

UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA
ESCUELA DE INGENIERÍA

Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental
DOCTORADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS



PULSOS DE LUZ DE ALTA INTENSIDAD PARA EL CONTROL DE
MOHOS EN FRUTOS SECOS

Documento de tesis doctoral que presenta el
Ing. David González Albarrán

Codirectores de tesis: Dres. Enrique Palou García y Aurelio López-Malo Vigil
Santa Catarina Mártir, San Andrés Cholula, Puebla

Primavera 2022

Tabla de contenido

Índice de tablas.....	v
Índice de figuras	vii
Índice de ecuaciones	x
1. Introducción	1
2. Objetivos.....	4
Objetivo General	4
Objetivos Específicos	4
3. Plan de Investigación.....	6
3.1. Aislamiento e identificación de mohos incidentes en nueces, leguminosas, semillas y frutos secos mexicanos	6
3.2. Selección de las especies de mohos de interés para estudios subsecuentes ...	6
3.3. Tratamientos in-vivo con pulsos de luz de alta intensidad (PLAI).....	6
3.4. Modelación matemática de la inactivación de los mohos seleccionados expuestos a tratamientos con PLAI	7
4. Revisión Bibliográfica.....	8
4.1. Los frutos secos.....	8
4.1.1. Cacahuete (<i>Arachis hypogaea</i>)	8
4.1.2. Nuez de castilla (<i>Juglans regia</i>).....	9

4.1.3. Nuez pecana (<i>Carya illinoensis</i>)	11
4.1.4. Calabaza pipiana (<i>Cucurbita argyrosperma</i>)	12
4.2. Mohos patógenos y deterioradores de los alimentos	16
4.2.1. Cambios morfológicos y bioquímicos de los mohos en función del medio de crecimiento	18
4.2.2. Contaminación por mohos toxígenos y toxinas fúngicas en nueces, leguminosas y semillas	19
4.2.3. Estado de la contaminación por mohos toxígenos y toxinas fúngicas en alimentos en México	21
4.3. Tratamientos por irradiación con luz UV como una alternativa para la desinfección de alimentos	25
4.3.1. Irradiación como método de conservación: aplicaciones en alimentos sólidos	27
4.3.2. Tratamientos con luz ultravioleta de onda corta (UV-C).....	28
4.3.3. Tratamientos con pulsos de luz de alta intensidad (PLAI)	30
4.3.4. Efectos de la irradiación con UV-C y PLAI sobre microorganismos	43
4.3.5. Desarrollo de resistencia de microorganismos a tratamientos con radiación	46
4.3.6. Efectos de los tratamientos por irradiación en las propiedades nutricionales, fisicoquímicas y sensoriales de los alimentos	47

4.4.	Modelación matemática de tratamientos PLAI	48
5.	Materiales y Métodos	61
5.1.	Obtención de muestras	61
5.2.	Aislamiento e identificación de mohos incidentes	64
5.2.1.	Recuento de mohos y levaduras	64
5.2.2.	Aislamiento e identificación de mohos	65
5.2.3.	Evaluación de la producción de toxinas fúngicas.....	67
5.2.4.	Selección de las especies de moho para estudios subsecuentes.....	67
5.2.5.	Análisis estadísticos	68
5.3.	Tratamientos con pulsos de luz de alta intensidad	69
5.3.1.	Inoculación de las semillas con los mohos seleccionados y cuantificación de los microorganismos	70
5.3.2.	Tratamientos con PLAI	72
5.3.3.	Modelación matemática de la inactivación de los mohos seleccionados por medio de tratamientos con PLAI	77
6.	Resultados y discusión	83
6.1.	Análisis fisicoquímico de los frutos secos	83
6.2.	Conteo, aislamiento e identificación de mohos y levaduras en los frutos secos	
	88	
6.2.1.	Aislamiento e identificación de mohos	92

6.2.2.	Incidencia de diferentes géneros de mohos	100
6.2.3.	Variación regional en la microbiota de los frutos secos.....	104
6.3.	Tratamientos con pulsos de luz de alta intensidad	107
6.3.1.	Pruebas in-vitro	108
6.3.2.	Pruebas con inoculación en seco	114
6.3.3.	Pruebas con inoculación por gota.....	116
7.	Conclusiones	126
8.	Referencias	129
9.	Anexos.....	155
9.1.	Anexo 1: Fórmulas de medios de cultivo.....	155
9.1.1.	Concentrado Czapek.....	155
9.1.2.	Concentrado CS.....	155
9.1.3.	Agar nitrato con 25% de glicerol	155
9.1.4.	Agar neutro de creatina sacarosa.....	156
9.1.5.	Agar de leche de coco.....	156

Índice de tablas

Tabla 1. Estudios sobre la efectividad de tratamientos con PLAI en diferentes microorganismos.....	32
Tabla 2. Modelación de tratamientos con PLAI en sistemas sólidos.....	49
Tabla 3. Características de las regiones para el estudio (INEGI, 2020).	61
Tabla 4. Lista de muestras de frutos secos por región.....	62
Tabla 5. Niveles de inoculación obtenidos por medio del método de inoculación en seco.....	71
Tabla 6. Intensidad de los tratamientos con PLAI para las pruebas <i>in-vitro</i>	74
Tabla 7. Combinaciones de tiempo y distancia para los tratamientos con PLAI de frutos secos inoculados en seco.	74
Tabla 8. Dosis de los tratamientos con PLAI para las pruebas con inoculación por gota.	75
Tabla 9: Lista de los artículos utilizados para modelación de datos de inactivación	81
Tabla 10. Humedad, actividad de agua y conteo de mohos y levaduras de las semillas analizadas.	86
Tabla 11. Coeficientes de correlación (r) y valores de p para el conteo de mohos y levaduras contra actividad de agua y contenido de humedad para los distintos frutos secos.	91
Tabla 12. Especies de moho aisladas de las diferentes semillas.....	93
Tabla 13. Identificación de especies de mohos en base a sus características morfológicas.	98

Tabla 14. Correlaciones entre las variables y los componentes principales.....	107
Tabla 15. Parámetros del modelo de Weibull para las pruebas con PLAI <i>in-vitro</i>	112
Tabla 16. Coeficientes del modelo logístico y modelo de tiempo de vida.....	117

