado del i-ésimo tratamiento en la j-ésima repetición.

Posteriormente en Minitab 15[®], se modeló una distribución estadística para los resultados de BMA y CT y se determinó la capacidad de proceso, con el fin de determinar la eficiencia del proceso de producción de nopal bajo un SRRC. En el caso de *E. coli* y *Salmonella* sp. no se aplicó análisis estadístico, solo se indica su presencia o ausencia.

2.4.5 Análisis de Residuos de Plaguicidas

Las muestras de nopal destinado a ARP se etiquetaron y se mantuvieron en congelación hasta su envío al laboratorio LABSAP S. de RL MI., quien utilizó el método de multiresiduos de la FDA, Vol. 1, sección 302 para la detección de residuos de plaguicidas organoclorados, organofosforados, organonitrogenados y piretroides. El límite de determinación fue de 0.01 a 0.08 ppm, con un porcentaje de recuperación de >80%. Durante el muestreo se mantuvo comunicación con el personal técnico del CESAVEM y productores, para obtener información relacionada a las plagas de nopal y a los plaguicidas comunes que se aplicaban en la región de estudio.

Se evaluó el riesgo toxicológico, derivado de los insecticidas que se aplican en nopal verdura en la zona de estudio, con la metodología descrita por Aldama-Madrid *et al.* (2008). Para determinar el cálculo de la Ingesta Diaria Estimada (IDE) se empleó la fórmula que describe Valenzuela *et al.* (2001):

$$IDE = \sum c_i \left(\frac{C}{NDK} \right)$$

Dónde: $\sum c_i$, es la suma de las concentraciones de los plaguicidas evaluadas en nopal (mg kg^{-1}); C, es el consumo anual de nopal por persona (kg por año); N, es el número de muestras analizadas, se considera una por tratarse de resultados por productor; D, es el número de días en un año; y K, es peso corporal promedio del consumidor (kg). Se utilizó el consumo *per capita* en México de 5.78 kg como el valor de C (Berger *et al.*, 2006) y como K, 70 kg (peso promedio del consumidor mexicano). Las Ingestas Diarias Admisibles (IDA) se obtuvieron de los datos publicados por la FAO-WHO (1993, 1996, 1997, 1998, 2000)

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1 Calidad microbiológica de cladodios de nopal verdura

2.5.1.1 Cuenta de BMA

La prueba de Tukey no mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los efectos de los tratamientos, considerando las fechas de muestreo (marzo de 2008 a mayo de 2009), para las variables respuesta BMA en las diferentes épocas de muestreo de (Cuadro 4). La comparación de medias mostró que las carga microbiana más alta ($4.15 \pm 0.97 \text{ UFC g}^{-1}$) se presentaron en octubre (Cuadro 5), este comportamiento no coincide con lo señalado por diversos autores, que demostraron que la carga microbiana en alimentos aumenta en primavera y verano debido al incremento de la temperatura (Pavan da Silva *et al.*, 2007; Cohen *et al.*, 2007).

Cuadro 4. Análisis de varianza para la cuenta de BMA en nopal verdura de unidades de producción con SRRC en Otumba, México de marzo de 2008 a mayo de 2009.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F valor	Pr>F
Modelo	5	7.61512925	1.52302585	2.18	0.696
Error	54	37.69367065	0.69803094		
Total	59	45.30879990			

correcto

Cuadro 5. Comparación de medias de la cuenta de BMA en nopal verdura de unidades de producción con SRRC en Otumba, México de marzo de 2008 a mayo de 2009.

Agrupamiento Tukey	Media	N	Muestreo
A	4.1503	10	4 (Octubre 2008)
A			
A	3.9667	10	3 (Septiembre 2008)
A			
A	3.7440	10	6 (Mayo 2009))
A			
A	3.6772	10	2 (Junio 2008)
A			
A	3.2154	10	1 (Marzo de 2008)
A			
A	3.1888	10	5 (Enero de 2009)
A			

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

Como se mencionó antes, el ANOVA no encontró diferencias entre los tratamientos y todas las muestras de nopal cumplieron con los límites establecidos, sin embargo, con el propósito de tener otro ángulo de análisis de los mismos resultados,

donde los datos reflejaran con más precisión los resultados del laboratorio “*muestra por muestra*”, las cuentas de BMA de cada muestra, se modelaron en una distribución del valor extremo más grande (Minitab 15[®]), la media del proceso fue de 3.65 y desviación estándar (escala) de 0.67. Se detectó que los recuentos de BMA se concentraron en un rango de 3 a 5 log UFC g⁻¹, las colas de la distribución señalaron valores mínimos a 2 log UFC g⁻¹ y valores máximos de 6 log UFC g⁻¹ (Figura 2). El índice de capacidad general del proceso (Ppk), considerando que m=2 y M=5 log UFC g⁻¹ (FNB *et al.*, 2003) fue de 0.36 (Ppk < 1.33), lo que indica que el proceso de producción no fue capaz de mantener el nivel de las poblaciones de BMA de todas las muestras de nopal, dentro de los límites microbiológicos establecido por la normatividad, además, permitió observar de mejor manera la variabilidad entre las cargas microbianas durante los muestreos. Por otro lado, el rendimiento general (%>LSE) indicó que en el 7.24% de los muestreos no cumplió con las especificaciones tolerables (M) requeridas (Montgomery, 2006). Ambas estimaciones sugieren que de no ajustar el proceso de producción y empaque de nopal, en el futuro se seguirán sobrepasando los límites de BMA establecidos en la normatividad, con el riesgo de afectar la salud de los consumidores y ser rechazado en el mercado (Zúñiga *et al.* 2006).

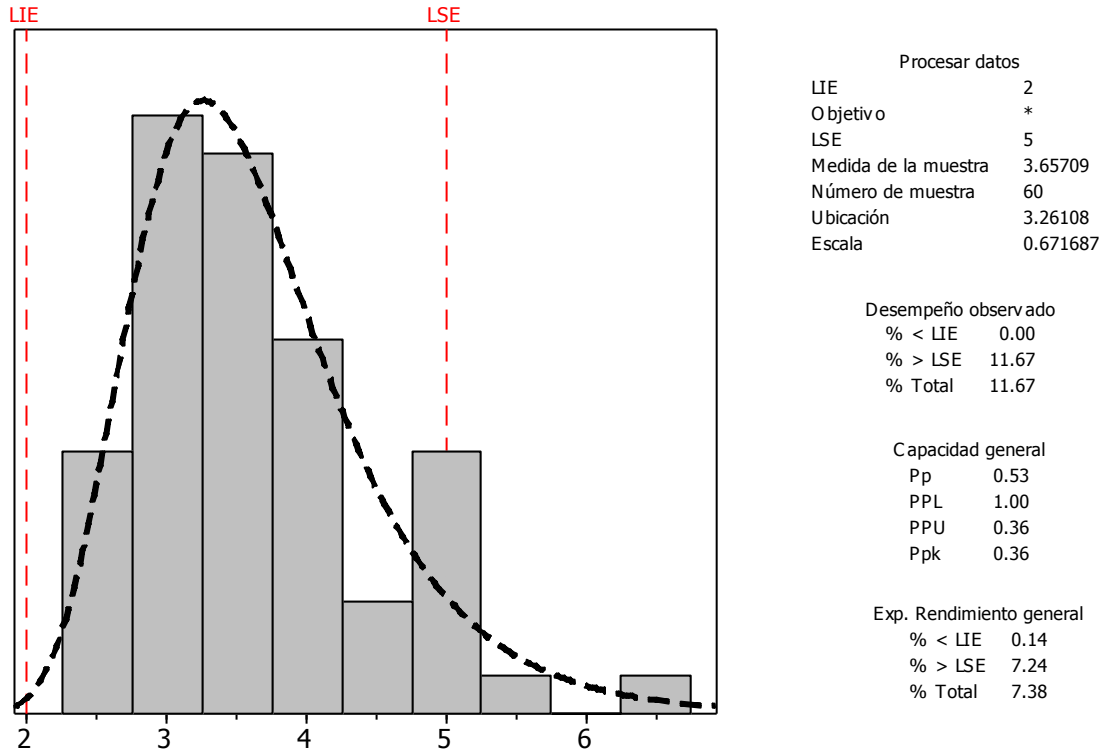


Figura 2. Capacidad del proceso de producción de nopal verdura basada en la carga microbiana (BMA). Cálculos basados en el modelo de distribución de valor extremo más grande (DVEG).

Fernandez-Escartín (2008) señala que el recuento de BMA que se detectó en este estudio muestra significados de contenido microbiano medio (3-4 UFC g⁻¹, respectivamente). Estos resultados superan la cuenta de BMA que encontraron Quevedo-Preciado *et al.* (2005) en nopal mínimamente procesado (< 3 log UFC g⁻¹). Sin embargo, la carga microbiana que se encontró en esta investigación, se aproxima a valores obtenidos en análisis realizados con otras hortalizas, como Johnston *et al.* (2006) quienes determinaron en promedio una carga de BMA de 4.0 a 7.9 log UFC g⁻¹, para productos mexicanos expendidos en los Estados Unidos. Si se considera la carga más alta de BMA que se determinó en esta investigación (4.15 ± 0.97 log UFC g⁻¹), no

se rebasan los límites máximos estipulados en los estándares nacionales e internacionales para productos vegetales frescos como los de Europa (España), donde el valor máximo tolerable en BMA es de 5.0 log UFC g⁻¹ (FNB *et al.*, 2003), en tanto que para México y de acuerdo a la NOM-251-SSA1-2009 (norma sustituida por la NOM-251-SSA1-2009), el límite máximo es 5.17 log UFC g⁻¹ para productos mínimamente procesados como ensaladas verdes o de frutas.

2.5.1.2 Cuenta de CT, detección de *E. coli* y *Salmonella*

De acuerdo al análisis estadístico en el recuento de CT, no existió diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los muestreos de marzo de 2008 a mayo de 2009 (Cuadro 6). La comparación de medias (Cuadro 7) señala que la cuenta de CT fue mayor en el tercer muestreo (0.79 ± 0.89 log NMP g⁻¹). *E. coli* estuvo presente en el muestreo seis, mayo de 2009 y no se encontró *Salmonella* en ninguna de las muestras (Cuadro 8).

Cuadro 6. Análisis de varianza para la cuenta de CT en nopal verdura de unidades de producción con SRRC en Otumba, México de marzo de 2008 a mayo de 2009.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F valor	Pr>F
Modelo	5	1.01423753	0.20284751	0.68	0.6405
Error	54	16.10805377	0.29829729		
Total	59	17.12229130			

correcto

Las desviaciones estándares que se obtuvieron en la cuenta de coliformes mostraron variabilidad, esto indicó que la carga microbiológica de los nopales entre los productores no fue homogénea, en especial para el tercer muestreo (0.79 ± 0.89 log

NMP g⁻¹) donde se hizo el mayor recuento. Esta diferencia de calidad microbiológica puede hacer vulnerable a las sociedades de productores que tienen implementado los SRRC, porque existe la probabilidad que de alguno de los integrantes mantenga procesos deficientes en la prevención, reducción y/o eliminación de contaminantes de tipo biológico y químico (SENASICA, 2010).

La cantidad de coliformes en este estudio, superan a los documentados por Quevedo-Preciado *et al.* (2005) en nopal mínimamente procesado, quienes obtuvieron como máximo 0.5 log NMP g⁻¹. No obstante, los niveles de estos microorganismos son relativamente inferiores a los que determinaron Johnston *et al.* (2006) para productos mexicanos expendidos (hierbas en su mayoría) en los Estados Unidos, cuyos niveles oscilaron entre 1.0-3.4 log UFC g⁻¹. En otros productos nacionales (chile y tomate), Avila-Quezada *et al.* (2008), coincide con este rango de datos al determinar de 2.4 a 3.1 log NMP mL⁻¹. De la misma forma, si se considera el nivel máximo de coliformes (2.0 log NMP g⁻¹) que establece la NOM-251-SSA1-2009 la calidad microbiológica de nopal verdura del municipio de Otumba con respecto a coliformes, se encuentran dentro de la normatividad. Otros países, como España e Israel permiten valores máximos de 5 log UFC g⁻¹ (FNB *et al.*, 2003).

Cuadro 7. Comparación de medias de la cuenta de CT en nopal verdura de unidades de producción con SRRC en Otumba, México de marzo de 2008 a mayo de 2009.

Agrupamiento Tukey	Media	N	Muestreo
A	0.7919	10	3 (Octubre 2008)
A			
A	0.6364	10	2 (Septiembre 2008)
A			
A	0.5403	10	4 (Mayo 2009))
A			
A	0.4979	10	6 (Junio 2008)
A			
A	0.4644	10	1 (Marzo de 2008)
A			
A	0.3907	10	5 (Enero de 2009)
A			

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

De igual manera que las BMA, las cuentas de CT se modelaron de forma individual en una distribución del valor extremo más grande, con una media de 0.55 y una desviación interna de $0.23 \log \text{NMP g}^{-1}$. De acuerdo al resultado del rendimiento general, solo el 0.11 % de los muestreos rebasó el límite permisible de CT. La carga de CT totales durante los 6 muestreos, se concentró hacia la izquierda con valores menores a $0.5 \log \text{NMP g}^{-1}$. Sin embargo, se puede observar la existencia de valores fuera del área de la distribución, lo que denota variabilidad en la calidad sanitaria con respecto a CT entre los productores (Figura 3). El índice de capacidad general del proceso considerando que $m=1$ y $M=2 \log \text{NMP g}^{-1}$ (FNB *et al.*, 2003), fue de -1.01 ($Ppk < 1.33$), lo que indica que la media (0.55NMP g^{-1}) se encontraba fuera del límite

inferior (Montgomery, 2006). En este rubro, se puede observar que el proceso permite el control de CT, aunque existe una tendencia a salir de control.

Cuadro 8. Calidad microbiológica de nopal verdura en Otumba, México durante marzo de 2008 a mayo de 2009.

No. muestreo	Fecha de muestreo	BMA (log UFC g ⁻¹)*	Coliformes totales (log NMP g ⁻¹)*	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>
1	Marzo 2008	3.22±0.27	0.46±0.42	Ausente	Ausente
2	Junio 2008	3.68±0.60	0.64±0.50	Ausente	Ausente
3	Septiembre 2008	3.97±1.00	0.79±0.89	Ausente	Ausente
4	Octubre 2008	4.15±0.97	0.54±0.51	Ausente	Ausente
5	Enero 2009	3.19±0.48	0.39±0.18	Ausente	Ausente
6	Mayo 2009	3.74±1.24	0.50±0.53	Presente	Ausente

*Media de determinación por triplicado con desviación estándar

E. coli se detectó en mayo de 2009 tras una confirmación con medios selectivos y pruebas bioquímicas. La presencia de esta bacteria permitió identificar la posibilidad de exposición del producto a heces fecales. Las unidades de producción certificadas no forman un área integrada, es decir, se encuentran en diferentes localidades y la mayoría de ellas colindan con unidades con sistemas de producción tradicionales, donde existe el riesgo de contaminación fecal por la aplicación de abonos no composteados. Estas unidades representan un gran riesgo de contaminación para la unidad certificada, ya que los patógenos como *E. coli* pueden diseminarse entre áreas aledañas si existen fuentes fecales persistentes (Riordan *et al.*, 2001). La contaminación por materia fecal, normalmente proviene por la cercanía de áreas de

producción pecuaria, aplicación directa de abonos y la irrigación con agua no potable (Uljas e Ingham, 2000). Las corrientes de aire y el polvo son otras vías de contaminación, en las que se puede transportar a *E. coli* y sus serotipos (Rosas *et al.*, 1997). Mientras que Wallace *et al.* (1997), señaló la posibilidad de que la defecación de pájaros es una fuente principal de contaminación para *E. coli* en los productos hortofrutícolas. También se considera como inóculo principal al manipulador del alimento durante la cosecha (Beuchat y Ryu, 1997).