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de la producción nacional total de cacahuete (en toneladas) entre 2014 y 2020.....	9
Figura 2. Mapa de la producción nacional total de nuez de castilla (en toneladas) entre 2014 y 2020.	10
Figura 3. Mapa de la producción nacional promedio de nuez pecana (en toneladas) entre 2014 y 2020.	12
Figura 4. Mapa de la producción nacional promedio de calabaza chihua (en toneladas) entre 2014 y 2020.	14
Figura 5. Curva de inactivación arbitraria mostrando las tres estructuras características correspondientes a las tres fases de inactivación microbiana.	57
Figura 6. Diagrama de caja y bigote de la distribución del contenido de mohos y levaduras. La línea punteada indica el nivel máximo permitido por la legislación mexicana.	90
Figura 7. Incidencia de especies de moho importantes en los frutos secos estudiados.	101
Figura 8: Incidencia de algunas especies importantes de moho en los frutos secos del estudio, en las diferentes regiones de México.....	105
Figura 9. Gráfico de dispersión en los ejes de los componentes principales F_1 , F_2 y F_3 . Las figuras corresponden a cada una de las regiones en la siguiente manera: centro (esfera), noreste (cubo), noroeste (cilindro), sureste (octaedro) y occidente (icosaedro).	106

Figura 10. Curva de inactivación de <i>A. niger</i> ajustada al modelo de Weibull.	109
Figura 11. Curva de inactivación de <i>A. flavus</i> ajustada al modelo de Weibull.	109
Figura 12. Curva de inactivación de <i>Penicillium</i> spp. ajustada al modelo de Weibull	110
Figura 13. Mediciones de temperatura para la inactivación de mohos in-vitro a diferentes fluencias de PLAI.	111
Figura 14. Curvas de frecuencia para el modelo de Weibull de los mohos evaluados en este estudio. Las líneas punteadas representan el modelo de Weibull, las líneas continuas representan las curvas de frecuencia.	113
Figura 15. Frutos secos durante el proceso de inoculación en seco	114
Figura 16. Inactivación de <i>Aspergillus flavus</i> en cacahuate (derecha) y pepita de calabaza (izquierda) a tres distancias de la lámpara (5.74, 8.28 y 10.82 cm).	115
Figura 17. Progreso del crecimiento de <i>A. niger</i> en cacahuate durante 7 días tras la exposición a los tratamientos con PLAI.....	118
Figura 18. Progreso del crecimiento de <i>A. flavus</i> en cacahuate durante 7 días tras la exposición a los tratamientos con PLAI.....	119
Figura 19. Progreso del crecimiento de <i>A. niger</i> en pepita de calabaza durante 7 días tras la exposición a los tratamientos con PLAI.	120
Figura 20. Progreso del crecimiento de <i>A. flavus</i> en pepita de calabaza durante 7 días tras la exposición a los tratamientos con PLAI.	121
Figura 21. Temperaturas de las muestras de frutos secos tras los tratamientos con PLAI. Las barras muestran la desviación estándar.	122
Figura 22. Mapa de probabilidad de falla para los tratamientos con PLAI en frutos secos inoculados por gota.	123

Figura 23. Tiempos de tratamiento necesarios para reducir la probabilidad de crecimiento de distintas combinaciones de mohos y frutos secos tras 7 días de incubación.	124
Figura 24. Tiempo de falla para diferentes combinaciones de mohos y frutos secos en función del tiempo de tratamiento con PLAI.....	124

Índice de ecuaciones

Ec. 1	58
Ec. 2	58
Ec. 3	64
Ec. 4	66
Ec. 5	77
Ec. 6	77
Ec. 7	78
Ec. 8	78
Ec. 9	78
Ec. 10	79
Ec. 11	79
Ec. 12	79
Ec. 13	79
Ec. 14	80

1. Introducción

2

3 Los alimentos secos y de humedad intermedia suelen considerarse como estables ante
4 el deterioro microbiano, debido a que su baja actividad de agua impide el desarrollo de
5 la mayoría de los microorganismos. Sin embargo, los alimentos con baja actividad de
6 agua aún son susceptibles a contaminación microbiana y al crecimiento de
7 microorganismos como los mohos y las levaduras.

8 Algunos mohos deterioradores de alimentos se caracterizan por la producción
9 de metabolitos secundarios de toxicidad importante para los seres humanos. Por
10 ejemplo, las aflatoxinas producidas por algunos mohos del género *Aspergillus* están
11 entre los más potentes carcinógenos para el hígado que se conocen (Pitt y Hocking,
12 2009). En México, el cáncer de hígado conforma una proporción importante del total de
13 las muertes por cáncer. Sin embargo, no existe información que permita identificar
14 cuántos casos de cáncer de hígado han sido causados por exposición a toxinas
15 fúngicas.

16 En México, los alimentos secos y de humedad intermedia, como granos,
17 semillas y frutos secos son de gran importancia económica y cultural. México es uno de
18 los principales productores a nivel mundial de nueces, las cuales se cultivan en la
19 mayor parte del territorio nacional y además son ingredientes importantes de uso
20 común en platillos tradicionales de la gastronomía mexicana, como los moles. Otras
21 semillas, como los cacahuates, las semillas o pepitas de calabaza y las semillas de
22 girasol se usan comúnmente como parte de dulces típicos regionales e ingredientes

23 para panadería y repostería. Finalmente, no se puede dejar de mencionar la gran
24 importancia económica y cultural de los cereales como el maíz, el arroz, el trigo y el
25 amaranto, ni de las leguminosas, como los frijoles, la soya, las lentejas y los
26 garbanzos, los cuales forman la base de la dieta de la gran parte de la población
27 nacional, tanto urbana como rural.

28 A pesar de la gran importancia de estos alimentos, existe muy poca información
29 al respecto de la incidencia de mohos patogénicos y de la presencia de sus
30 micotoxinas. La gran mayoría de los estudios que se han realizado sobre la incidencia
31 de mohos y micotoxinas en alimentos en México se han hecho sobre maíz y sus
32 productos. Se ha encontrado que los niveles de contaminación regularmente exceden
33 lo permitido tanto por las regulaciones mexicanas como extranjeras y que las zonas
34 rurales del país son más vulnerables a la contaminación que las zonas urbanas. Los
35 pocos estudios que se han hecho al respecto pintan una imagen preocupante del
36 estado actual del control de estos microorganismos en el territorio nacional: en un
37 estudio reciente se encontró que todas las muestras de nueces analizadas en la
38 Ciudad de México estaban contaminadas con aflatoxinas a niveles que pueden resultar
39 en daños a la salud de los consumidores (Adaya-González, Carvajal-Moreno, Rojo-
40 Callejas y Ruiz-Velazco, 2015). Un componente importante del problema es la falta de
41 regulación en la venta de estos alimentos, los cuales se pueden encontrar comúnmente
42 en venta a granel sin ninguna clase de empaque o etiquetado que permita rastrear su
43 procedencia.

44 Ante esta problemática, una posible solución es el diseño de procesos
45 postcosecha para la eliminación de los mohos productores de toxinas de los alimentos

46 secos y de humedad intermedia. En los últimos años han surgido nuevas tecnologías
47 que se muestran prometedoras para esta función. En particular, los tratamientos con
48 radiación ultravioleta de onda corta (UV-C) y con pulsos luminosos de alta intensidad
49 (PLAI) han demostrado ser efectivos para la eliminación de microorganismos en los
50 alimentos. De las dos tecnologías, tan solo los tratamientos con UV-C son utilizados a
51 escala industrial y su aplicación se limita principalmente a la pasteurización de
52 alimentos líquidos, como jugos de frutas y lácteos.

53 El uso de tratamientos con radiación presenta muchos retos para su aplicación en
54 alimentos sólidos. Sin embargo, estas tecnologías son prometedoras como
55 tratamientos económicamente viables para la desinfección de semillas y frutos secos.

56 El objetivo final de estos estudios será diseñar un proceso viable para la solución
57 del problema de contaminación con mohos patogénicos en semillas y frutos secos.

58

59 **2. Objetivos**

60 ***Objetivo General***

61 Evaluar la respuesta en términos morfológicos y bioquímicos de diferentes especies de
62 mohos causantes del deterioro de nuez de castilla (*Juglans regia*), nuez pecana (*Carya*
63 *illinoensis*), cacahuete (*Arachis hypogaea*) y pepita de calabaza (*Cucurbita*
64 *argyrosperma*) cuando son expuestos a condiciones de estrés inducido por
65 tratamientos con pulsos de luz de alta intensidad (PLAI), así como los cambios
66 fisicoquímicos en estos alimentos.

67 ***Objetivos Específicos***

- 68 1. Aislar e identificar diferentes especies de mohos causantes del deterioro de nuez
69 de castilla (*Juglans regia*), nuez pecana (*Carya illinoensis*) cacahuete (*Arachis*
70 *hypogaea*) y pepita de calabaza (*Cucurbita argyrosperma*) procedentes de las
71 cinco diferentes regiones de México (Noroeste, Noreste, Occidente, Centro y
72 Sureste), y determinar la incidencia de micotoxinas en estos alimentos.
- 73 2. Seleccionar tres especies de mohos de entre los que fueron aislados e
74 identificados de las nueces y semillas en base a su incidencia, capacidad de
75 deteriorar los alimentos y capacidad de producción de micotoxinas.
- 76 3. Determinar las dosis mínimas necesarias para la inactivación de los principales
77 mohos aislados usando los PLAI.

78 4. Desarrollar y validar modelos matemáticos para la predicción del crecimiento de
79 moho bajo distintos regímenes para su inactivación, al aplicar PLAI, en los
80 alimentos evaluados.
81

82 **3. Plan de Investigación**

83 *3.1. Aislamiento e identificación de mohos incidentes en nueces, leguminosas, semillas y* 84 *frutos secos mexicanos*

85 Se estudió la incidencia de mohos deterioradores y patogénicos en nuez de castilla,
86 nuez pecana, cacahuate, y pepita de calabaza en venta a granel en establecimientos
87 nacionales. Para los estudios de incidencia de mohos se utilizó la técnica de conteo en
88 placa para determinar la carga microbiana inicial de los alimentos. A partir de las placas
89 de conteo se aislaron mohos individuales para su identificación, la cual se hizo por
90 medio de claves dicotómicas.

91 *3.2. Selección de las especies de mohos de interés para estudios subsecuentes*

92 A partir de las especies de mohos aisladas e identificadas en las nueces y semillas se
93 seleccionaron cuatro con base en su capacidad de producción de metabolitos tóxicos,
94 su capacidad para deteriorar los alimentos y su incidencia en las semillas.

95 *3.3. Tratamientos in-vivo con pulsos de luz de alta intensidad (PLAI)*

96 Se diseñaron técnicas de desinfección postcosecha y/o postproceso para los
97 alimentos estudiados. Se realizaron muestreos para evaluar el contenido inicial de
98 mohos en las muestras de alimentos, posteriormente se les trataron con pulsos de luz
99 de alta intensidad (PLAI), controlando la distancia hacia la fuente de luz (cm), el tiempo
100 de exposición (s) y la intensidad luminosa de las fuentes de luz (J/cm^2) como las
101 variables a evaluar mediante un diseño experimental tipo superficie de respuesta. Estos
102 experimentos tuvieron el objetivo de identificar las dosis mínimas necesarias para

103 lograr la completa inactivación de los mohos seleccionados en una concentración
104 determinada (dosis mínima inhibitoria, DMI). Una vez diseñados los tratamientos para
105 la desinfección de los alimentos, se realizaron estudios de incidencia de mohos y
106 toxinas fúngicas sobre muestras de los alimentos tratadas con UV-C y PLAI bajo
107 condiciones de almacenamiento regulares (20° C, humedad relativa baja) y de deterioro
108 acelerado (35° C, humedad relativa alta) con el objetivo de evaluar la efectividad de
109 estos tratamientos para inactivar los mohos y prevenir la contaminación con
110 micotoxinas.

111 ***3.4. Modelación matemática de la inactivación de los mohos seleccionados expuestos a*** 112 ***tratamientos con PLAI***

113 Se realizó una modelación de la inactivación microbiana en función de la distancia, el
114 tiempo de exposición y la intensidad luminosa, con el objetivo de facilitar el diseño de
115 tratamientos antimicrobianos utilizando estas tecnologías. Se validaron estos modelos
116 matemáticos con métodos experimentales.