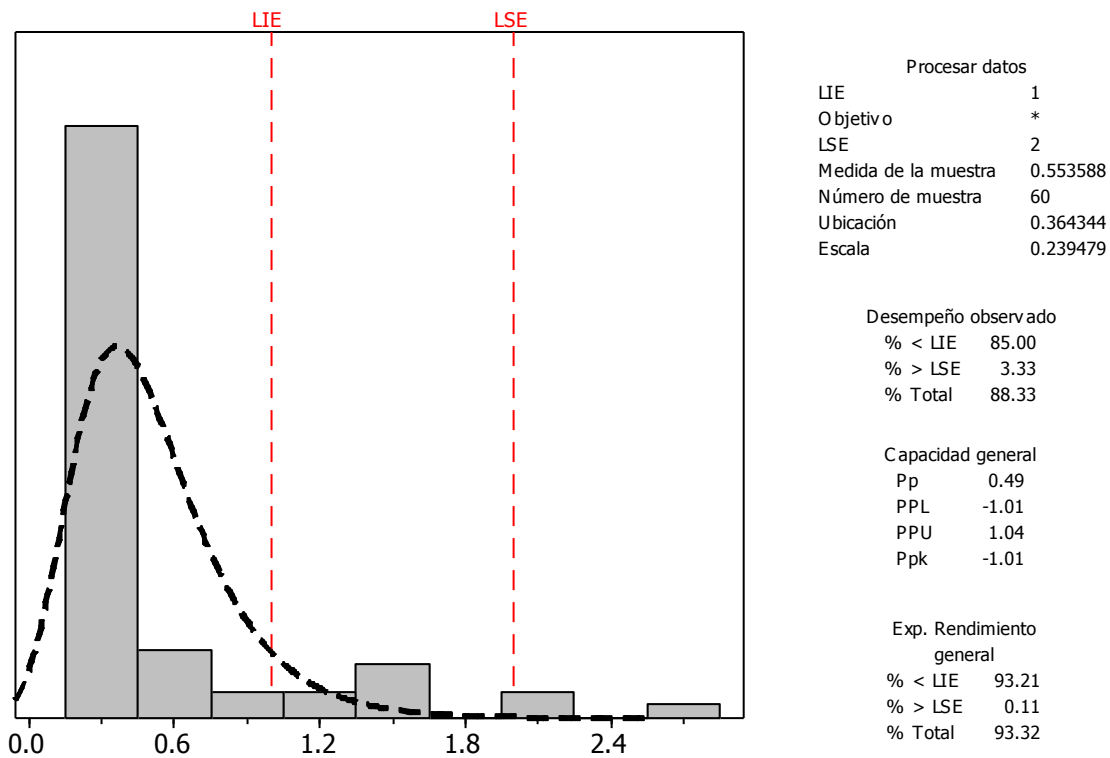


Figura 3. Capacidad del proceso de producción de nopal verdura basada en la cuenta de coliformes totales. Cálculos basados con en el modelo de distribución del valor extremo más grande.

Durante la detección de *Salmonella* se obtuvieron seis colonias sospechosas de los medio ASB (grises con brillo metálico), XLD (rosas), y Hektoen (colonias verdes).

Estas cepas fueron positivas en un 73 % a las once pruebas bioquímicas (Pascual y Calderón, 2000). En CHROMAgar Salmonella® crecieron colonias color azul y no púrpura (características de *Salmonella* en este medio). No hubo aglutinación con las pruebas serológicas. El análisis de identificación con PCR, demostró que ninguno de los lisados celulares de las cepas problema coincidió para el gen Stn (Figura 4).

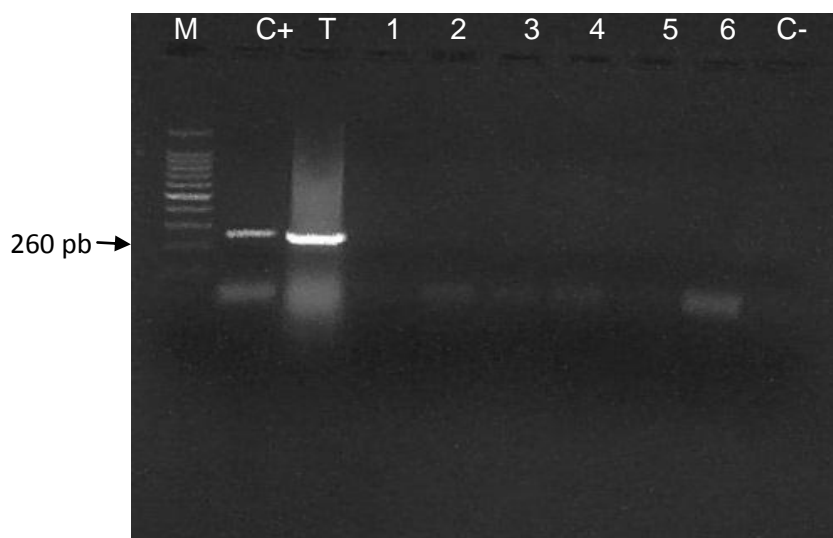


Figura 4. Identificación de *Salmonella* por PCR. M: marcador ADN 100 pb, C+: control positivo, T: testigo, 1 a 6: cepas aisladas durante el muestreo y C-: Control negativo.

En este estudio no se detectó la presencia de *Salmonella* en nopal verdura, sin embargo, Hernández *et al.*, (2009) documentaron por primera vez para productores de Tlalnepantla, Morelos, México, la presencia de *Salmonella typhimurium* y *javiana* en esta hortaliza. Ellos sugirieron que la contaminación de los cladodios pudo deberse al contacto del mismo con agua de riesgo y suelo contaminado. Diversos autores enfatizan que la presencia de *Salmonella* en suelos agrícolas se debe al uso de abonos de origen animal no composteados (Beuchat y Ryu, 1997; Natvig *et al.*, 2002; Beuchat, 2006; Franz and van Bruggen, 2008). Versión que puede ser respaldada por Flores-

Valdez (2003), quién señala que en las regiones productoras de nopal verdura, es común agregar una capa de 10 a 15 cm de estiércol fresco para incrementar la fertilidad del suelo. Otras causas comunes de contaminación de hortalizas por *Salmonella* en las unidades de producción, son cercanía con aguas residuales, escurrimientos de explotaciones ganaderas de contaminación, agua de riesgo contaminada por heces fecales y la presencia de animales domésticos y silvestres (Beuchat, 2006). También se incluye del uso de herramientas de trabajo y contenedores de cosecha contaminados, además de pobre higiene de manipuladores (Riordan *et al.*, 2001; Castillo *et al.*, 2004; Bowen *et al.*, 2006; Franz y van Bruggen, 2008).

Las cuentas de BMA, CT, baja prevalencia de *E. coli* y la ausencia de *Salmonella* en las unidades de producción de este estudio pueden atribuirse a la aplicación de Buenas Prácticas Agrícolas, Buenas Prácticas de Manejo y Buenas Prácticas de Higiene, que son las bases en los SRRC. Al respecto, existen investigaciones que demuestran que los productos hortofrutícolas obtenidos bajo la aplicación de SRRC exhiben bajos niveles microbiológicos comparados con los sistemas de producción convencional (Kokkinakis y Fragkiadakis, 2008; Leifert *et al.*, 2008; Pardo *et al.*, 2011).

En el proceso de producción de nopal de estudio es necesario identificar los puntos de contaminación durante el proceso, con la finalidad de prevenir la presencia de patógenos que pongan en riesgo al consumidor. De ser posible, evaluar toda la cadena de producción-comercialización para determinar las prácticas de manejo,

almacenamiento, distribución y comercialización que convengan en la reducción del riesgo de contaminación.

2.5.2 Detección de residuos de plaguicidas

Se detectaron residuos de clorpirifós etílico, ometoato, dimetoato, paratión metílico, malatión y bifentrina (Cuadro 9) Los meses donde se detectó mayor cantidad de aplicaciones fueron enero y mayo de 2009; mientras que en marzo y septiembre de 2008 no se encontraron residuos de plaguicidas.

De acuerdo a los productores de la región y técnicos del CESAVEM, las plagas que tienen mayor incidencia en la región y que tienen importancia económica son: picudo barrenador (*Cactophagus spinolae*) con elevadas densidades en mayo a agosto, tiempo en el cual se emplea malatión y paratión metílico para su control; picudo de las espinas (*Cylindrocopturus birradddiatus*), se encuentra en altas poblaciones entre abril a mayo y se utiliza paratión metílico para su control; otro insecto plaga es la chinche gris (*Chelinidea tabulatus*), está presente en todo el año pero sus poblaciones aumentan drásticamente de septiembre a diciembre, se combate con dimetoato; las infestaciones por chinche roja (*Hesperolabops gelastops*) se incrementan entre agosto y noviembre, se utiliza malatión para su control; la cochinilla (*Dactylopius indicus*), se presenta durante todo el año y se emplea clorpirifós etílico para su control; y para el thrips del nopal (*Sericothrips opuntiae*) se utiliza dimetoato y ometoato en los meses de febrero a abril.

Cuadro 9. Concentración de insecticidas encontrados en nopal verdura en Otumba, México en marzo de 2008 a mayo 2009.

Muestreo	Producto	Residuos detectados (mg kg ⁻¹)	^χ LMR (mg kg ⁻¹ d ⁻¹)	IDA (mg kg ⁻¹ d ⁻¹)	IDE (mg kg ⁻¹ d ⁻¹) 10 ⁻³
2 (Junio 2008)	Clorpirifós	0.054	0.05	0.10 ^ϕ	
	etílico				0.014
4 (Octubre 2008)	Clorpirifós	0.018	0.05	0.10 ^ϕ	
	etílico				0.0047
5 (Enero 2009)	Clorpirifós	0.030	0.05	0.10 ^ϕ	0.0079
	etílico	0.067			0.0176
		0.006			0.0016
	Ometoato	0.121	----	0.0003 [†]	0.0319
	Dimetoato	0.097	0.02	0.002 [†]	0.0256
	Paratión metílico	0.030	0.02	0.02 [♭]	0.0079
	Malatión	0.045	0.02	0.3 [‡]	0.0118
		0.011			0.0029
	Bifentrina	0.236	0.05	0.02 [§]	0.0622
6 (Mayo 2009)	Malatión	0.045	0.02	0.3 [‡]	0.0118
	Clorpirifós	0.150	0.05	0.10 ^ϕ	0.0395
	etílico	0.07			0.0184

IDA: Ingesta Diaria Aceptable, IDE: Ingesta Diaria Estimada, ^χ LMR: Límite Máximo de Residuos para tuna en la Unión Europea (EC, 2011), ^ϕFAO-WHO (2000), [‡]FAO-WHO (1998), [†] FAO-WHO (1997), [§] FAO-WHO (1993), [♭] FAO-WHO (1996).

El uso de malatión y paratión metílico contra estas plagas en la República Mexicana ya ha sido documentado por Badii y Flores (2001). Aldama-Madrid *et al.* (2008), confirmaron que estos productos se aplican en el cultivo de nopal al determinar la presencia de residuos de malatión (0.014 mg kg⁻¹) y paratión metílico (0.013-0.044

mg kg⁻¹), además de clorpirifós etílico (0.002-0.017 mg kg⁻¹), y diazinon (0.011-0.132 mg kg⁻¹) en nopal fresco de Hermosillo, Sonora. Al respecto, Flores-Valdez (2003), señala que en algunas zonas productoras de nopal verdura, se hacen aplicaciones masivas de plaguicidas, de los cuales están restringidos en México y prohibidos en los países potenciales de exportación. En México no existen productos autorizados para su uso en nopal verdura y en la mayoría de los casos los productores eligen el producto a utilizar basándose en la plaga problema. Sin embargo, países como Estados Unidos de América (EUA) sí contemplan productos para nopal, en este caso la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) tiene autorizado el uso de carbaril, diurón, glifosato y metaldehído con límites de residuos de 12, 0.05, 0.5 y 0.07 mg kg⁻¹, respectivamente (EPA, 2011). Este organismo restringe el uso de clorpirifós etil, bifentrina y paratión metílico y no contempla en su lista de productos autorizados a ometoato. La Unión Europea no tiene productos autorizados para nopal, pero sí para tuna, dentro de este grupo permite el uso de bifentrina, dimetoato, clorpirifós etílico, malatión y paratión metílicos con límites de tolerancia de 0.05, 0.02, 0.05, 0.02 y 0.02 mg kg⁻¹, respectivamente (EC, 2011). Mientras que FAO no tiene productos autorizados para esta hortaliza y en su lista de productos permitidos para otros alimentos no incluye a ometoato (FAO/OMS, 2010).

Si se considerarán los LMR que permite la Unión Europea para tuna, se puede observar que en el muestreo cinco (Cuadro 9), todos los productos aplicados (clorpirifós etílico, ometoato, dimetoato, paratión metílico, malatión y bifentrina) rebasaron estos límites, lo mismo sucedió en mayo con malatión y clorpirifós etílico. Al evaluar el riesgo toxicológico para la población, se determinó que la suma de la IDE

durante el muestreo fue de $0.00022 \text{ mg kg}^{-1}$, mientras que la IDA resultó de 1.04 mg kg^{-1} . Esta diferencia indica que la IDE es solo el 0.02% de la IDA, el riesgo toxicológico para el consumidor de nopal por los insecticidas que se aplican en esta región puede considerarse como mínimo (Aldama-Madrid *et al.*, 2008). Ambas ingestas pueden utilizarse para determinar el índice de peligro, según Tsakiris *et al.*, (2011) este factor puede calcularse dividiendo IDE sobre IDA, si el resultado excede a 1 el riesgo toxicológico es alto, para el caso de nopal verdura de Otumba se obtiene un resultado menor a la unidad (0.0002). Sin embargo, la detección de plaguicidas no autorizados y que exceden los LMRs en un SRRC, indica que el sistema de producción tiene la probabilidad de presentar riesgo toxicológico, por ello debe de asegurarse que los productores integrantes cumplan con los requerimientos establecidos en el SRRC y al mismo tiempo implementar un programa de monitoreo de plaguicidas. Al respecto, Pardo *et al* (2011) señalaron que la presencia de residuos de plaguicidas en el producto, hace que la etapa de recepción sea un punto crítico de control, debido a que no hay posibilidad de aplicar medidas correctivas para reducir el peligro de contaminación.

2.6. CONCLUSIÓN

El 7.24 % de las muestras, excedieron el límite microbiológico en cuanto al número de BMA y el 0.11 % no cumplieron con las normas para CT. Adicionalmente, *Escherichia coli* solo estuvo presente en el muestreo de mayo del 2009 y no se detectó en ninguna muestra la presencia de *Salmonella*. Por otra parte, se encontró que el 42 % de las muestras de nopal contenían residuos de clorpirifós etílico, ometoato, dimetoato, paratión metílico, malatión y bifentrina, productos no autorizados en México, E.U.A y Comunidad Económica Europea. Finalmente, se concluye que la implementación de Sistemas de Reducción de Riesgos de Contaminación, reduce el riesgo de contaminación por microorganismos y la incidencia de contaminación por residuos de plaguicidas.