117

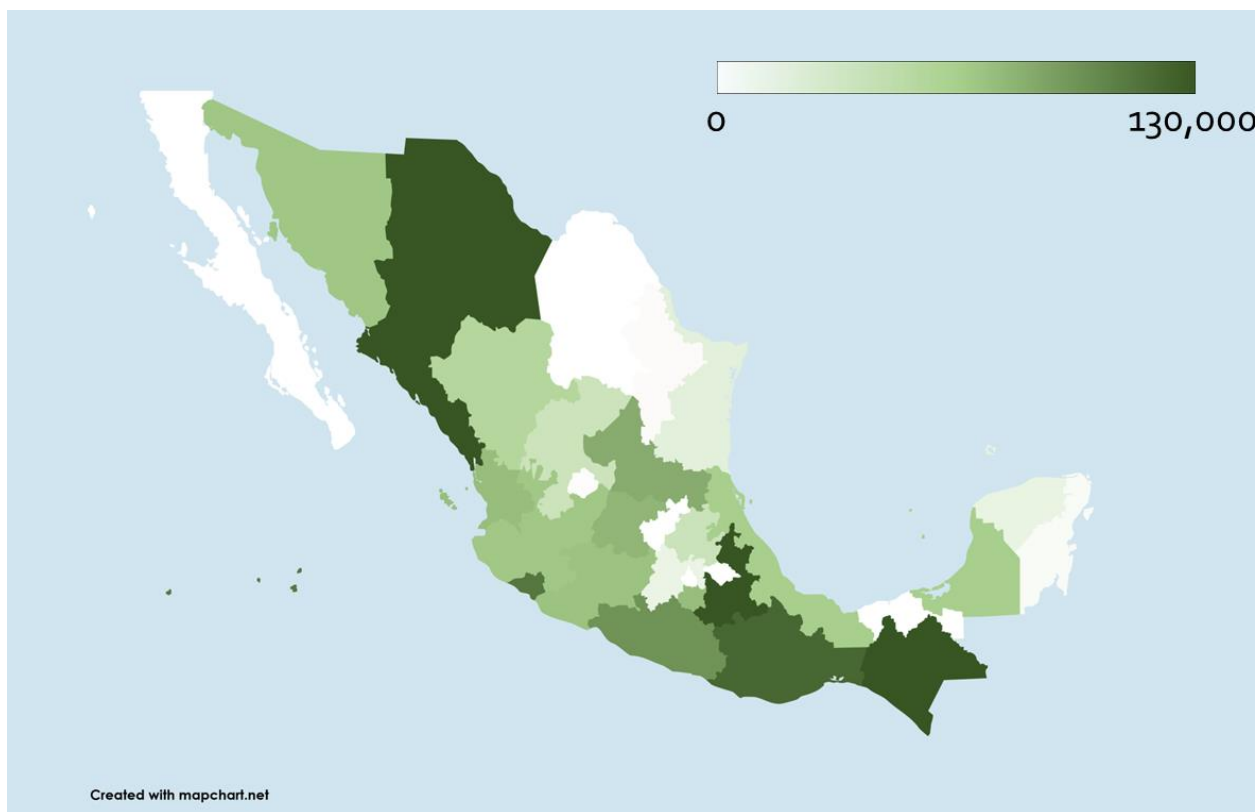
118 **4. Revisión Bibliográfica**

119 *4.1. Los frutos secos*

120 **4.1.1. Cacahuate (*Arachis hypogaea*)**

121 El cacahuate, o maní (*Arachis hypogaea*) es una leguminosa originaria de Sudamérica,
122 pero que actualmente se cultiva a nivel mundial, siendo uno de los cultivos vegetales
123 más importantes. El principal uso de los cacahuates a nivel global es para la
124 producción de aceites comestibles debido al alto contenido de lípidos de la semilla
125 (alrededor del 48% de su peso), pero también es importante su uso como materia
126 prima en la industria de la transformación, así como su uso como alimento para ganado
127 (Montero Torres, 2020). Los cacahuates son una fuente importante de ácidos grasos
128 poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés) y su consumo, así como el de las
129 nueces, se ha relacionado con mejoras a la salud cardiovascular (Toomer, 2018). Al ser
130 de la familia de las leguminosas, los cacahuates cuentan con un mejor balance de
131 nutrientes a comparación de las nueces, ya que cuentan con un mayor contenido de
132 proteínas que estas (Ros, 2010; Toomer, 2018).

133 En México, la producción de cacahuate se concentra principalmente en el estado
134 de Coahuila, aunque se cosecha en casi todo el territorio nacional (Figura 1). Se
135 considera un cultivo altamente importante en el país por ser resistente a la sequía, así
136 como conservador del suelo gracias a la capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico
137 que comparte con otras plantas de la familia de las leguminosas.



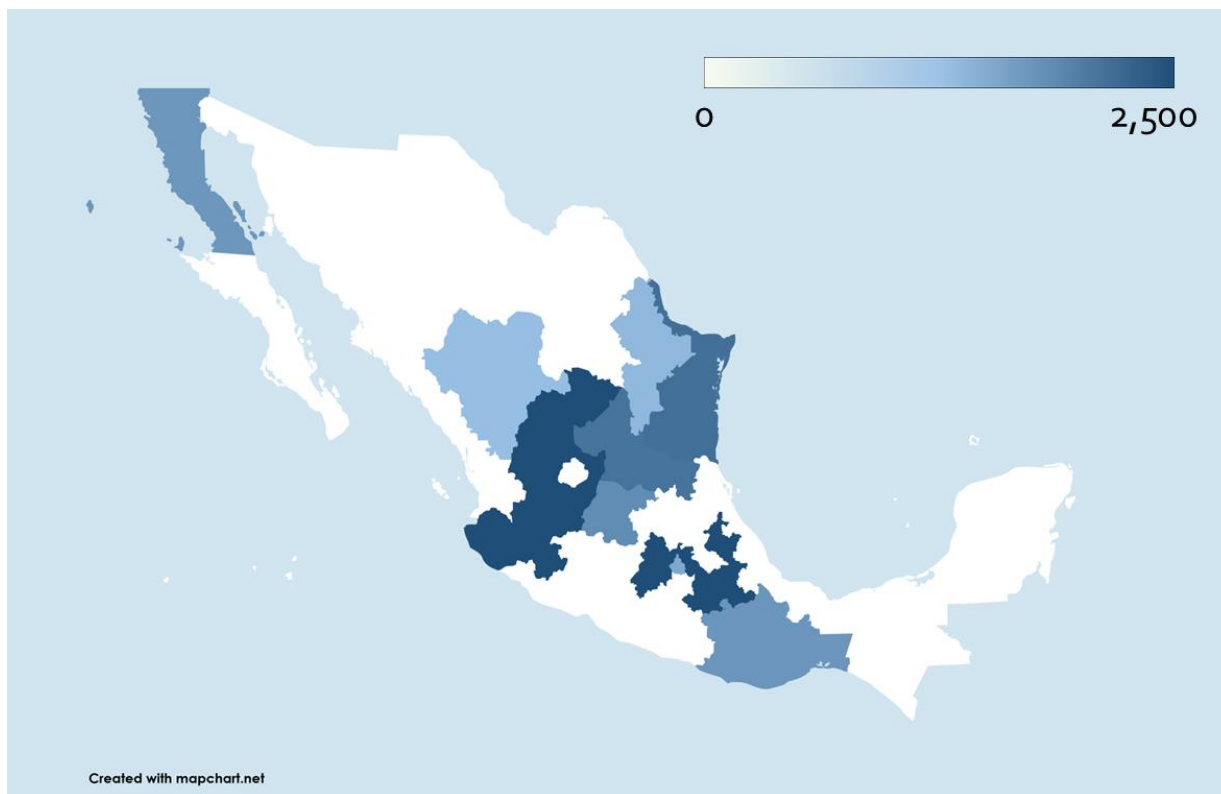
138

139 **Figura 1.** Mapa de la producción nacional total de cacahuete (en toneladas) entre 2014
 140 y 2020.