2.7 LITERATURA CITADA

- Aldama-Madrid M. L., García-Moraga Ma. del C., Rodríguez-Olibarria G., Silveira-Gramont Ma. I. y Valenzuela-Quintanar A. I. 2008. Determinación de insecticidas organofosforados en nopal fresco y deshidratado. *Rev. Fitotec. Mex.* 31(2):133-139.
- ANMAT. 2005. Guía de Interpretación de Resultados Microbiológicos de Alimentos. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. Argentina. 21 p.
- Ávila-Quezada G., Sánchez E., Muñoz E., Martínez L. R. y Villalobos E. 2008. Diagnóstico de la calidad microbiológica de frutas y hortalizas en Chihuahua, México. *Phyton (B. Aires)*. 77:129-136.
- Ávila-Quezada G., Sánchez E., Gardea-Béjarb A. A. and Acedo-Félix E. 2010. *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*: survival and growth in plant tissue. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 38(2):47-55
- Badii M.H and Flores A. E. 2001. Prickly pear pests in Mexico. *Florida Entomol.* 84(4):503-505.
- Berger H., Rodríguez A. y Galletti L. 2006. Operaciones de campo para la utilización agroindustrial de los nopales. In: Utilización Agroindustrial del nopal. C. Rosell (ed). Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO No. 162. Roma, Italia. 24 p.
- Beuchat L. R. 2006. Vectors and conditions for preharvest contamination of fruits and vegetables with pathogens capable of causing enteric diseases", *Br. Food J.* 108(1):38-53.
- Beuchat L. R and Ryu J. H. 1997. Produce Handling and Processing Practices. *Emerg. Infect. Dis.* 3(4):459-465.
- Beuchat L. R. and Scouten A. J. 2002. Combined effects of water activity, temperature and chemical treatments on the survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. *J. Appl. Microbiol.* 92:382-395.
- Bowen A., Fry A., Richards G. and Beauchat L. 2006. Infections associated with cantaloupe consumption: a public health concern. *Epidemiol. Infect.* 134:675-685.
- Callejas-Juárez N., Matus-Gardea J. A., García-Salazar J. A., Martínez-Damián M. Á. y Salas-González J. M. Situación actual y perspectivas de mercado para la tuna, el nopalito y derivados en el Estado de México, 2006. *Agrociencia* 43(1):73-82.
- Castillo A., Mercado I., Lucia M. L., Martínez R. Y., De León P. J., Murano A. E., and Acuff R. G. 2004. *Salmonella* contamination during production of cantaloupe: a binational study. *J. Food Prot.* 67(4):713-720.

- Chang S. F., Hsieh C. L., Yen G. C. 2008. The protective effect of *Opuntia dillenii* Haw fruit against low-density lipoprotein peroxidation and its active compounds. *Food Chem.* 106:569–575.
- Cohen N., Ennaji H., Bouchrif B., Hassar M. and Karib H. 2007. Comparative Study of Microbiological Quality of Raw Poultry Meat at Various Seasons and for Different Slaughtering Processes in Casablanca (Morocco). *J. Appl. Poult. Res.* 16:502–508
- EC. 2011. Pesticide EU-MRLs. EU Pesticides database. European Comission. Regulation (EC) No.396/2005. En línea: http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=homepage&CFID=332659&CFTOKEN=9a5cd41de0a2817c-FAB2141C-B364-9BFE-8E9F0C0B7502D74E&jsessionid=3607c8b31a4d6c0e71d3. (Consulta 30 de agosto de 2011).
- EPA. 2011. Title 40: Protection of Environment. Code of Federal Regulations. United States Environmental Protection Agency. En línea: http://ecfr.gpoaccess.gov/cgi/t/text/text-idx?c=ecfr&sid=1c8cd959ef0d373fb7620f42c8445cca&tpl=/ecfrbrowse/Title40/40cfr180_main_02.tpl. (Consulta 30 de agosto de 2011).
- FAO/OMS. 2010. Residuos de plaguicidas en los alimentos y piensos. Índice de plaguicidas. Codex Alimentarius. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Organización Mundial de la Salud. En línea: <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/index.html>. (Consulta 30 de agosto de 2011).
- FAO-WHO. 1993. Pesticide residues in food -1992. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group. FAO plant production and protection paper, 118. Rome, Italy. 886 p.
- FAO-WHO. 1996. Pesticide residues in food -1995. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group. FAO plant production and protection paper, 133. Rome, Italy. 237 p.
- FAO-WHO. 1997. Pesticide residues in food -1996. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group. FAO plant production and protection paper, 140. Rome, Italy. 120 p.
- FAO-WHO. 1998. Pesticide residues in food -1997. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group. FAO plant production and protection paper, 145. Rome, Italy. 250 p.

- FAO-WHO. 2000. Pesticide residues in food -1999. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group. FAO plant production and protection paper, 153. Rome, Italy. 293 p.
- Fernández Escartin, E. 2008. Microbiología e inocuidad de los alimentos, México, 2da. Ed. Universidad Autónoma de Querétaro, Qro. 967 p.
- Flores Valdez C. A. 2003. Producción y comercialización de nopalitos. In: Nopalitos y Tunas. C. A. Florez-Valdez. Universidad Autónoma Chapingo-CIESTAAM-Programa Nopal. 19-37 pp.
- Food and Nutrition Board (FNB), Institute of Medicine (IOM), Earth and Life Studies (DELS) & Board on Agriculture and Natural Resources (BANR). 2003. *Scientific Criteria to Ensure Safe Food*, National Academies Press. 369 p.
- Franz E. and van Bruggen A. H. C. 2008. Ecology of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* enteric in the Primary Vegetable Production Chain. Crit. Rev. Microbiol. 34:143-161.
- González-Flores M. y Rojas-Herrera R. A. 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. Salud Pública de México. 47(5): 388-390.
- Gorris L. G. M. 2006. Food safety objective: An integral part of food chain management. Food Control 16:801-809
- Henao S. y Arbelaez M. P. 2001. Sistema de Vigilancia Epidemiológica para Intoxicaciones Agudas por Plaguicidas. Bol. Epidem. 22(4). Organización Panamericana de la Salud-Organización Mundial de la Salud.
- Hernandez, A.M., Landa, P., Mora-A, G., Eslava, A., Call, J.E., Porto Fett, A.C., Luchansky, J.B. 2009. Characterization of *Salmonella* spp. from nopal leaves and associated soil and water samples in Morelos, Mexico. [abstract]. Int. Assoc. Food Protect. p.1.
- ICMSF. 2002. Microorganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Management. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Kluwer. Academic/Plenum Publishers (ed). New York, USA. 362 p.
- Johnston L. M. Jaykus L.-A. and Moll D. 2006. A field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin. International J. Food Microbiol. 112:83–95.
- Kokkinakis E., Boskou G. and Kokkinak A. 2008. Changes in vegetable microbiological quality introduced by processing methods. Int J Food Sci. Tech. 43:603-609.
- Kroupitski Y., Golberg D., Belausov E., Pinto R., Swartzberg D., Granot D. and Sela S. 2009. Internalization of *Salmonella enterica* in Leaves Is Induced by Light and

- Involves Chemotaxis and Penetration through Open Stomata. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(19):6076-6086.
- Leifert C., Ball K., Volakakis N., Cooper J. M. 2008. Control of enteric pathogens in ready-to-eat vegetable crops in organic and 'low input' production systems: a HACCP-based approach. *J. Appl. Microbiol.* 105:931-950.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2007. Ley Federal de Sanidad Vegetal Diario Oficial de la Federación.
- Makino S., Kurazono H., Chongsanguam M., Hayashi H., Cheun H. I. Suzuki S. and Shirahata T. 1999. Establishment of the PCR System Specific to *Salmonella* spp. and Its Application for the Inspection of Food and Fecal Samples. *J. Vet. Med. Sci.* 61(11): 1245–1247.
- Montgomery D. C. 2006. Control estadístico de la calidad. Tercera edición. México. Editorial Limusa Wiley. 797 p.
- Natvig E. E., Ingham S. C., Ingham B. H., Cooperband L. R. and Roper T. R. 2002. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Escherichia coli* Contamination of Root and Leaf Vegetables Grown in Soils with Incorporated Bovine Manure. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(6):2737-2744.
- Nefzaoui A., Nazareno M, and El Mourid M. 2008. Review of Medicinal Uses Of Cactus. *Cactus Newsletter.* 11:3-17.
- O'Toole G, HB Kaplan and R Kolter. 2000. Review. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 49-79.
- Pascual A. M. R., y Calderón P. V. 2000. Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. 2a. ed. Editorial Díaz de Santos S.A. Madrid, España. 464 p.
- Pardo J.E., Peñaranda J. A., Álvarez-Ortí M., Zied D. C and Pardo A. 2011. Application of the hazard analysis and critical control point (HACCP) system on the mushroom processing line for fresh consumption. *Ital. J. Food Sci.* 23:126-135.
- Pavan da Silva S. R.; Frizzo-Verdin S. A., Pereira D. C., Schatkoski A. M., Rott M. B. and Corção G.. 2007. Microbiological quality of minimally processed vegetables sold in Porto Alegre, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 38:594-598.
- Piga, A. 2004. Cactus pear: A fruit of nutraceutical and functional Importance. *J.PACD.* 9-22.
- Quevedo-Preciado K. L., Villegas-Ochoa M. A., González-Ríos H., Rodríguez-Félix A. 2005. Calidad de nopal verdura mínimamente procesado. Efecto de temperatura e inhibidores del oscurecimiento. *Rev. Fitot. Mex.* 28(03):261-270.

- Riordan D, Sapers G, Hankison T, Magee M, Mattrazzo A, Annous B. 2001. A study of US orchards to identify potential sources of *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot.* 2001; 64: 1320–1327.
- Rodriguez-Fragoso L., Reyes-Esparza J., Burchiel S. W., Herrera-Ruiz D. and Torres E. 2008. Risks and Benefits of Commonly used Herbal Medicines in México. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 227(1): 125–135.
- Rosas I., Salinas E., Yela A, Calva E., Eslava C. and Cravioto A. 1997. *Escherichia coli* in settled-dust and air samples collected in residential environments in Mexico City. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(10):4093-4095.
- Sáenz-Hernández, C., Corrales-García, J., Aquino-Pérez, G. 2002. Nopalitos, mucilage, fiber, and cochineal. In: Nobel, P. S. (Ed.), *Cacti. Biology and Uses*, University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London 2002, pp. 211–234.
- Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994. Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.
- Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.
- Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios.
- SENASICA. 2010. Lineamientos generales para la operación y certificación de sistemas de reducción de riesgos de contaminación en la producción primaria de alimentos de origen agrícola. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.
- Tsakiris, I. N., Toutoudaki, M., Kokkinakis, M., Paraskevi, M. and Tsatsakis, A. M. 2011. A Risk Assessment Study of Greek Population Dietary Chronic Exposure to Pesticide Residues in Fruits, Vegetables and Olive Oil. In: *Pesticides - Formulations, Effects, Fate*. Stoytcheva M. (editor). InTech. 253-268 pp.
- Uljas H. E. and Ingham S. C. 2000. Survey of apple growing, harvesting and cider manufacturing practices in Wisconsin: implications for safety. *J. Food Saf.* 20:85-100.
- Valenzuela A. I., Picó Y. and Font G. 2001. Determination of Five Pesticide Residues in Oranges by Matrix Solid-Phase Dispersion and Liquid Chromatography to Estimate Daily Intake of Consumers. *J. AOAC Int.* 84(3):901-909.
- Wallace J. S., Cheasty T. and Jones K. 1997. Isolation of vero cytotoxyn-producing *Escherichia coli* O157:H7 from wild birds. *Appl. Microbiol.* 82:399-404.
- Whiting, R.C., A. Rainosek, R. L. Buchanan, M. Miliotis, D. LaBarre, W. Long, A. Ruple and S. Schaub. 2006. Determining the microbiological criteria for lot rejection from the performance objective or food safety objective. *Int. J. Food Microbiol.* 110: 263–267.

Zúñiga-Estrada A., Tejeda-Trujillo F., Concha-Valdéz F., Heredia-Rojas N. 2006.
Microbiología sanitaria. Rev. Mex. Microbiol. 48(2):226 - 230

CAPITULO III

SOBREVIVENCIA DE *Salmonella* y *Escherichia coli* en nopal verdura y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENOLICOS EN NOPAL [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill] var. Atlixco Y PERICARPIO DE TUNA (*Opuntia albicarpa* Scheinvar) var. Alfajayucan y Villanueva

3.1 RESUMEN

Durante el manejo postcosecha de nopal verdura, pueden existir condiciones antihigiénicas que representen riesgos para la contaminación de la hortaliza por patógenos como *Salmonella* y *Escherichia coli*. Esto puede acentuarse por la carencia, en la mayoría de los centros de distribución en México, de sistemas de enfriamiento durante la comercialización y distribución del nopal. No existe información con respecto a brotes de enfermedades transmitidas por ingesta de alimentos, que se hayan atribuido al consumo de nopal verdura. En este trabajo se determinó la sobrevivencia de *Salmonella* y *Escherichia coli* en nopal desespinado y con espinas a 4 y 18 °C durante dieciséis días. Se encontró que *Salmonella* fue recuperada hasta el día dieciséis en ambas temperaturas y acondicionamiento de nopal, mientras que *E. coli* no sobrevivió al periodo de almacenamiento en nopal pelado y a 4 °C durante el periodo evaluado. Posteriormente, por cromatografía de Alta resolución (HPLC) se determinó la presencia de compuestos fenólicos en cladodios de nopal 'Atlixco' y pericarpios de tuna 'Alfajayucan' y 'Villanueva', que pudieran inhibir la capacidad de sobrevivencia de las bacterias en la hortaliza. Los compuestos fenólicos principales en cladodio de nopal fue ácido caféico (41.32 mg g⁻¹) y ácido protocatéquico (24.03 mg 100 g⁻¹). En pericarpio de

ambas tunas, fue ácido protocatéquico (118.40 y 22.36 mg 100 g⁻¹), seguido de ácido caféico (50.64 y 4.17 mg 100 g⁻¹) y quercitina con (4.50 y 2.75 mg 100 g⁻¹).

Palabras clave: *Salmonella*, *Escherichia coli*, nopal, compuestos fenólicos

3.2 ABSTRACT

During cactus leaves postharvest handling, unsanitary conditions may exist and permit *Salmonella* and *Escherichia coli* contamination of this vegetable. This risk can rise by the cooling systems lack in marketing and distribution. However, there is not information about foodborne disease outbreak attributed to nopal consumption. In this study, was investigated *Salmonella* and *Escherichia coli* survival in cactus leaves with thorns and peeled to 4 and 18 ° C for sixteen days. *Salmonella* was recovered until sixteen day in both temperatures and cactus leaves conditions, while *E. coli* did not survive in peeled cactus leaves to 4 ° C during the evaluation period. Subsequently, was determined and quantified the phenolic compounds in cactus pads "Atlixco" and 'Alfajayucan' and 'Villanueva' pericarps prickly pear by high resolution chromatography (HPLC). In according whit some authors, these compounds can inhibit the bacteria survival in vegetables and fruits. The principal phenolic compounds of cactus cladode were caffeic acid (41.32 mg g⁻¹) and protocatechuic acid (24.03 mg 100 g⁻¹). In both pericarps prickly pear the protocatechuic acid was the main compound (118.40 and 22.36 mg 100 g⁻¹), other compounds were caffeic acid (50.64 and 4.17 mg 100 g⁻¹) and quercetin (4.50 and 2.75 mg 100 g⁻¹).

Keywords: *Salmonella*, *Escherichia coli*, cactus leaves, phenolic compounds

3.3 INTRODUCCIÓN

En nopal verdura, una de las etapas con alto riesgo de contaminación es el empacado de la hortaliza. De acuerdo con Flores (2003), esta actividad se realiza en recipientes como canastas de carrizo, en cajas, arpilllas o bien puestas a granel en las camionetas que transportan la mercancía a los puntos de venta. La mayoría del nopal que se distribuye para los centros de abasto se comercializa en fresco con espinas, solo una pequeña proporción se desespina para enviar el producto a centros comerciales, mercados y tianguis, cuyos periodos de comercialización son de aproximadamente de tres días (Valencia-Sandoval, 2010; Rodriguez-Felix y Villegas-Ochoa, 1998). Aunque no ha sido documentado, dos de los principales problemas en la cadena de comercialización de nopal verdura, son la carencia de sistemas de frío y el manejo poco higiénico que se le da en punto de venta, principalmente en los contenedores, utensilios de desespinado e instalaciones. Todas estas condiciones permiten que el nopal sea expuesto a contaminación por patógenos que se transmiten por alimentos (Franz y van Bruggen, 2008). Este trabajo tuvo el propósito de determinar si *Salmonella* y *Escherichia coli* una vez que se han invadido los cladodio de nopal desespinado y con espinas, tienen la capacidad de sobrevivir a temperatura de refrigeración (4 °C) y ambiental (18 °C). Por otra parte, se procedió a determinar si el nopal presentaba compuestos fenólicos que inhibieran la capacidad de sobrevivencia de las bacterias en la hortaliza, tal como lo documentan diversos autores que señalan la presencia de compuestos fenólicos con potencial bactericida en el género *Opuntia* (Chang *et al.*, 2008; Ndhlala *et al.*, 2007; Kuti, 2004).