141 **4.1.2. Nuez de castilla (*Juglans regia*)**

142 La nuez de castilla es el fruto del árbol del nogal (*Juglans regia*), originario de Europa y
 143 Asia, pero que actualmente se cultiva alrededor del mundo. En México, la producción
 144 se centra en los estados de Jalisco y México. Este fruto seco proviene de la semilla de
 145 una clase de fruto conocido como “drupa”, de anatomía similar a un durazno o
 146 melocotón. Botánicamente, entonces, no se le considera una “nuez verdadera” (Fátima
 147 *et al.*, 2018). Nutricionalmente, la nuez de castilla es fuente importante de ácidos
 148 grasos poliinsaturados, proteínas, vitaminas (niacina, tocoferoles, vitamina C, vitamina
 149 B6 y ácido fólico), minerales (calcio, magnesio, fósforo y potasio) y polifenoles (Nguyen

150 y Vu, 2021). También es una buena fuente de flavonoides y fitoesteroles, los cuales
151 tienen efectos benéficos en la salud cardiovascular (Fatima *et al.*, 2018)



152
153 **Figura 2.** Mapa de la producción nacional total de nuez de castilla (en toneladas) entre
154 2014 y 2020.

155 A nivel mundial, China es el principal productor de nuez de castilla (produciendo
156 alrededor de 2,000,000 de toneladas del fruto, con cáscara, al año), así como el
157 principal consumidor de la misma. Otros productores importantes incluyen a los
158 Estados Unidos, India y Turquía (Nguyen y Vu, 2021).

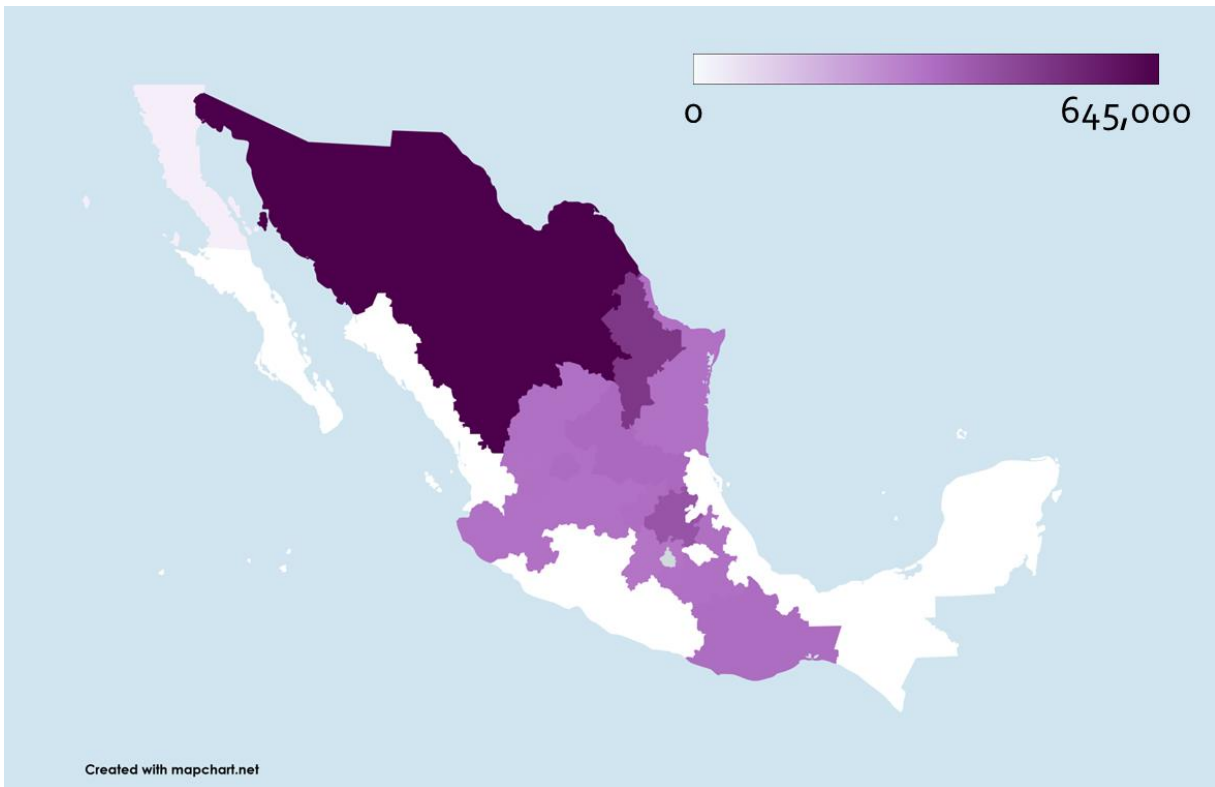
159 En México, la producción de nuez de castilla se ha realizado de manera tradicional
160 en un esquema de producción familiar, a pequeña escala, desde su introducción en el
161 siglo XVI. En años recientes, la producción local de este fruto seco se ha visto

162 amenazada por las crecientes importaciones, pero sigue siendo fuente importante de
163 sustento para las familias productoras, en particular en la región central del país donde
164 su producción está intrínsecamente relacionada con la tradición del chile en nogada
165 (Luna-Méndez *et al.*, 2013).

166 **4.1.3. Nuez pecana (*Carya illinoensis*)**

167 La nuez pecana es el fruto de un árbol de la familia *Juglandaceae*, nativo de la región
168 del sur de Estados Unidos y el norte de México (Orona-Castillo *et al.*, 2019). Al igual
169 que la nuez de castilla, la nuez pecana proviene de la semilla de una drupa, por lo que
170 botánicamente no es una nuez verdadera. En el país, se cultiva principalmente en su
171 rango nativo, siendo el estado de Chihuahua el mayor productor de este fruto seco, con
172 un 64% de la producción nacional. El fruto es de alta importancia económica en el país,
173 y México se ha posicionado en años recientes como el principal productor de esta nuez
174 a nivel mundial, superando por primera vez en 2020 la producción de Estados Unidos
175 (Hernández-Romo, 2020; Orona-Castillo *et al.*, 2019).

176 La nuez pecana es rica en grasas, con una composición de entre 58 y 66% de
177 aceite en base peso. También, de entre las nueces de árbol (nuez del Brasil, piñón,
178 pistache y anacardo), la nuez pecana es la que tiene un más alto contenido relativo de
179 ácidos grasos insaturados, el cual puede llegar a representar hasta un 93% del
180 contenido total de aceite del fruto (Atanasov *et al.*, 2018). Al igual que la nuez de
181 castilla, la nuez pecana es rica en compuestos bioactivos, como ácidos fenólicos,
182 flavonoides, saponinas, fitoesteroles y taninos, los cuales tienen propiedades benéficas
183 para el sistema cardiovascular (Tanwar *et al.*, 2021).



184

185 **Figura 3.** Mapa de la producción nacional promedio de nuez pecana (en toneladas)
 186 entre 2014 y 2020.

187 **4.1.4. Calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma*)**

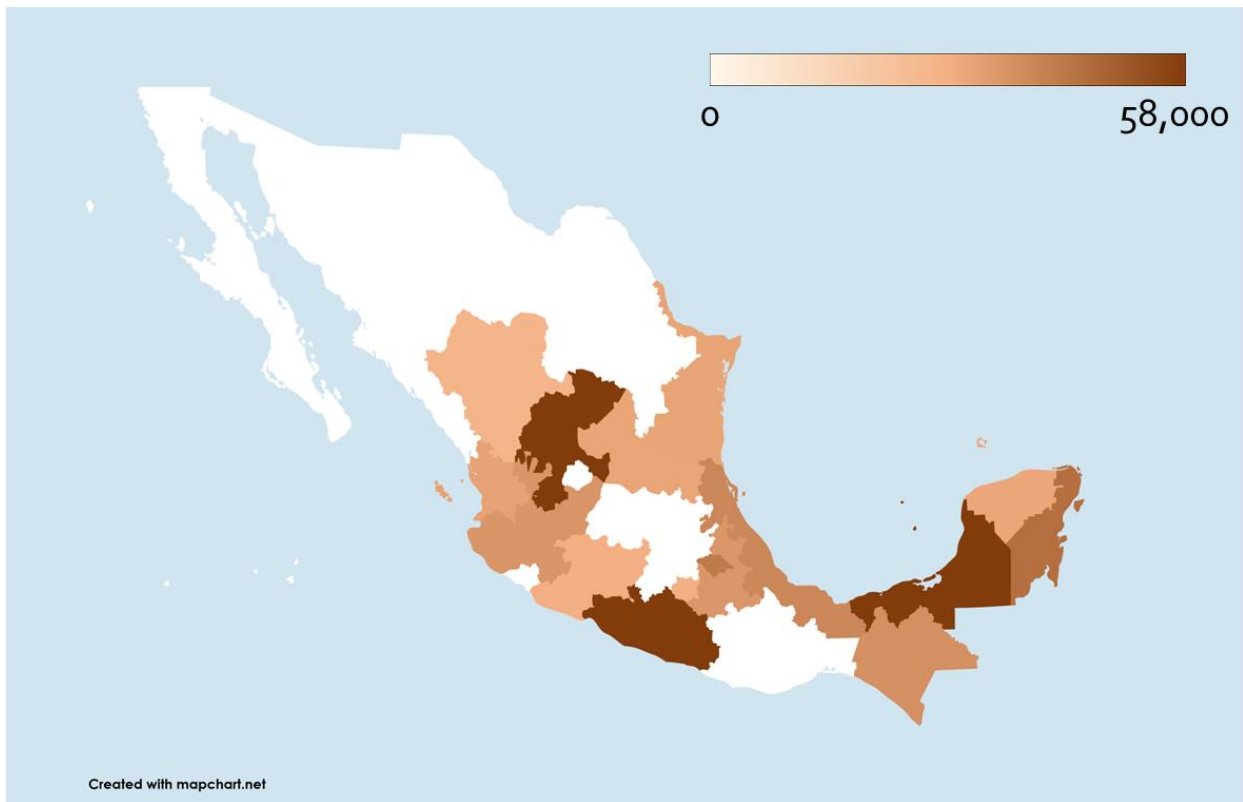
188 La calabaza pipiana, calabaza chihua o calabaza criolla (*Cucurbita argyrosperma* C.
 189 Huber), también conocida como *silver-seed gourd* (calabaza de semilla plateada) en
 190 regiones angloparlantes, es una variedad de calabaza originaria de México que se
 191 cultiva principalmente por su semilla. En nuestro país, las semillas o pepitas de esta
 192 cucurbita se utilizan comúnmente para la elaboración de platillos típicos o se consumen
 193 por sí solas a manera de refrigerio. Por otro lado, el fruto se utiliza por sus propiedades
 194 medicinales, además de también ser utilizado como fuente de alimento (Sánchez-de la
 195 Vega *et al.*, 2018). La planta es de gran importancia cultural y gastronómica en México

196 y otros países de América Latina, sin embargo, dado que su cultivo se da
197 principalmente como agricultura de subsistencia (es decir, para fines no comerciales),
198 en los registros su producción es subestimada (Sánchez-de la Vega, *et al.*, 2018). A
199 pesar de que el uso y venta de las semillas de *C. argyrosperma* están ampliamente
200 distribuidos a lo largo de la República Mexicana, existe un vacío de información
201 científica con respecto a las propiedades de esta semilla, como son su contenido
202 nutricional, propiedades fisicoquímicas y sensoriales, flora microbiana y potenciales
203 aplicaciones nutraceuticas y funcionales.

204 La evidencia más antigua de la domesticación de *C. argyrosperma* data de hace
205 aproximadamente 8600 años (Rannere *et al.*, 2007). Originalmente, las calabazas
206 fueron domesticadas por sus semillas sin tener en cuenta la calidad del fruto
207 comestible. A lo largo de los años, las especies se seleccionaron para dar lugar a las
208 variedades modernas, en las que tanto el fruto como las semillas son comestibles
209 (Valdés Restrepo, *et al.*, 2014). En el caso de *C. argyrosperma*, las variedades
210 cultivadas actualmente siguen poniendo el énfasis en la producción de semillas
211 comestibles, dando como resultado un fruto que por lo general se considera de calidad
212 inferior al de otras cucúrbitas (Sánchez-de la Vega *et al.*, 2018).

213 La especie está dividida en seis subespecies, de las cuales cinco corresponden
214 a variedades domesticadas y una corresponde a la variedad silvestre. La variedad
215 domesticada que se cultiva por sus semillas comestibles es *C. argyrosperma* ssp.
216 *argyrosperma* var. *argyrosperma* (Castellanos Morales *et al.*, 2019; Sánchez-de la
217 Vega *et al.*, 2018). El rango geográfico natural de la especie abarca toda la República

218 Mexicana, donde se cultiva principalmente en las regiones costeras (Castellanos
219 Morales *et al.*, 2019).



220
221 **Figura 4.** Mapa de la producción nacional promedio de calabaza chihua (en toneladas)
222 entre 2014 y 2020.

223
224 *C. argyrosperma* no es la única especie de calabaza que se cultiva por sus
225 semillas comestibles; las especies *C. maxima*, *C. pepo* y *C. moschata* son también
226 cultivadas para esta función y su uso está más ampliamente distribuido a nivel
227 internacional (Patel, 2013). Por esta razón, la mayoría de los estudios científicos
228 realizados sobre las propiedades de la semilla de calabaza se refieren a las semillas de
229 alguna de estas tres especies. En una gran variedad de estos estudios se ha

230 encontrado que las semillas de diversas especies de calabaza cuentan con
231 propiedades nutricionales, nutracéuticas y funcionales que son de gran interés para la
232 ciencia de alimentos. El perfil nutricional de las semillas de calabaza presenta una
233 cantidad importante de ácidos grasos, proteína y carbohidratos, lo cual las vuelve una
234 fuente importante de energía (Patel, 2013; Syed *et al.*, 2019). En particular, el aceite de
235 semilla de calabaza ha sido de gran interés para la ciencia por su potencial para
236 utilizarse como un aceite comestible alternativo, así como por la presencia de agentes
237 bioactivos.