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Evaluación de la sobrevivencia de *Salmonella* y *E. coli*

3.4.1.1 Inóculo

Se utilizó una cepa de *Salmonella* sp. (C-4153) donada por el Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) y una cepa de *Escherichia coli* proporcionada por el laboratorio de microbiología del Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Autónoma Chapingo. Para ambas cepas, se prepararon 50 mL de caldo nutritivo (DIFCO®) y se llevaron a incubación a 35°C por 27 h. La concentración inicial de la solución bacteriana de *Salmonella* sp. y *E. coli* fue de 2.96 y 2.89 log UFC mL⁻¹.

3.4.1.2 Preparación e inoculación de cladodios

Los cladodios se sumergieron en una solución al 1% de NaClO por dos minutos para su desinfección y se colocaron en un área aséptica. Se prepararon 4 lotes de 36 nopales que consistieron: a) nopales con espinas colocados a 4°C (temperatura de refrigeración), b) con espinas a 18°C (temperatura ambiente), c) sin espinas a 4 °C y d) sin espinas a 18°C. El desespinado se realizó en condiciones asépticas.

Se trazaron círculos de 2 cm de diámetro sobre la superficie de los cladodios y con la ayuda de un asa microbiológica estéril, se procedió a inocular el área con la solución bacteriana. Los cladodios se empacaron individualmente en una película plástica Ziploc®. Se hicieron evaluaciones de sobrevivencia de *Salmonella* y *E. coli* por triplicado en los días 0, 3, 6, 8, 10, 12, 14 y 16.

3.4.1.3 Determinación de sobrevivencia de *Salmonella* y *E. coli*.

Los cladodios se sacaron de la bolsa Ziploc® y se recortó el área inoculada, que inmediatamente se transfirió a otra bolsa estéril, donde se procedió a hacer un lavado con agua peptonada al 0.8%. Para la siembra en placa de las dos bacterias, se utilizó la dilución 10⁵. Para determinar la sobrevivencia de *Salmonella* se utilizó Agar Enterico Hektoen (BBL/DIFCO®) y Agar Eosina-Azúl de Metileno (EMB) [Merk®] para *E. coli*. La incubación se llevó a 37 °C por 24 horas y se contabilizaron las UFC. Los resultados se expresaron en log UFC.

3.4.1.4 Diseño experimental y análisis estadístico

El modelo experimental consistió en un diseño factorial 2² para conocer la influencia de la presentación de nopal y temperatura sobre la sobrevivencia de *Salmonella* y *E. coli*, para cada factor se establecieron dos niveles (desespinado y con espinas; 4 y 18 °C). Las evaluaciones se realizaron durante 7 intervalos de tiempo (3, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 días) con nueve repeticiones. Se realizó un análisis de varianza de medidas repetidas (p≤0.001) y comparación de medias mediante el programa SAS 9.1 (SAS Institute Inc., 2002). El modelo que se utilizó para el análisis fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \underbrace{\tau_i + \delta_i + \lambda_j + \lambda\delta_{ij}}_{\text{Variación entre los factores}} + \underbrace{\omega_k + \omega\delta_{ki} + \omega\lambda_{kj} + \omega\delta\lambda_{kij}}_{\text{Variación dentro de los factores}} + \varepsilon_{ij}$$

Donde, Y_{ijkl} es la l-ésima observación del k-ésimo tiempo con la j-ésima presentación de nopal en la i-ésima temperatura

μ = es la media general

τ_i = es la i-ésima temperatura, $i = 1, 2$

$\bar{\delta}_j$ = es la j-ésima presentación de nopal, $j=1,2$

ω_k = es el k-ésimo tiempo, $k=1,2,3,4,5,6,7$

$\lambda\bar{\delta}_{ij}$ = es el efecto sobre la media causado por la interacción del nivel i de τ y el nivel j de $\bar{\delta}$

$\omega\bar{\delta}\lambda_{kij}$ = es el efecto sobre la media causado por la interacción del nivel i de τ , el nivel j de $\bar{\delta}$ y el nivel k de ω

ε_{ijkl} = es el error asociado tal que $\varepsilon_{ijkl} \sim N(0, \sigma^2)$.

3.4.2. Cuantificación de compuestos fenolicos

3.4.2.1 Material vegetal

Se adquirieron cladodios de nopal *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill var. Atlixco y tunas de *Opuntia amyclaea* T. var. Alfajayucan y Villanueva. La madurez de consumo a la cosecha de ambas tunas fueron diferentes. La primera variedad presentaba el 30 % de color amarillo y la segunda el 80 %. En el caso de los cladodios, éstos se encontraban en su madurez hortícola. Los pericarpios de las tunas y cladodios de nopal, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron en un ultracongelador (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) a -70 °C.

3.4.2.2 Reactivos

Se empleó reactivo Folín-Ciocalteau (Hycel[®], México), estándares ácido gálico, protocatéquico, 4-hidroxibenzoico, caféico, felúrico, clorogénico, siríngico, p-coumárico y sinápico; epicatequina, quercitina y 4-hidroxibenzaldehído de Sigma Chemical Co.;

metanol y etanol grado HPLC de High Purity Standars; acetonitrilo y grado HPLC de Merck Co.

3.4.2.3 Preparación de la muestra

Después de diversas pruebas, se obtuvo que la máxima extracción de compuestos fenólicos en cladodios de nopal fue: temperatura, 60 °C; solvente, MeOH; materia vegetal 10 g y tiempo: 5 h. Mientras que para los extractos de pericarpio de tuna 'Alfajayucan' y 'Villanueva' el contenido fenólico más alto se detectó con: 60 °C, MeOH, 6 g, 3 h y 40 °C, EtOH, 10 g, 1 h, respectivamente. De la misma forma, se determinó que los extractos mantenían su mayor estabilidad fenólica a lo largo de cuatro meses en las siguientes circunstancias, para cladodios de nopal fue 20 °C y 5 °C, respectivamente; ambos casos en condiciones de oscuridad.

3.4.2.4 Determinación de compuestos fenólicos

Para el contenido de fenoles totales, se utilizó como estándar a ácido gálico. La técnica empleada fue Folin-Ciocalteu (Kuskoski *et al.*, 2005) y consistió en colocar 20 µL del extracto vegetal en 1580 µL de agua destilada y con la adición de 100 µL de reactivo Folin-Ciocalteu. La solución se agitó por un minuto en el vortex (Thermolyne, Maxi Mix II, USA) y se dejó reposar por ocho min. Pasado este tiempo se añadió 300 µL de solución carbonato de sodio al 20% (p/v), y se llevó a baño maría durante 30 min. Transcurrido este tiempo se efectuó la lectura de absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro (Bio Mate 3, USA). Los fenoles totales se expresarán en términos de cantidades equivalentes de ácido gálico. Cada determinación se realizó por triplicado.

3.4.2.5 Identificación de ácidos fenólicos por HPLC

Los extractos de nopal, tuna 'Alfajayucan' y 'Villanueva' se separaron y caracterizaron en un cromatógrafo HPLC (Agilent serie 1100, USA) equipado con sistema de bombas cuaternarias, un inyector con válvula Reodyne con un loop de 20 μL de capacidad y columna (Alltech Lichrosorb C18, 5 μm , 25 x 4.6 mm) Se utilizaron dos fases móviles A: agua: ácido acético (98:2 v/v) y B: agua: acetonitrilo: ácido acético (68:30:2), cada una de ellas se filtró a través de membranas Varian[®] de 47 μm . Siguiendo la metodología de Ndhlala *et al.* (2007), el gradiente del disolvente B fue 0% al inicio, posteriormente se incrementó hasta el 80% a los 55 min y manteniéndolo a 80% hasta los 70 min, finalmente baja a 0% de B a los 80 min. La temperatura de corrida fue de 30 °C y el flujo fue de 2 ml min⁻¹. Para la detección de los compuestos fenólicos, se utilizó un detector UV (Thermo Separations Products, USA) a una longitud de onda de 280 nm.

Para la identificación se preparan soluciones de estándar (0.02 mg mL⁻¹) de ácido gálico, protocatéquico, 4-hidroxibenzoico, caféico, felúrico, clorogénico, siríngico, ρ -coumárico, sinápico, (-) epicatequina y quercitina al usando como disolvente metanol grado HPLC (p/v). Cada estándar se inyectó al cromatógrafo por triplicado en cantidades de 20 μL . Se obtuvieron tiempos de retención y áreas bajo la curva para su posterior comparación con los extractos. Finalmente los estándares fueron mezclados e inyectados al HPLC con la finalidad de corroborar los tiempos de retención y áreas.

Las muestras de nopal y tuna se inyectaron al cromatógrafo bajo las mismas condiciones de los estándares. Para determinar los compuestos fenólicos en las muestras se compararon los tiempos de retención similares con los estándares.

3.4.2.6 Cuantificación de Compuestos fenólicos

Se cuantificó la concentración de compuestos fenólicos con base a una curvas estándar de ácido gálico (R=0.9972), protocatéquico (R=0.9913), 4-hidroxibenzoico (R=0.9890), caféico (R=0.9837), felúrico (R=0.9920), clorogénico (R=0.9967), siríngico (R=0.9812), p-coumárico (R=0.9955), sinápico (R=0.9672), (-)epicatequina (R=0.9932) y quercitina (R=0.9947). Las pruebas se hicieron por triplicado.

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1 Evaluación de la sobrevivencia de *Salmonella* y *E. coli*

Los datos obtenidos en el análisis estadístico, indicaron que el efecto de temperatura y presentación del nopal, así como la interacción de ambos factores es significativo ($p < 0001$) sobre la sobrevivencia de *Salmonella* (Cuadro 10) y *E. coli* (Cuadro 11).

De la misma forma, el ANOVA mostró que el tiempo de almacenamiento y las interacciones de este factor con temperatura, almacenamiento y temperatura-almacenamiento influyeron de forma significativa dentro de la sobrevivencia de *Salmonella* (Cuadro 12) y *E. coli* (Cuadro 13).

Cuadro 10. ANOVA de medidas repetidas, efecto entre factores en la sobrevivencia de *Salmonella*.

Fuente	DF	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Temperatura	1	30.02934366	11507.6	<.0001
Presentación de nopal	1	7.33903835	2812.40	<.0001
tem*trat	1	5.64173690	2161.97	<.0001
Error	32	0.00260953		

Cuadro 11. ANOVA de medidas repetidas, efecto entre factores en la sobrevivencia de *E. coli*.

Fuente	DF	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Temperatura	1	251.7188354	7265.99	<.0001
Presentación de nopal	1	73.9027716	2133.24	<.0001
tem*trat	1	51.3454676	1482.11	<.0001
Error	32	0.0346434		

Cuadro 12. ANOVA de medidas repetidas, efecto del tiempo, temperatura y presentación de nopal en la sobrevivencia de *Salmonella*.

Fuente	DF	Cuadrado de la media	F-Valor	Adj Pr > F		
				Pr > F	G - G	H - F
Tiempo	6	8.19513320	4329.35	<.0001	<.0001	<.0001
Tiempo*Temperatura	6	0.65216410	344.53	<.0001	<.0001	<.0001
Tiempo*Presentación de nopal	6	0.42566769	224.87	<.0001	<.0001	<.0001
Tiempo*Temperatura* Presentación de nopalm	6	0.23070983	121.88	<.0001	<.0001	<.0001
Error(time)	192	0.00189292				

Cuadro 13. ANOVA de medidas repetidas, efecto del tiempo, temperatura y presentación de nopal en la sobrevivencia de *E. coli*.

Fuente	DF	Cuadrado de la media	F-Valor	Adj Pr > F		
				Pr > F	G - G	H - F
Tiempo	6	34.6235138	889.17	<.0001	<.0001	<.0001
Tiempo*Temperatura	6	4.4413154	114.06	<.0001	<.0001	<.0001
Tiempo*Presentación de nopal	6	7.6162647	195.59	<.0001	<.0001	<.0001
Tiempo*Temperatura* Presentación de nopalm	6	6.5053591	167.06	<.0001	<.0001	<.0001
Error(time)	192	0.0389393				

Con un nivel de confianza del 99%, se encontraron los siguientes grupos significativos para la sobrevivencia de *Salmonella* y *E. coli* (Cuadro 14 y 15):

Cuadro 14. Comparación de medias de la sobrevivencia de *Salmonella* en nopal con espinas y desespinado a 4 y 18 °C.

T (°C)	Nopal	Tiempo de almacenamiento (Días)													
		3		6		8		10		12		14		16	
		g	μ*	g	μ*	g	μ*	g	μ*	g	μ*	g	μ*	g	μ*
18	E	A	3.09	A	3.33	A	3.39	A	3.82	A	3.80	A	3.22	A	2.29
18	D	B	3.29	A	3.30	B	3.30	B	3.75	B	3.70	B	3.16	B	2.15
4	E	C	2.98	B	3.05	C	3.20	C	3.35	C	3.32	C	2.56	C	1.75
4	D	D	2.82	C	2.38	D	2.57	D	2.31	D	2.15	D	2.05	D	1.45

T=Temperatura, E=Con espinas, D= Desespinado.

μ= Media (log UFC), g= grupo; misma letra no son significativamente diferentes.

Cuadro 15. Comparación de medias de la sobrevivencia de *E. coli* en nopal con espinas y desespinado a 4 y 18 °C.

T (°C)	Nopal	Tiempo de almacenamiento (Días)													
		3		6		8		10		12		14		16	
		g	μ*	g	μ*	g	μ*	g	μ*	g	μ*	g	μ*	g	μ*
18	E	A	4.02	A	4.39	A	4.37	A	3.74	A	3.40	A	3.30	A	2.53
18	D	B	3.94	A	4.25	B	4.19	B	3.61	B	3.23	A	3.08	B	2.20
4	E	C	3.18	B	3.15	C	2.74	C	2.53	C	2.39	B	2.28	C	1.82
4	D	D	1.93	C	2.17	D	1.62	D	1.43	D	1.25	C	0.21	D	0.00

T=Temperatura, E=Con espinas, D= Desespinado.

μ= Media (log UFC), g= grupo; misma letra no son significativamente diferentes

Todas las combinaciones fueron diferentes a través del tiempo con excepción del día 6, donde no se encontró diferencia significativa con los tratamientos de nopal con espinas y desespinado a 18 °C. La menor población de *Salmonella* en el día 16 se

presentó a 4 °C en nopal desespinado (1.45 log UFC), mientras que las poblaciones más grandes se observaron a 18 °C en nopal desespinado y con espinas, 2.15 y 2.29 log UFC, respectivamente (Cuadro 14).