238 En años recientes las investigaciones sobre *C. argyrosperma* se han enfocado en la
239 diversidad genética que la especie puede aportar al cultivo de otras cucúrbitas (Balvino-
240 Olvera *et al.*, 2017; Barrera-Redondo *et al.*, 2019; Castellanos Morales *et al.*, 2019;
241 Sánchez-de la Vega *et al.*, 2018) y en su aprovechamiento como alimento para ganado
242 (Crosby-Galván *et al.*, 2018; Lorenzo-Hernández *et al.*, 2019; Valdez-Arjona *et al.*,
243 2019). Muy pocos estudios se han realizado que evalúen las propiedades
244 bromatológicas de la semilla de *C. argyrosperma*, pero los que la han estudiado han
245 encontrado niveles altos de proteína y grasa cruda (Barragán Romero y Bautista Justo,
246 2014; Camargo Cortés y González, 2020; Chi Ucán, 2017; Ruiz García *et al.*, 2020). El
247 perfil de ácidos grasos de la semilla es similar al de otras cucúrbitas, con una alta
248 proporción de ácido linoleico y ácido oleico, así como una pequeña cantidad de ácido
249 araquidónico (Barragán Romero y Bautista Justo, 2014). También, la semilla de
250 calabaza chihua contiene proteína de alta calidad, con una alta proporción de
251 aminoácidos esenciales y buena digestibilidad *in vitro* (Chi-Ucán, 2017).

252 Estudios en otras especies de calabaza han revelado importantes propiedades
253 nutracéuticas y compuestos bioactivos presentes tanto en la semilla como en su aceite.
254 En el caso de la última, los aceites de semilla de calabaza son ricos en ácidos grasos
255 poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés), los cuales se asocian con beneficios a
256 la salud como reducción de los riesgos cardiovasculares y mejor disponibilidad dietética
257 de ácidos grasos esenciales (omega-3 y omega-6) (Maeda Rojas *et al.*, 2019). Las
258 semillas de calabaza también son ricas en vitamina E (α -tocoferol y γ -tocoferol) y en
259 fitoestrógenos, el consumo de los cuales está asociado con mejor salud reproductiva y
260 ósea para la mujer (Lestari y Meiyanto, 2018). El contenido de minerales de las
261 semillas de calabaza también es importante, ya que contiene altos niveles de algunos
262 minerales que son generalmente deficientes en la dieta, como el zinc, hierro y
263 manganeso (Lemus-Mondaca *et al.*, 2019).

264 ***4.2. Mohos patógenos y deterioradores de los alimentos***

265 Los mohos se distinguen de otros microorganismos deterioradores de alimentos, como
266 las bacterias y las levaduras, por su capacidad de utilizar una gran variedad de
267 sustratos como alimento para su desarrollo y además por su capacidad de tolerar
268 condiciones extremas de pH y concentración de solutos. La mayoría son capaces de
269 crecer a valores de pH de entre 3 y 8 y a actividades de agua de entre 0.7 y 0.8
270 (Rawat, 2015). Esta versatilidad les permite deteriorar alimentos como frutas, alimentos
271 de humedad intermedia, cereales, y alimentos fermentados (Dagnas y Membré, 2013).

272 El deterioro de alimentos por mohos es causa de pérdidas millonarias para la
273 industria agroalimentaria. Los mohos provocan desarrollo de aromas y sabores

274 desagradables, así como cambios indeseables de color y textura aún antes de
275 manifestarse de forma evidente en el alimento. Adicionalmente, algunas especies de
276 moho son capaces de producir compuestos nocivos para la salud del consumidor.

277 En el caso específico de nueces y semillas, los mohos deterioradores más comunes
278 son los del género *Aspergillus* y los del género *Penicillium* (Jansen, 1977; Northolt y
279 Bullerman, 1982). Estos géneros de mohos son capaces de producir una gran variedad
280 de compuestos tóxicos, como las aflatoxinas, la patulina, los oxalatos y la ocratoxina,
281 entre otras. Se cree que estas sustancias surgieron evolutivamente para proteger al
282 moho de depredadores y existe evidencia de que las mismas especies de moho
283 producen cocteles de toxinas diferentes dependiendo del sustrato en el que crecen,
284 esto no solo debido a los nutrientes disponibles, sino para adaptarse a los
285 depredadores más comunes que podrían enfrentar en ese entorno (Jansen, 1977).

286 En particular, las aflatoxinas son las sustancias más estudiadas en la categoría de
287 micotoxinas. Son producidas principalmente por dos especies de moho del género
288 *Aspergillus*: *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Pitt y Hocking, 2009). Existen al
289 menos 18 sustancias que han sido clasificadas como aflatoxinas, de las cuales seis (las
290 aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂) han sido objeto del mayor enfoque por parte de las
291 investigaciones en la materia (Asemoloye et al., 2017). De mayor interés es la
292 aflatoxina B₁, la cual ha sido clasificada por la Agencia Internacional para la
293 Investigación sobre el Cáncer como un carcinógeno para los humanos, actuando sobre
294 el hígado (AIIC, 1993). La aflatoxina B₁ es capaz de causar efectos nocivos en la salud
295 de las personas incluso a muy bajas concentraciones y su consumo crónico tiene
296 efectos secundarios que incluyen cirrosis y cáncer de hígado, deficiencias

297 inmunológicas y deficiencias en la absorción de proteínas (Kwashiorkor). La ingesta de
298 aflatoxina aumenta la probabilidad de que una persona que sufra de hepatitis B
299 desarrolle cáncer de hígado de alrededor del 5% a alrededor del 60%. En general, se
300 ha encontrado que un consumo diario promedio de aflatoxinas de entre 5 y 9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de
301 peso corporal/día tiene un 50% de probabilidad de aumentar la incidencia de cáncer de
302 hígado en una población en un factor de 1 caso por cada 10000 habitantes (Pitt y
303 Hocking, 2009).

304 **4.2.1. Cambios morfológicos y bioquímicos de los mohos en función del medio de** 305 **crecimiento**

306 Las condiciones del medio en el que se desarrollan los mohos tienen un efecto sobre
307 su morfología y producción de metabolitos secundarios. Las condiciones de estrés en
308 el medio, como valores extremos de pH, temperaturas adversas, alta presión osmótica
309 o presencia de sustancias fungicidas o fungistáticas tienen la capacidad de inhibir la
310 producción de toxinas fúngicas, aun cuando no son suficientes para evitar el
311 crecimiento y reproducción del moho (Norholt y Bullerman, 1982). Meletiadis, Meis,
312 Mouton y Verweij (2001) evaluaron características de crecimiento de tres especies de
313 moho filamentoso (*Rhizopus microsporus*, *Aspergillus fumigatus* y *Scedosporium*
314 *prolificans*) en diferentes medios de cultivo y encontraron que, dependiendo de las
315 características del medio, los mohos presentaban diferencias en su velocidad de
316 crecimiento, porcentaje de germinación, longitud de las hifas, duración de la fase *lag* y
317 tiempo antes de la germinación de las esporas. Gómez-Lopez y colaboradores (2005)
318 demostraron que la adición de un surfactante al medio de cultivo tiene un efecto

319 significativo sobre las concentraciones mínimas inhibitorias de algunos agentes
320 antifúngicos en especies de *Aspergillus*. Sharma y Pandey (2010) encontraron
321 diferencias en la morfología de varias especies de mohos (color, forma y textura de las
322 colonias, así como el grado de esporulación) dependiendo de si fueron cultivadas en
323 agar papa-dextrosa (PDA), en agar Czapek Extracto de Levadura (CYA) o en agar
324 lignocelulosa (LCA).