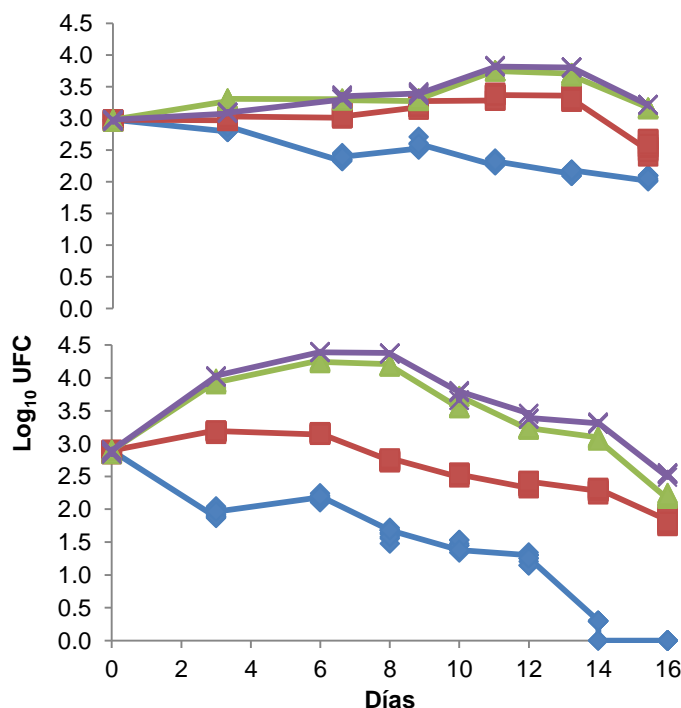


Figura 5. Supervivencia de *Salmonella* sp (arriba) y *E. coli* a 4 °C (abajo). 4°C nopal pelado (◇) y desespinado (□); 18 °C pelado (△) y desespinado (X).

En la Figura 5, se observa el comportamiento de *Salmonella* en los diferentes tratamientos. A 4 °C, en nopal desespinado, la población bacteriana declinó 0.15 log CFU a partir del día tres, para el día dieciséis se detectó una disminución de 1.5 log CFU con respecto a la concentración inicial. En tanto, en nopal con espinas hubo un crecimiento promedio de 0.21 log UFC desde el día tres hasta el diez; en el día dieciséis se cuantificó una disminución de la población original de 1.2 log UCF.

En general, *Salmonella* a 4 °C mostró disminución de la población y lento crecimiento que se mantuvo hasta el día 16, situación que muestra su habilidad para sobrevivir por varios días en hortalizas frescas almacenados entre 2 a 4 °C (ICMSF, 2002). Al respecto, Kroupitski *et al.* (2009) observaron que la población de ocho serovares de *Salmonella enterica* en hojas de lechuga, a los nueve días de almacenamiento a 4 °C fueron constantes con tan solo una diferencia promedio de 0.5 log UFC. De la misma forma, Liao *et al.* (2010) evaluaron el comportamiento de *Salmonella saintpaul* en chile jalapeño a 4 °C por ocho semanas, la población de este patógeno declinó rápidamente en 2 log UFC durante la primera semana, sin embargo, en la última semana aún detectaron a la bacteria. Beauchat y Scouten (2002) encontraron que esta bacteria sobrevivió en semillas de alfalfa, destinadas a germinados, hasta por 52 semanas a 5 °C con una reducción de la población del 6 %.

A 18 °C en nopal desespinado y con espinas, la bacteria incrementó su población en promedio de 0.45 y 0.47 log UFC, respectivamente, a partir del día tres al catorce (Figura 5). Kroupitski *et al.* (2009) mencionaron que este patógeno puede crecer de forma masiva a temperaturas cercanas a 30 °C sobre el tejido vegetal. Mientras que Liao *et al.*, (2010) documentaron que en chile jalapeño, *Salmonella saintpaul* fue capaz de incrementar su población hasta por 3 log UFC a 20 °C en tan solo 48 h.

Por otra parte, *E. coli* presentó un comportamiento similar a *Salmonella*, todas las combinaciones de tratamientos fueron similares, excepto en el día 14, donde no hubo diferencia significativa con ambas presentaciones de nopales a 18 °C (Cuadro

15). Los tratamientos que afectaron significativamente ($p < 0001$) la sobrevivencia de *E. coli* fue 4 °C con nopal desespinado y con espinas.

A 4 °C en nopal desespinado, a partir del día tres se observó que la población disminuyó 0.94 log UFC, en el dieciséis ya no se encontraron células viables (Figura 5). En nopal con espinas, en el día tres y cinco se detectó un crecimiento promedio de 0.3 log UFC, seguido de una disminución gradual, para el día dieciséis se detectó 1.06 log UFC menos a la población inicial. Mientras que a 18 °C, en nopal desespinado y con espinas se observó crecimiento a partir del día tres y el máximo se detectó en el día seis (4.25 y 4.39 log UFC), posteriormente la población disminuyó considerablemente hasta tener remanentes de 2.21 y 2.53 log UFC.

Existe evidencia que la sobrevivencia y crecimiento de *E. coli* depende de diversos factores entre los que destacan, tipo de vegetal, temperatura de almacenamiento, condiciones de empaque y cepa del patógeno (Francis y O'Beirne, 2001). Investigaciones dirigidas a evaluar la sobrevivencia de *E. coli* en vegetales, demuestran que temperaturas inferiores a 8 °C reducen el crecimiento de la bacteria pero permite la sobrevivencia del patógeno (Liao *et al.*, 2010; Corbo *et al.* 2005). En un estudio realizado por Francis y O'Beirne (2001), determinaron que la población de *E. coli* O157:H7 en colinabos disminuyó en 0.5 log UFC cuando se almacenaron a 4 °C, el mismo efecto obtuvieron en ensalada de col donde la cuenta de la bacteria disminuyó de 1.0 a 1.5 log UFC en el día 14, mientras que en lechuga no encontraron disminución de crecimiento, en todos los casos evaluados detectaron células viables al final de los doce días que duro el estudio. En otro estudio desarrollado por Legnani y Leoni (2004), encontraron que en un periodo de almacenamiento de diez días a 4 °C, la bacteria

aumento su población en el día 5 en 0.39 log UFC, para el día diez detectaron 0.07 log UFC más que la población inicial. Estos mismos investigadores evaluaron el comportamiento de la bacteria a 20 °C y observaron para el día diez un aumento de 1 log UFC con respecto a la población del día cero. Otra investigación realizada por Corbo *et al.* (2005) en frutos de tuna, aporta evidencias que demuestran que *E. coli* O157:H7 fue capaz de proliferar a 4 y 8 °C, con un aumento de la población de 4.5 a 5 log UFC g⁻¹ en el día catorce, tiempo final de almacenamiento de los frutos.

Es importante destacar que para *Salmonella* y *E. coli*, en ambas temperaturas la sobrevivencia fue significativamente mayor ($p \leq 0.001$) en nopal con espinas (Cuadro 14 y 15). Una posible respuesta a este comportamiento puede atribuirse a que en nopal con espinas se conservó la cera de la superficie del cladodio, la cual tiene la finalidad evitar la pérdida de a través del aumento de la resistencia estomática y cuticular (Herman *et al.*, 2001). Una particularidad de esta cutícula es que no puede ser digerida por microorganismos e internalizarse en el tejido del cladodio (Gibson y Nobel, 1986). De esta forma, las bacterias al no poder invadir el tejido y disponer de los nutrientes necesarios para su proliferación se mantuvieron en la superficie del nopal formando biopelículas complejas como un mecanismos de adhesión y de protección (O'Toole *et al.*, 2000), además de funcionar como trampas para que la bacteria pueda adquirir alimento (Ávila-Quezada *et al.*, 2010). En nopal verdura, Hernández *et al.* (2009) documentaron la formación de biopelículas por *Salmonella typhimurium* y *javanica* aislada de nopal verdura desde las 24 h de la inoculación. Esto sugiere que *Salmonella* y *E.coli* pueden formar biopelículas en nopal sin desespinar, por lo que es necesario evitar la contaminación durante la cadena de producción (Liao *et al.*, 2010), porque una

vez que el patógeno se establezca en la cutícula del nopal con espinas, el proceso de desespinado permitiría que el patógeno pueda invadir en tejido y sobrevivir en la hortaliza hasta por 14 o 16 días a temperatura de refrigeración.

Por otra parte, la sobrevivencia en nopal desespinado en ambas temperaturas fue significativamente menor ($p < 0.001$) con respecto a nopal con espinas (Cuadro 14 y 15). De acuerdo con Cantwell *et al.* (1992), durante el proceso de desespinado, se rompen las células y se incrementa la velocidad de respiración y producción de etileno, así como la síntesis de metabolitos secundarios. La producción de estos compuestos, se activan como un mecanismos de defensa contra una gran variedad de microorganismos con el propósito de asegurar su supervivencia (Ruelas *et al.*, 2006). En nopal verdura, se inhibió *Candida albicans*, *E. coli* y *Salmonella thyphimurium* con extractos de *Nopalea cochenillifera*, este comportamiento se atribuyó a la presencia de polifenoles, especialmente flavonoides y taninos (Gómez-Flores *et al.*, 2006). En otros estudios, se estableció que la presencia de ácido fenólicos y flavonoides que conceden actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas que habitan en el sistema gastrointestinal (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005). La acción antimicrobiana en el caso de los compuestos fenólicos se fundamenta en procesos de inhibición enzimática y transporte de proteínas (Girenavar *et al.*, 2008). Con otros compuestos microbicidas se ha fundamentado la desestabilización de membranas celulares en los microorganismos, en especial de bacterias Gram negativas (Burt, 2004). Se ha documentado que algunos compuestos tiene la capacidad de inhibir la formación de biopelículas que forman las bacterias como mecanismo de resistencia y de interferir en la comunicación entre estos microorganismos (Girenavar *et al.*, 2008).

3.5.2 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos

En el extracto de cladodios de nopal 'Atlixco' (Figura 6), se determinó un contenido de fenoles totales de 207.83 mg 100 g⁻¹, se detectaron ácido gálico (t_R= 3.8), protocatéquico (t_R= 6.6), 4-hidroxibenzoico (t_R= 11.6), caféico (t_R= 16.9), felúrico (t_R= 32.6), clorogénico (t_R= 18.9), siríngico (t_R= 19.9), p-coumárico (t_R= 26.7), sinápico (t_R= 37.2), 4- Hidroxibenzaldehído (t_R= 14.1), (-) epicatequina (t_R= 24.4) y quercitina (t_R=37.7). El compuesto principal fue ácido caféico (41.32 mg g⁻¹ peso fresco), seguido del ácido protocatéquico (24.03 mg 100 g⁻¹) (Cuadro 16). Ambos ácidos son reconocidos por tener propiedades antiinflamatorias, antiglucémicas, antioxidantes (Jung *et al.*, 2006; Hyogo *et al.*, 2010), anticancerígenas, antimutagénicas (Krizková *et al.*, 2000; Birošová *et al.*, 2005) y antimicrobianas (Grayer y Harborne, 1994; Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005), además de ser precursores en la formación de ligninas en los tejidos vegetales (Waterman y Mole, 1994).

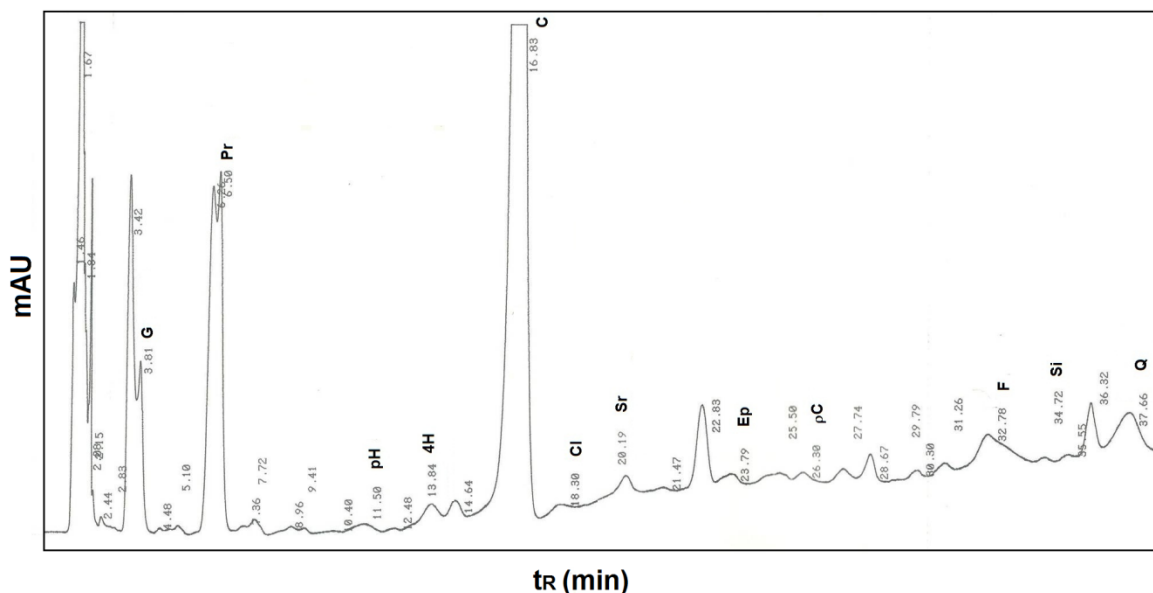


Figura 6. Cromatograma HPLC del extracto metanólico de cladodio de de nopal 'Atlixco'. Ácido gálico (G), protocatéquico (Pr), 4-hidroxibenzoico (4H), caféico (C), clorogénico (Cl), felúrico (F), siríngeo (Sr), p-coumárico (pC), sinápico (Si), (-) epicatequina (Ep) y quercitina (Q).

Otros autores que han estudiado cladodios de *O. ficus-indica*, como Guevara-Figueroa *et al.* (2010), quienes analizaron la composición fenólica de las variedades Blanco, Manso, Amarillo y Cristalino señalaron la presencia de ácido protocatéquico ($0.06\text{-}2.5\text{ mg } 100\text{ g}^{-1}$), gálico ($0.64\text{ mg } 100\text{ g}^{-1}$), 4-hidroxibenzoico ($0.5\text{-}3.19\text{ mg } 100\text{ g}^{-1}$), felúrico ($0.56\text{-}4.32\text{ mg } 100\text{ g}^{-1}$) y quercitina (forma iso-quercitina: $22.9\text{-}32.21\text{ mg } 100\text{ g}^{-1}$). Mientras que Ginestra *et al.* (2009) documentó la presencia de quercitina (forma isoquercitina: $7\text{ mg } 100\text{ g}^{-1}$) y, sin especificar cantidad, trazas de ácido 4-hidroxibenzoico, trans-ferúlico y trans y cis p-coumárico. De la misma forma, Qiu *et al.* (2003) determinaron algunos de estos compuestos en *O. dillenii*, encontrando ácido protocatéquico ($0.358\text{ mg } 100\text{ g}^{-1}$), 4-hidroxibenzoico ($2\text{ mg } 100\text{ g}^{-1}$) y felúrico ($0.47\text{ mg } 100\text{ g}^{-1}$). Los resultados obtenidos con la variedad Atlixco, se encuentran dentro de los rangos de las composiciones fenólicas que obtuvieron los autores anteriores, con excepción del ácido 4-hidroxibenzoico ($0.02\text{ mg } 100\text{ g}^{-1}$), reconocido por su actividad

antimicrobiana y antioxidante (Tung *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009). En tanto, el ácidos clorogénico, siríngico, sinápico y el flavonoide (-) epicatequina son por primera vez documentados en *Opuntia ficus-indica*, su importancia radica en sus propiedades antioxidante, antibacterial, antiviral, anticancerígena, antimutágena y ansiolítica (Jiang *et al.*, 2001; Birošová *et al.*, 2005; Schroeter *et al.*, 2006; Yoon *et al.*, 2007; Itoh *et al.*, 2010; Othman *et al.*, 2010).

Para el caso de pericarpios de *O. albicarpa* var. Alfajayucan y Villanueva se obtuvo una concentración de fenoles totales de 353 y 247 mg 100 g⁻¹, respectivamente. Se detectaron los mismos compuestos fenólicos que en cladodios de nopal (Figura 7 y 8). El ácido protocatéquico fue el compuesto con mayor presencia en ambas tunas (118.40 y 22.36 mg 100 g⁻¹ peso fresco, respectivamente), seguido del ácido caféico con 50.64 75 mg 100 g⁻¹ y 4.17±0.30, respectivamente. Quercitina fue otro compuesto que destacó en ambos pericarpios en concentraciones de 4.50 y 2.75 mg 100 g⁻¹ (Cuadro 16).

Cuadro 16. Concentración de compuestos fenólicos analizados por HPLC en extractos de nopal 'Atlixco' y pericarpio de tuna 'Alfajayucan' y 'Villanueva'.

Compuesto Fenólicos	Nopal 'Atlixco' (mg/100 g) ^a	Tuna 'Alfajayucan' (mg/100 g) ^a	Tuna 'Villanueva' (mg/100 g) ^a
A. Gálico	1.58±0.05	0.47±0.02	0.30±0.0
Ácido protocatéquico	24.03±0.21	118.40±2.83	22.36±0.57
A. hidroxibenzoico	0.02±0.01	0.05±0.00	0.03±0.00
A. cafeíco	41.32±0.28	50.64±1.28	4.17±0.30
A. clorogénico	0.12±0.01	0.20±0.01	0.36±0.00
A. siringico	0.24±0.1	2.67±0.06	0.20±0.0
A. p-coumarico	0.33±0.7	0.23±0.01	0.07±0.0
A. felúrico	0.74±0.03	1.15±0.06	0.53±0.0
A. sinápico	3.22±0.24	0.24±0.04	1.04±0.14
4- hidroxibenzaldehído	0.16±0.01	0.55±0.05	0.08±0.00
Quercitina	5.31±0.61	4.50±0.91	2.75±0.44
Epicatequina	0.17±0.01	0.40±0.03	0.03±0.0

^a Media de determinación por triplicado con desviación estándar.

Se ha detectado que pericarpios de *Opuntia*, tienen ácido caféico, protocatéquico, 4-hidroxibenzoico, felúrico, p-coumárico; y p-hidroxibenzaldehído en *O. megacantha* (Ndhlala *et al.*, 2007). Por otro lado, con *O. dillenii*, Chang *et al.* (2008) observaron la presencia de ácido felúrico (4 mg 100 g⁻¹), p-coumarico (0.6 mg 100 g⁻¹), ácido gálico (2.7 mg 100 g⁻¹), quercitina (4.6 mg 100 g⁻¹) y (-) epicatequina (17.1 mg 100 g⁻¹). Mientras que Guzmán-Maldonado *et al.* (2010), quienes analizaron la composición fenólica de pericarpios de *O. matudae* de 3 estados (Guanajuato, Estado de México y Puebla), demostraron la presencia de ácido gálico (27.9, 35.9 y 33.9 mg 100 g⁻¹, respectivamente), 4-hidroxibenzoico (10.2, 6.9 y 7.4 mg 100 g⁻¹, respectivamente) y (-) epicatequina (12.11, 11.22, 11.56 mg 100 g⁻¹, respectivamente). Estos resultados sugieren que la concentración de compuestos fenólicos varía entre la

especie, mientras que para *O. albicarpa* el compuesto principal fue ácido protocatéquico, Ndhlala *et al.* (2007) y Chang *et al.* (2008) coinciden en que ácido felúrico estuvo presente en mayor proporción en *O. megantha* y *O. dillenii*, a diferencia de Guzmán-Maldonado *et al.* (2010) con *O. matudae* donde el ácido gálico fue el más abundante.

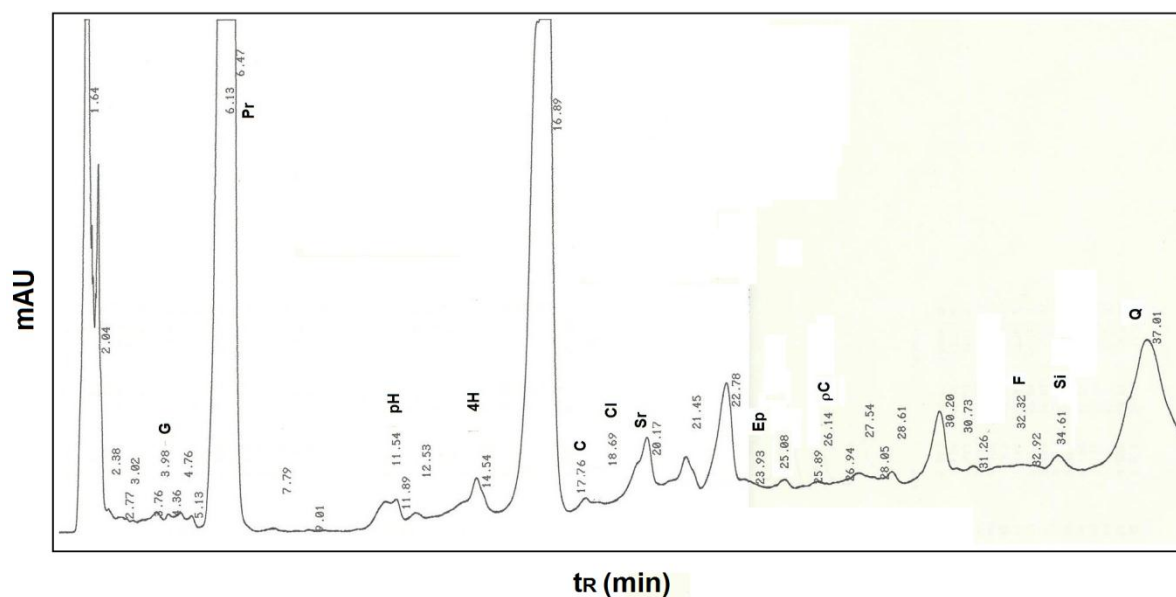


Figura 7. Cromatograma HPLC del extracto metanólico de tuna 'Alfajayucan'. Ácido gálico (G), protocatéquico (Pr), 4-hidroxibenzoico (4H), caféico (C), clorogénico (Cl), felúrico (F), siríngico (Sr), p-coumárico (pC), sinápico (Si), (-) epicatequina(Ep) y quercitina (Q).

Puesto que el tipo de compuestos fenólicos y su concentración en el género *Opuntia* están en función de la especie y variedad, estos aspectos incluso puede considerarse fundamentales en la selección de variedades para fines nutricionales o farmacéuticos (Chavéz-Santoscoy *et al.* , 2009; Guevara-Figueroa *et al.*, 2010; Howard *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2002).

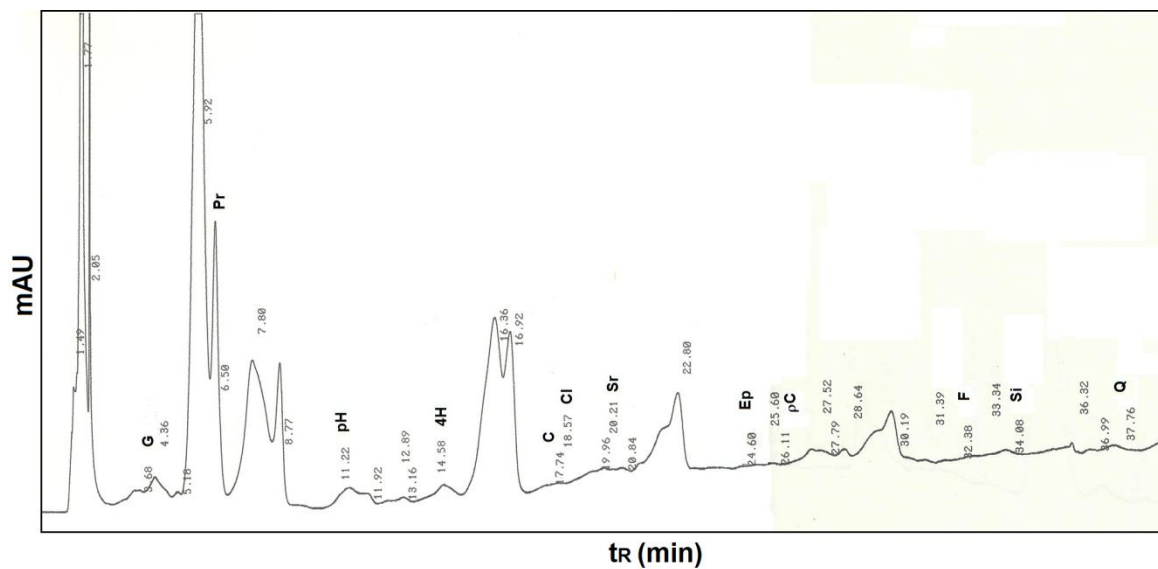


Figura 8. Cromatograma HPLC del extracto etanólico de pericarpio de tuna 'Villanueva'. Ácido gálico (G), protocatéuico (Pr), 4-hidroxibenzoico (4H), caféico (C), clorogénico (Cl), felúrico (F), siríngeo (Sr), p-coumárico (pC), sinápico (Si), (-) epicatequina (Ep) y quercitina (Q).

3.6 CONCLUSIONES

Salmonella sp. y *Escherichia coli* fueron capaces de crecer y sobrevivir por 16 días a 4 y 18 °C en nopal sin desespinar. En nopal desespinado, *Salmonella* sp. sobrevivió y prolifero por 16 días a 4 y 18 °C, mientras que *E. coli* únicamente sobrevivió durante este periodo a 18 °C.

Se encontraron compuestos fenólicos con potencial microbicida, en cladodios de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill var. Atlixco y pericarpios de *Opuntia albicarpa* Scheinvar var. Alfajayucan y Villanueva.

3.7 LITERATURA CITADA

- Ávila-Quezada G., Sánchez E., Gardea-Béjarb and A. A. and Acedo-Félix E. 2010. *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*: survival and growth in plant tissue. New Zeal. J. Crop Hort. Sci. 38(2):47-55.
- Beuchat L.R. and Scouten A.J. 2002. Combined effects of water activity, temperature and chemical treatments on the survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. J. Appl. Microbiol. 92:382-395.
- Birošová L., Mikulášová M. and Vaverková S. 2005. Antimutagenic effect of phenolic acids. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 149(2):489-491.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. Int. J. Food Microbiol. 94:223-253
- Cantwell M., Rodriguez-Felix, A. y Robles-Contreras F. 1992. Postharvest physiology of prickly pear cactus. Scien. Hort. 50:1-9.
- Chang S. F., Hsieh C. L., Yen G. C. 2008. The protective effect of *Opuntia dillenii* Haw fruit against low-density lipoprotein peroxidation and its active compounds. Food Chem. 106:569–575.
- Chavez-Santoscoy R. A., Gutierrez-Uribe J. A. and Serna-Saldívar S. O. 2009. Phenolic Composition, Antioxidant Capacity and In Vitro Cancer Cell Cytotoxicity of Nine Prickly Pear (*Opuntia* spp.) Juices. Plant. Foods Hum. Nutr. 64:146-152.
- Corbo M. R., Campaniello D., D'amato D., Bevilacqua A. and Sinigaglia M. 2005. Behavior of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-sliced cactus-pear fruit. J. Food Saf. 25 :157–172.
- Flores-Valdez C. A. 2003. Producción y comercialización de nopalitos. In: Nopalitos y Tunas. C. A. Florez-Valdez. Universidad Autónoma Chapingo-CIESTAAM-Programa Nopal. 19-37 pp.
- Francis G. A. and O'Beirne O. 2001. Effects of vegetable type, package atmosphere and storage temperature on growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. J. Indust. Microbiol. Biotech. 27:111-116
- Franz E. and van Bruggen A. H. C. 2008. Ecology of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enteric* in the Primary Vegetable Production Chain. Crit. Rev. Microbiol. 34:143-161.
- Gibson A. and Nobel P. S. 1986. The cactus primer. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 208 pp.

- Gil M. I., Tomás-Barberán F. A., Hess-Pierce B., Kader A.A. 2002. Antioxidant capacity, phenolic compounds, carotenoids and vitamin C of nectarine, peach and plum cultivars from California". J. Agric. Food Chem. 50:4976-4982.
- Ginestra G., Parker M. L., Bennett R. N., Robertson J., Mandalari G., Narbad A., Lo Curto R. B., Bisignano G., Faulds C. B. and Waldron K. W. 2009. Anatomical, Chemical, and Biochemical Characterization of Cladodes from Prickly Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. J. Agric. Food Chem. 57, 10323-10330
- Girenavar B., Jayaprakasha G.K. and Patil B. S 2008. Influence of pre- and post-harvest factors and processing on the levels of furocoumarins in grapefruits (*Citrus paradisi* Macfed.). Food Chem. 111(2):387-392
- Gomez-Flores R., Tamez-Guerra P., Tamez-Guerra R., Rodriguez-Padilla C., Monreal-Cuevas E.; Hauad-Marroquin L. A., Cordova-Puente C., and Rangel-Llanas A. 2006. In vitro Antibacterial and Antifungal Activities of *Nopalea cochenillifera* Pad Extracts. Am. J. Infect. Dis.
- Grayer R. J. and Harborne J. B. 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982–1993. Phytochem. 37:19–42.
- Guevara- Figueroa T., Jiménez-Islas H., Reyes-Escogido M. L., Mortensen A. G., Laursen B. B., Lin L. W., De León-Rodríguez A., Fomsgaard I. S. and Barba de la Rosa A. P. 2010. Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). J. Food Compos. Anal. 23(6):525-532.
- Guzmán-Maldonado S. H. Herrera-Hernández G., Hernández-López D., Reynoso-Camacho R., Guzmán-Tovar R., Vaillant F. and Pierre Brat. 2010. Physicochemical, nutritional and functional characteristics of two underutilised fruit cactus species (*Myrtillocactus*) produced in central Mexico. Food Chem. 121(2):381-386.
- Herman, S., Acevedo, E. y Silva, P. 2001. Anatomía del tejido fotosintético de diez taxa de *Opuntia* establecidos en el secano árido mediterráneo de Chile. Rev. chil. hist. nat. 74(2):341-351 .
- Hernandez, A.M., Landa, P., Mora-A, G., Eslava, A., Call, J.E., Porto Fett, A.C., Luchansky, J.B. 2009. Characterization of *Salmonella* spp. from nopal leaves and associated soil and water samples in Morelos, Mexico. [abstract]. Int. Assoc. Food Protect. p.1.
- Howard L.R., Pandjaitan N., Morelock T., Gil M.I. 2002. Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and growing season". J. Agric. Food Chem. 50:5891- 5891.
- Hyogo A., Kobayashi T., Garcia Del Saz E. and Seguchi H. 2010. Antioxidant effects of protocatechuic acid, ferulic acid, and caffeic acid in human neutrophils using a fluorescent substance. Int. J. Morphol. 28(3):911-920.

- ICMSF. 2002. Microorganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Management. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Kluwer. Academic/Plenum Publishers (ed). New York, USA. 362 p.
- Itoh A., Isoda K., Kondoh M., Kawase M., Watari A., Kobayashi M., Tamesada M. and Yagi K. 2010. Hepatoprotective Effect of Syringic Acid and Vanillic Acid on CCl₄-Induced Liver Injury. *Biol. Pharm. Bull.* 33(6) 983-987
- Jiang Y.; Satoh K. and Watanabe S. 2001. Inhibition of chlorogenic acid induced cytotoxicity by CoC12. *Anticancer Res.* 21:3349-3353.
- Jung U. J., Lee M. K., Park Y. B., Jeon S. M., Choi M. S. 2006. Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 318(2):476-83.
- Krizková L., Nagy M., Polónyi J., Dobias J., Belicová A., Grancai D. and Krajcovic J. 2000. Phenolic acids inhibit chloroplast mutagenesis in *Euglena gracilis*. *Mutat Res.* 469(1):107-114.
- Kroupitski Y., Pinto R., Brandl M.T., Belausov E. and Sela S. 2009. Interactions of *Salmonella enterica* with lettuce leaves. *J. Appl. Microbiol.* 106:1876-1885.
- Kuskoski E. M., Asuero A. G., Troncoso A. M., Mancini-Filho J. and Fett R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 25(4): 726-732.
- Kuti J.O. 2004. Antioxidant compounds from four *Opuntia* cactus pear fruit varieties. *Food Chem.* 85 (4):527-533.
- Legnani P. P. and Leoni E. 2004. Effect of processing and storage conditions on the microbiological quality of minimally processed vegetables. *Int J Food Sci. Tech.* 39, 1061-1068.
- Liao C.-H., Cooke P. H. and Niemira B.A. 2010. Localization, Growth, and Inactivation of *Salmonella* Saintpaul on Jalapeño Peppers. *J. Food Sci.* 75(6):M377-M382.
- Ndhlala A. R., Kasiyamhuru A., Mupure C., Chitindingu K., Benhura M. A., Muchuweti M. 2007. Phenolic composition of *Flacourtia indica*, *Opuntia megacantha* and *Sclerocarya birrea*. *Food Chem.* 103: 82-87.
- O'Toole G., Kaplan H. B., Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Ann. Rev. Microbiol.* 54(1): 49-79.
- Othman A., Mhd Jalil A. M., Weng K .K., Ismail A., Ghani N. A. and Adenan I. 2010. Epicatechin content and antioxidant capacity of cocoa beans from four different countries. *Afr. J. Biotechnol.* 9(7):1052-1059.
- Puupponen-Pimiä R., Nohynek L., Hanna-Leena Alakomi H. L. and Oksman-Caldentey K. M. 2005. Bioactive berry compounds-novel tools against human pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 8-18

- Qiu Y., Chen Y., Pei Y., Matsuda H. and Yoshikawa M. 2003. New Constituents from the Fresh Stems of *Opuntia dillenii*. J. Chin. Pharm. Sci. 12: 1-5.
- Rodriguez-Felix A. y Villegas-Ochoa M.A. 1998. Postharvest handling of cactus (*Opuntia* spp.) stems. CACTUSNET-FAO Newsletter. Universita degli Studi di Reggio Calabria.pp. 10-13.
- Ruelas C., Tiznado-Hernández M. E., Sánchez-Estrada A., Robles-Burgueño M. R. and Troncoso-Rojas R. 2006. Changes in Phenolic Acid Content During *Alternaria alternata* Infection in Tomato Fruit. J. Phytopat. 154:236–244
- Schroeter H., Heiss C., Balzer J., Kleinbongard P., Keen C. L., Hollenberg N. K., Sies H., Kwik-Urbe C., Schmitz H. H. and Kelm M. 2006. (-)-epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. PNAS. 103(4):1024–1029.
- Tung Y. T., Wu J. H., Kuo Y.H. and Chang S. T. 2007. Antioxidant activities of natural phenolic compounds from *Acacia confusa* bark. Bioresour. Technol. 98:1120–1123
- Valencia Sandoval K. 2010. Evaluación del nopalverdura como alimento funcional mediante opciones reales. Tesis Maestria. Colegio de Postgraduados. 166 p.
- Waterman P. G, and Mole S. 1994. Analysis of phenolic plant metabolites. In: Methods in Ecology. Waterman P.G and Mole S. (eds.). Blackwell Scientific Publications Oxford, U.K. 238 p.
- Yang J. F., Yang C. H., Chang H. W., Yang C. S., Lin C. W. and Chuang L. Y. 2009. Antioxidant and antibacterial properties of *Pericarpium trichosanthis* against nosocomial drug resistant strains of *Acinetobacter baumannii* in Taiwan. J. Medical. Plants Res. 3(11):982-991.
- Yoon B. H., Jung J. W., Lee J. J., Cho Y. W., Jan C. G., Jin C., Oh T. H., Ryu J. H.. 2007. Anxiolytic-like effects of sinapic acid in mice. Life Sci. 81:234-240

CAPITULO IV

DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE MUESTRA PARA ANÁLISIS

MICROBIOLÓGICOS DE NOPAL VERDURA (*Opuntia* sp.)

4.1 RESUMEN

Para el análisis microbiológico de alimentos, existen diversos esquemas para la toma de muestras definidos por organizaciones internacionales, su selección representa un reto para el especialista. En nopal verdura (*Opuntia* spp.), no existen esquemas de muestreo para diferentes niveles de protección para el mercado y no hay una cuantificación del nivel de calidad del producto, ni hay una comparación estadística del nivel de protección para el consumidor entre un sistema de producción de reducción de riesgos certificado y uno tradicional. En este estudio, se presentan planes de muestreo de dos y tres clases que permiten elegir un tamaño de muestra adecuado al nivel de protección requerido por el consumidor. En una muestra de unidades de producción certificadas, se estimó que el 85 % de nopales cumplieron con las especificaciones microbiológicas, en tanto que el resto se encontró en un nivel tolerable. Se obtuvieron niveles de protección entre 6.2 a 82.4 % para tamaños de muestra tradicionalmente empleados, 3 a 20 kg. Se proporcionan nueve esquemas de muestreo para tres niveles de protección (80, 90 y 99 %), en los cuales se define el mínimo nivel de calidad aceptable (NCA). Se compararon dos escenarios con la distribución Pert para simular un sistema certificado y un sistema tradicional. La diferencia entre estos escenarios, se define a partir del nivel de protección del 40%, donde se rechazan todos los lotes de producción en la primera y se aceptan en la

segunda. Se concluye que el muestreo de dos y tres clases permite diseñar esquemas de muestreo con un nivel de protección requerido por el mercado y comparar estadísticamente diferentes sistemas de producción de productos hortícolas.

Palabras clave: Nopal, muestreo de aceptación, distribución Pert, simulación Montecarlo.

4.2 ABSTRACT

In the microbiological analyses there are several sampling schemes defined by different international organizations and its selection is a dare to specialists. In cactus leaves (nopal) not exist: sampling schemes to different market protection levels, a quantification of the level of product quality and statistical comparison of the level of consumer protection between a system of production risk reduction certificate and a traditional one. In this study, sampling plans are two-and three classes which allow to choose an adequate sample size in according to the level of protection required by the consumer. Hence, In a sample of certified production units was estimated that 85% of cactus leaves comply the microbiological specifications, while the rest was found in a tolerable level. 6.2 to 82.4% Protection levels were obtained for sample sizes traditionally used, 3 to 20 kg. New sampling schemes were provided for three levels of protection (80, 90 and 99%), which define the minimum acceptable quality level (AQL). Two scenarios were compared with the Pert distribution to simulate a certificate and a traditional system. The difference were defined from the level of protection of 40%, where all lots are rejected in the first production and accepted in the second. In summary, two and three classes sampling plans allows to design sampling schemes with a level of protection required by the market and statistically compare different systems of horticultural production.

Keyword: *Opuntia* sp., acceptance sampling, *Pert* distribution, Montecarlo simulation.

4.3 INTRODUCCIÓN

El nopal verdura (*Opuntia* spp.) es una hortaliza que está adquiriendo de importancia en el mercado de exportación, principalmente a EE.UU., país que aumentó su exportación de esta hortaliza en 128.6 % del 2000-2005. Este comportamiento se atribuye al aumento de la población latina y la aceptación de la comida mexicana en este país (Callejas *et al.*, 2006). Por tanto, los productores mexicanos están adoptando las regulaciones comerciales y sistemas de producción establecidos por los países consumidores, como los programas de inocuidad de alimentos, que disminuyen el riesgo de contaminación de los productos hortofrutícolas por patógenos como *Salmonella* (CDC, 2008; García-Gómez *et al.*, 2002) y *Escherichia coli* (Nguyen-the y Carlin, 2004).

En México, la Ley Federal de Sanidad Vegetal se modificó en el 2007 con el propósito de tipificar como delito los actos que ponen en riesgo la salud humana; en el artículo 47 se establece la implementación de sistemas de reducción de riesgos de contaminación (SRRC) en la producción primaria de vegetales (DOF, 2007). Gorris (2006) señala que la implementación de los SRRC, previene la introducción de peligros de contaminación a lo largo de la cadena de producción de alimentos y el cumplimiento de los niveles de protección establecidos por el consumidor. Para la validación y verificación de dichos procedimientos, se emplean los criterios microbiológicos (CM), los cuales señalan el grupo de alimento, los microorganismos de interés o productos de su metabolismo, el plan de muestreo y los límites microbiológicos aceptables (Whiting *et al.*, 2006; ANMAT, 2005). Schothorst *et al.* (2009) enfatizan el correcto uso de los planes de muestreo para determinar los CM de forma efectiva y práctica. Al respecto, la

ICMSF (2002) sugiere planes de muestreo diseñados de acuerdo con el riesgo del patógeno, el tipo de alimento, las condiciones de manejo y la población a la que va dirigido. Dichos planes se clasifican en 15 casos, en función de las combinaciones de riesgo a la salud y las condiciones de uso. Los casos 1 a 3, incluyen bacterias psicrófilas, acéticas, lácticas, mohos y levaduras, donde no existe riesgo para la salud pero sí para la vida útil del alimento; los casos 4 a 6 incluyen indicadores de contaminación por bacterias mesófilas aerobias y anaerobias, coliformes fecales, mohos y levaduras, etc.; los casos 7 a 9 indican riesgo moderado ya que no pelagra la vida del consumidor, pero pueden causar molestias en periodos cortos, aunque rara vez dejan secuelas causados por *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, entre otros; los casos 10 a 12, señalan riesgo serio con microorganismos que causan enfermedades de duración moderada y no suelen dejar secuelas como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Criptosporidium parvum*; y los casos 13 a 15 representan riesgo grave, estos microorganismos causan enfermedades que ponen en peligro la vida del consumidor, son de larga duración y la mayoría de veces causan secuelas crónicas como *Clostridium botulinum*, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella typhi*. Para los casos 1 al 9, se utilizan los planes de muestreo de tres clases, mientras que para los casos 10 al 12 los de tres clases (Legan *et al.*, 2001; ICMSF, 2002). Los planes de muestreo de tres clases, pueden tener mayor efectividad porque permiten un amplio rango de tolerancia en la carga microbiana. Mientras que los planes de dos clases aseguran en su totalidad el rechazo de lotes contaminados por patógenos de baja dosis infectiva (< 10 unidades formadoras de colonias, UFC g^{-1}), sugieren usar estos planes con un nivel de protección $>95\%$ (Legan *et al.*, 2001).

Durante el muestreo de alimentos es frecuente la incertidumbre en la elección del tamaño de la muestra (n), necesaria para reducir el riesgo de aceptar erróneamente un lote (β) o de rechazarlo equivocadamente (α). Por lo anterior, es necesario elegir el tamaño de la muestra en función de su naturaleza, nivel de incidencia del patógeno en el alimento y nivel de protección (conocido también como nivel de confiabilidad o probabilidad de rechazo) para el consumidor (Dahm, 2004; Johnston *et al.*, 2006). Whiting *et al.* (2006) indican que entre mayor sea el nivel de protección, el tamaño de n se incrementa, mientras que el valor tolerable (m) de microorganismos se reduce. Para la elección de un plan de muestreo, Zwietering (2009) sugiere que debe evaluarse el nivel de riesgo a través de modelos estadísticos. Sin embargo, para nopal verdura no existen estudios que identifiquen el nivel de calidad (NC) con el cual las autoridades certifican unidades de producción, tampoco se ha establecido un tamaño de muestra para las diferentes necesidades del mercado y menos aún una comparación entre un sistema de producción tradicional y uno certificado (con un SRRC). Por lo tanto, en este trabajo se determina el nivel de calidad (NC) de productores de nopal verdura para un grupo de productores certificados en SRRC en la región oriente del Estado de México. Para estimar el tamaño de muestra para diferentes niveles de protección, se propone utilizar planes de muestreo de dos y tres clases tomando como referencia el NC del productor. Con el propósito de comparar el poder discriminatorio de un SRRC y un ST, se utiliza la distribución asimétrica de Pert, en donde el mayor volumen de porcentajes de productos que cumplen con las especificaciones, se encuentra a la izquierda de la distribución. Para la comparación antes mencionada, se utiliza la simulación Montecarlo.

4.4 MATERIALES Y METODOS

4.4.1 Planes de muestreo

4. 4. 2 Planes de muestreo de dos clases

La ICMSF (2002), sugiere usar el plan de muestreo de dos clases cuando los microorganismos están uniformemente distribuidos en el lote o para definir riesgo directo a la salud con potencial de diseminación y riesgo grave.

Notación:

N= tamaño del lote; n= tamaño de la muestra. Esto es el número de artículos señalados de un lote para ser examinados; p= fracción de unidades alimenticias (ej. nopal o caja de nopal) que cumple con las especificaciones microbiológicas requeridas; m= el valor de las características para separar las fracción de unidades alimenticias que cumplen con las especificaciones microbiológicas requeridas de aquellas que no; d= número de unidades defectuosas que exceden a m; c= número de unidades defectuosas aceptables; el número máximo tolerable de unidades alimenticias en la muestra; que no cumplen con las especificaciones microbiológicas requeridas, es decir, si $d > c$, el lote es rechazado; P_a = probabilidad de aceptación; P_r = probabilidad de rechazo (nivel de protección para el cliente o nivel de confiabilidad) y $P_r = 1 - P_a$.

4.4.3 Planes de muestreo de tres clases

El plan de atributos de tres clases se usa para el muestreo de lotes, en donde la distribución de los patógenos es heterogénea y cuando se consideran análisis cuantitativos con dos límites microbiológicos: m (límite superior que no causa peligro) y

M (límite de contaminación peligroso o inaceptable) (ANMAT, 2005; Dahms, 2004). Estos planes no son tan estrictos y son apropiados donde el riesgo es relativamente bajo; la ICMSF (2002) propone utilizar este muestreo para los casos 1 al 9, en los cuales se manejan organismos de descomposición y contaminación de alimentos.

Notación:

N= tamaño del lote; n= tamaño de la muestra; p_0 = fracción de unidades alimenticias aceptables para considerar que un lote cumple con las especificaciones microbiológicas requeridas; p_1 = fracción de unidades alimenticias que se encuentran en el límite aceptable de las especificaciones microbiológicas requeridas; $p_2 = 1 - (p_0 + p_1)$ = fracciones de unidades alimenticias que no cumplen con las especificaciones microbiológicas requeridas; m= límite microbiológico que separa las fracción de unidades alimenticias que cumplen con las especificaciones microbiológicas requeridas de aquellas que encuentran en el límite aceptable; M= límite microbiológico que separa las fracción de unidades alimenticias que se encuentran dentro del límite microbiológico aceptable de aquellas que no lo cumplen; d_1 = el número de unidades alimenticias en la muestra que se encuentran en el límite aceptable de las especificaciones de inocuidad o de aquellas que no cumplen, tal que $M > d_1 > m$; d_2 = el número de unidades alimenticias en la muestra que no cumplen las especificaciones microbiológicas requeridas es decir $d_2 > M$; c_1 =es el máximo número aceptable para la suma de unidades que se encuentran entre m y M y las unidades que exceden M; c_2 = el máximo número aceptable para las unidades que exceden M; P_a = probabilidad de aceptación; P_r = probabilidad de rechazo (nivel de protección para el cliente o nivel de confiabilidad) y $P_r = 1 - P_a$.

La distribución trivariada asociada a este muestreo se describe como :

$$P_a = \sum_{i=0}^{c_1-j} \sum_{j=0}^{c_2} \frac{n!}{i! j! (n-i-j)!} p_0^{n-i-j} p_1^i p_2^j \quad (1)$$

En el caso de que $c_2=0$, la distribución queda reducida a:

$$P_a = \sum_{i=0}^c \binom{n}{i} p_0^{n-i} p_1^i \quad (2)$$

Esta distribución se asemeja a una distribución binomial, sin embargo no lo es, ya que p_0+p_1 no suma la unidad. Sólo para el caso en que la población no contiene unidades alimenticias que no cumplen con las especificaciones de inocuidad (ej. $p_2=0$), se convierte en una binomial ordinaria (Bray *et al.*, 1973), situación que fue utilizada para este trabajo para determinar la presencia o ausencia de patógenos.

Bray *et al.* (1973) señalan que para maximizar la protección contra el riesgo de aceptar lotes que no cumplen con las especificaciones debería utilizarse $c_1=0$ y $c_2=0$. Entre mayor es el tamaño de muestra, la Probabilidad de rechazo es mayor ($P_r=1-P_a$), lo cual implica tener un mayor nivel de protección para los consumidores en contra de lotes que no cumplen las especificaciones de inocuidad. Si se consideran los valores de $c_1=c_2=0$, el tamaño de muestra queda definido como

$$n = \frac{\log(p_0)}{\log(P_a)} \quad (3)$$

4.4.4. Distribución Pert

La distribución PERT surgió de la necesidad de describir la incertidumbre durante el desarrollo del misil Polaris. Se conoce como una versión de la distribución beta y al igual que la distribución triangular requiere de tres parámetros: mínimo, máximo deseable y más probable (Mun, 2011). Se utiliza para modelar estimaciones, comúnmente en la identificación de riesgos y estimación costos en proyectos (Premachandra, 2001). Esta distribución por lo general presenta una asimetría a la derecha debido a que estima valores cercanos al más probable (Mun, 2011).

La función de la distribución Pert se expresa como:

$$f(x) = \frac{(x - \min)^{A1-1} (\max - x)^{A2-1}}{B(A1, A2)(\max - \min)^{A1+A2-1}} \quad (4)$$

Donde B= función Beta y;

$$A1 = 6 \left[\frac{\min + 4(\text{probable}) + \max}{6} - \min \right] \quad (5)$$

$$A2 = 6 \left[\frac{\min + 4(\text{probable}) + \max}{6} - \max \right] \quad (6)$$

Las expresiones típicas de Pert para la media y desviación estándar se expresan:

$$\text{Media} = \frac{\min + 4(\text{probable}) + \max}{6} \quad (7)$$

$$Desviación - estándar = \sqrt{\frac{(\mu - \min)(\max - \mu)}{7}} \quad (8)$$

La media para la distribución Pert es cuatro veces más sensible al valor más probable que a los valores extremos y la desviación estándar es menos sensible a los valores extremos que la distribución triangular, particularmente cuando las distribuciones son sesgadas (Mun, 2011). Esta distribución se utilizó en esta investigación para simular el nivel de rechazo de los esquemas de muestreo para un sistema de producción certificado y uno tradicional.

4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.1 El experimento

Se consideró una asociación de 14 productores de nopal verdura de la zona oriente del Estado de México, de marzo de 2008 a febrero de 2009, cuyas unidades de producción fueron certificadas en sistemas de reducción de riesgos de contaminación (SRRC) por SENASICA. Para el análisis microbiológico, la unidad de muestreo por unidad de producción fue de 1 kg, compuesta de diferentes cajas de la producción de un día. Se tomó una muestra piloto de $n=10$ kg, proveniente de diez unidades de producción seleccionadas al azar. Para el recuento de bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales y fecales y detección de *Salmonella*, se realizaron 6 muestreos a lo largo del año considerado. El nivel de calidad de la producción de nopal verdura durante este periodo fue de $p_0=85$, $p_1=15$ y $p_2=0$ debido a la presencia de bacterias mesófilas y coliformes. En el 85 % de los muestreos se encontró cuentas de bacterias

mesofilas por debajo de $m=100 \text{ UFC g}^{-1}$ y coliformes por debajo de $m=100 \text{ NMP g}^{-1}$, el resto de muestreos (15%) excedieron estos límites sin alcanzar el máximo tolerable de $M=100,000 \text{ UFC g}^{-1}$ para bacterias mesofilas y $M=10,000 \text{ NMP g}^{-1}$ para coliformes. Se detectó ausencia de *Salmonella* sp.

4.5.2 Estimación del tamaño de muestra

Tomando como referencia en nivel de calidad de producción de nopal verdura del estudio piloto ($p_0=85$, $p_1=15$ y $p_2=0$), se estimó un tamaño de muestra para un nivel de confiabilidad de al menos 80 %, por considerarse un muestreo de microorganismos con bajo riesgo para la salud (bacterias mesófilas y coliformes). En el Cuadro 17 se muestra que con un tamaño de muestra de 10 unidades, el nivel de protección es de 45.6 %, mientras que con 20 aumenta a 82.4 %. Por tanto, si se desea tener un nivel de protección de al menos 80 % se necesita un tamaño de muestra mínimo de 20 kg de nopal para análisis de laboratorio. Esto ilustra que el tamaño de muestra debe definirse con base al nivel de calidad exigido o aceptable por el consumidor.

Cuadro 17. Tamaños de muestra para determinar un nivel de protección al consumidor

n	P_r^{\dagger}
3	6.2
5	16.5
10	45.6
15	68.1
20	82.4

[†]Nivel de protección del al menos el 80% con $p_0=85$, $p_1=15$, $p_2=0$ % y $c=0$

4.5.3 Determinación del NCA para diferentes niveles de protección en un sistema de producción de nopal con SRRC

Se estimaron esquemas de muestreo con NCA que permitieran cumplir con tres niveles de protección para un sistema de producción de nopal con SRRC (Cuadro 18). Se muestra que entre más baja es la calidad del lote, elevado número de unidades de muestreo que no cumplen con las especificaciones mínimas de inocuidad (m), mayor es la probabilidad de rechazo. Por ejemplo, para el caso de los productores de nopal verdura con un NC de 85 % se tiene un nivel de protección del 80 % hasta el caso 11, con un esquema de muestreo de $n=10$ y $c=0$. Si se deseara aumentar el nivel de protección a un 90 %, se necesitaría un esquema $n=15$ y $c=0$ (caso 13), mientras que para lograr un 99 % de protección se requiere de un esquema $n=30$ y $c=1$ (caso 14). Como se puede observar, si se requiere incrementar la seguridad del consumidor, es necesario aumentar el tamaño muestra y el nivel de protección.

4.5.4 Simulación Montecarlo para comparar dos esquemas de producción de nopal verdura

Para determinar el comportamiento de la distribución de rechazo de un SRRC y un ST, se realizaron simulaciones Montecarlo (100,000 iteraciones) utilizando el software RiskAMP[®] (2010). La distribución Pert fue la seleccionada ya que ésta permite considerar tres valores posibles para el porcentaje de unidades aceptables (p_0): un número mínimo (A), uno más probable (B) y uno máximo deseable (C) en el dominio de la distribución Pert. Para las unidades de producción certificadas con SRRC, el valor de A fue el estimado por estas unidades de producción, esto es $A=85\%$, mientras que

para B y C fueron 95 % y 99.99 %, respectivamente. Lo anterior para construir un escenario deseado en un SRRC. Mientras que para el ST, se consideraron los valores A= 10 %, B= 15 % y C=40 %, con fines de comparación.

Cuadro 18. Estimación del nivel de calidad aceptable (NCA) para diferentes niveles de protección en planes de muestreo de dos y tres clases para nopal verdura.

Caso	Microorganismos	n	Nivel de protección (Pr)					
			80%		90%		99%	
			P ₀	P ₁	P ₀	P ₁	P ₀	P ₁
3	Bacterias mésofilas erobias	5 ^{**}	51	49	41	59	22	78
6	<i>Escherichia coli</i>	5 ^{**}	51	49	41	59	22	78
8	<i>Bacillus cereus</i>	5 ^{**}	51	49	41	59	22	78
	<i>Clostridium perfringens</i>	10 ^{**}	72	28	66	34	49	52
9	<i>Staphylococcus aureus</i>	5 [*]	72	28	63	37	40	60
10	<i>Escherichia coli</i> patógena							
11	Serovares de <i>Salmonella</i>	10 [*]	85	15	79	21	63	37
12	<i>Listeria monocytogenes</i>	20 [*]	92	8	89	11	79	21
		15 [*]	89	11	85	15	73	27
13	<i>Clostridium botulinum</i>							
14	<i>Salmonella typhi</i> , S.	30 [*]	95	5	92	8	85	15
15	<i>paratyphi</i>	60 [*]	97	3	96	4	92	8
	<i>Vibrio cholerae</i> 01							
	<i>L.monocytogenes</i>							

** c=1, con muestreo triple, *c=0, con muestreo doble.

La simulación Montecarlo indicó que los el NCA para unidades certificadas en SRRC ($p_0= 94.19$, $p_1= 5.81$ y $p_2=0$ %) es mayor que para las de un ST ($p_0= 18.33$, $p_1= 81.67$ y $p_2=0$ %). La Figura 9, muestra que el número de rechazos es mayor en un SRRC, debido a que el nivel de exigencia de un SRRC es mayor que un ST, esto es especialmente notorio a partir de un nivel de protección del 40%. Se deduce que entre mayor sea el nivel de calidad requerida (p_0 , p_1 y p_2), existe la probabilidad de tener mayor rechazo de producto.

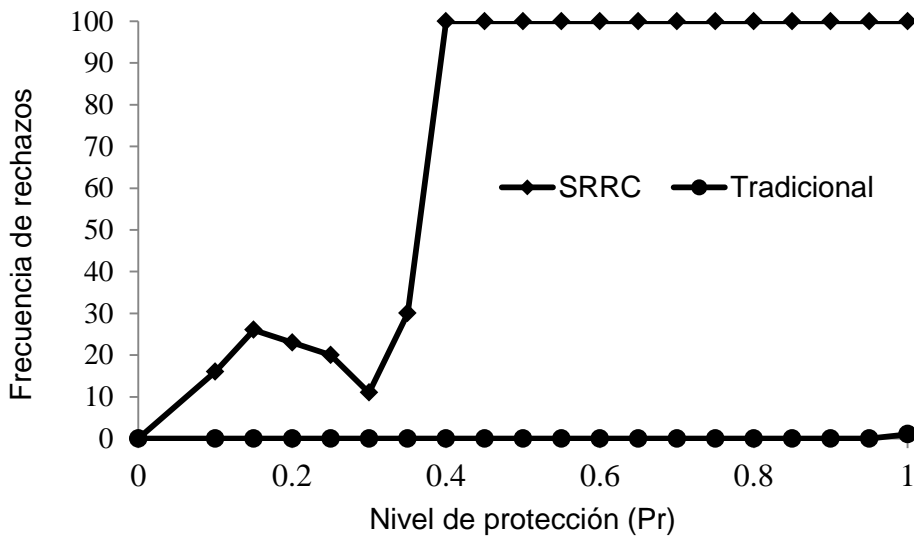


Figura 9. Función de probabilidad de rechazo con dos sistemas de producción de nopal verdura, SRRC: ($p_0= 94.19$, $p_1= 5.80$ y $p_2=0$ %) y ST ($p_0= 18.33$, $p_1= 81.66$ y $p_2=0$ %).

4.6 CONCLUSIONES

De acuerdo con el plan de muestreo propuesto y al nivel de calidad de los productores de nopal verdura de la región oriente del Estado de México, se requiere un tamaño de muestra de por lo menos 20 kg, para lograr un nivel de protección del $P_r=82$ %. Además se determinó que bajo los sistemas de reducción de riesgos de contaminación, el nivel de protección es mayor porque existe la posibilidad de tener mayor rechazo, y de esta manera se aumenta el nivel de calidad requerido por el consumidor. La combinación de planes de muestreo de dos y tres clases con simulación Montecarlo, utilizando la distribución Pert, proporciona una metodología que permite comparar dos o más sistemas de producción de productos hortofrutícolas, si se define previamente un nivel de protección deseado y los posibles valores mínimo, probable y máximo deseables del porcentaje de unidades que cumplen con las especificaciones microbiológicas requeridas para asegurar la salud del consumidor.

4.7 LITERATURA CITADA

- ANMAT. 2005. Guía de Interpretación de Resultados Microbiológicos de Alimentos. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. Argentina. 21 p.
- Bray, D. F., D. A. Lyon and I. W. Burr. 1973. Three class attributes plans in acceptance sampling. *Technometrics* 15(3):575-585.
- Callejas, N., J. A. Matus, J. A. García, M. A. Martínez y J. M. Salas. 2006. Situación actual y perspectivas de mercado para la tuna, el nopalito y derivados en el Estado de México. *Agrociencia* 43: 73-82.
- CDC. 2008. Investigación de los brotes infecciosos causados por *Salmonella saintpaul*: Actualización del 30 de julio de 2008 - Información sobre el número de casos actualizada hasta las 9 pm EST del 29 de julio de 2008. Center for Disease Control and Prevention. URL: <http://www.cdc.gov/spanish/especialesCDC/SalmonellaSaintpaul/index.htm>.
- Dahm, S. 2004. Microbiological sampling plans-Statistical aspects. *Mitt. Lebensm. Hyg.* 95: 32-44.
- FAO. 1989. Manuales para el control de calidad de los alimentos. Introducción a la toma de muestras de alimentos. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. FAO. Roma 1989.
- Forsythe, S. 2003. Alimentos Seguros: Microbiología. 3a. ed. Acribia. Zaragoza, España. A. 404 p.
- García-Gómez. R., J. Chavez-Espinosa, A. Mejía-Chávez and C. Durán-de-Bazúa. 2002. Microbiological determinations of some vegetables from the Xochimilco zone in Mexico City, Mexico. *Rev Latinoam Microbiol.* 44 (1): 24-30.
- Gorris, L. G. M. 2006. Food safety objective: An integral part of food chain management. *Food Control* 16:801-809
- ICMSF. 2002. Microorganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Management. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Kluwer. Academic/Plenum Publishers (ed). New York, USA. 362 p.
- Johnston, L. M., L. Jaykus, D. Moll, J. Anciso, B. Mora and C. L. Moe. 2006. A field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin. *Int. J. Food Microbiol.* 112:83-95.
- Legan, J. D., M. H. Vandeven, S. Dahms and M. B. Cole. 2001. Determining the concentration of concentration of microorganisms controlled by attributes sampling plans. *Food Control* 13:137-147.

- Mun J. 2011. Simulador de Riesgo. Manual de Usuario en Español. Real Options Valuation, Inc.
- Nguyen-the, C. and F. Carlin. 2004. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 34:371-401.
- Premachandra, I.M. 2001. An approximation of the activity duration distribution in PERT. *Comp. Oper. Res.* 28(5): 443-452
- RiskAMP. 2010. Monte Carlo Add-In for Excel Professional. Structured Data. New York City; NY, USA.
- Schothorst, M. van, M. H. Zwietering, T. Ross, R. L. Buchanan and M. B. Cole. 2009. Relating microbiological criteria to food safety objectives and performance objectives. *Food Control* 20:967-979.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2007. Ley Federal de Sanidad Vegetal Diario Oficial de la Federación.
- Whiting, R.C., A. Rainosek, R. L. Buchanan, M. Miliotis, D. LaBarre, W. Long, A. Ruple and S. Schaub. 2006. Determining the microbiological criteria for lot rejection from the performance objective or food safety objective. *Int. J. Food Microbiol.* 110: 263–267.
- Zwietering, M. H. 2009. Quantitative risk assessment: Is more complex always better?. Simple is not stupid and complex is not always more correct. *Int. J. Food Microb.* 134:57–62.

5. CONCLUSIONES GENERALES

En base a los resultados que se obtuvieron con el desarrollo de este trabajo se concluye:

La implementación de Sistemas de Reducción de Riesgos de Contaminación, reduce el riesgo de contaminación por patógenos y la incidencia de contaminación por residuos de plaguicidas.

Salmonella sp y *Escherichia coli* son patógenos capaces de crecer y sobrevivir en nopal verdura pelado y sin desespinar a 4 y 18 °C por 16 días.

Cladodios de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill var. Atlixco y pericarpios de *Opuntia albicarpa* Scheinvar var. Alfajayucan y Villanueva contienen compuestos fenólicos con potencial microbicida.

Se considera que el tamaño de muestra para análisis microbiológicos de nopal debe de elegirse a partir de un plan de muestreo propuesto y el nivel de calidad de los productores. Los sistemas de reducción de riesgos de contaminación, proporcionan un nivel de protección mayor porque existe la posibilidad de tener mayor rechazo, y de esta manera se aumenta el nivel de calidad requerido por el consumidor.