325 Dado este precedente, es razonable asumir que las mismas especies de mohos
326 presentes en alimentos diferentes se comportarán de manera distinta. Es posible que
327 las diferentes características de los mohos cambien su susceptibilidad a un tratamiento
328 antifúngico, aun cuando se traten de métodos físicos como la irradiación. Se ha
329 encontrado, por ejemplo, que *Escherichia coli* es menos susceptible a tratamientos con
330 luz ultravioleta cuando se encuentra en un medio capaz de absorber dicha radiación
331 (Oteiza, Peltzer, Gannuzzi y Zaritzky, 2005).

332 **4.2.2. Contaminación por mohos toxígenos y toxinas fúngicas en nueces, leguminosas y** 333 **semillas**

334 En todo el mundo existen múltiples reportes de instancias de contaminación de
335 alimentos con mohos y sus toxinas, aunque este es un problema que parece afectar
336 principalmente a países en vías de desarrollo (Asemoloye *et al.*, 2017). Los vectores
337 más comunes para la transmisión de toxinas fúngicas son los granos de cereales, por
338 el volumen en el que se consumen a nivel mundial. Algunos casos de intoxicación por
339 aflatoxinas han resultado en la muerte de personas, como el caso de 2004 en Kenia
340 (Muture y Ogana, 2005), donde murieron 125 personas por el consumo de maíz

341 contaminado. En Venezuela, un estudio encontró un nivel promedio de 26.51 µg/kg de
342 aflatoxina B₁ en maíz proveniente del estado de Yaracuy (Barroyeta *et al.*, 2013).

343 Sin embargo, los granos de cereales no son los únicos alimentos susceptibles a la
344 contaminación con toxinas fúngicas; las nueces son también un vector común para la
345 transmisión de estas sustancias. En Irán, se encontró que un 36.7% de las muestras
346 evaluadas de pistaches contenían niveles detectables de aflatoxina B₁ y que un 5.9%
347 de las muestras contenían niveles de esta aflatoxina por encima de 20 µg/kg
348 (Cheraghali *et al.*, 2007).

349 Los cacahuates (*Arachis hypogaea*) se cultivan a nivel mundial, tanto por su semilla
350 comestible como por su aceite. Dado que el cacahuete es un fruto subterráneo, es
351 altamente susceptible a la contaminación con microorganismos. La micoflora de los
352 cacahuates principalmente consiste en mohos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*,
353 incluidas especies toxígenas como lo son *A. flavus*, y *A. parasiticus* (Khandaker *et al.*,
354 2019).

355 Las nueces son similares a los cacahuates en su composición, es decir, también
356 son alimentos con baja actividad de agua y alto contenido de lípidos. La contaminación
357 de las nueces con microorganismos principalmente se da debido al manejo inadecuado
358 posterior a la eliminación de la cáscara, ya que esta normalmente protege a la parte
359 comestible de la contaminación. Después de ser descascaradas, las nueces son
360 susceptibles a la descomposición por mohos solo cuando su actividad de agua
361 aumenta por encima del umbral de crecimiento de estos microorganismos.

362 Por otro lado, las semillas de calabaza se distinguen de otras semillas comestibles
363 por su relativamente alto contenido de humedad, lo cual las hace más susceptibles al

364 deterioro microbiano (Chayjan *et al.*, 2011). Existe poca información al respecto de la
365 micoflora de las semillas de calabaza.

366 **4.2.3. Estado de la contaminación por mohos toxígenos y toxinas fúngicas en alimentos** 367 **en México**

368 Al igual que en otros países en vías de desarrollo, México tiene una problemática con la
369 contaminación con aflatoxinas y otras toxinas fúngicas en diversos productos
370 alimenticios (García y Heredia, 2006). En nuestro país, el enfoque de la investigación
371 en la materia ha sido principalmente sobre el maíz, dada su importancia como la base
372 de la dieta del mexicano promedio, así como su importancia económica, social y
373 cultural. Las nueces que son objeto de este estudio, sin embargo, también son de gran
374 importancia para la sociedad y economía mexicanas. Esta importancia se puede ver en
375 las Figuras 1 a la 4, en las que se esquematiza la producción de cacahuate, calabaza
376 criolla, nuez de castilla y nuez pecana, respectivamente, en la República Mexicana. Es
377 evidente que la producción de estos alimentos, en particular del cacahuate y la nuez
378 pecana, es importante a nivel nacional. El cultivo de estos últimos dos productos
379 generó, tan solo en 2017, un valor de producción de \$1,228,881,750.00MXN y
380 \$11,265,041,870.00MXN respectivamente. Adicionalmente, el cultivo de estos
381 productos alimenticios es altamente rentable: el cacahuate, nuez de castilla y nuez
382 pecana se vendieron en 2017 a un precio promedio de \$12,354.88MXN,
383 \$28,203.62MXN y \$78,324.04MXN por tonelada, a comparación de los \$3,609.41MXN
384 por tonelada del maíz (SIAP, 2017).

385 En varios estudios a lo largo de los años se han encontrado serios problemas de
386 contaminación con aflatoxinas en maíz y en sus subproductos (Martínez Padrón,
387 Hernández Delgado, Reyes Méndez y Vazquez Carrillo, 2012), incluido un estudio en el
388 que se encontró un grado de contaminación del 87.8% en maíz en venta en la ciudad
389 de Monterrey, del cual el 58.5% contenía niveles por encima de 20 µg/kg (Torres
390 Espinoza, Acuña Askar, Naccha Torres, Montoya Olvera y Castrellón Santa Anna,
391 1996). Un estudio reciente encontró que el 80% de las tortillas de maíz estudiadas,
392 provenientes de comunidades rurales en el estado de San Luis Potosí, estaba
393 contaminado con aflatoxina B₁ y que el 18% de estas muestras excedían los 20 µg/kg
394 (Zuki-Orozco, Batres-Esquivel, Ortíz-Pérez, Juárez-Flores y Díaz-Barriga, 2018). Otro
395 estudio, llevado a cabo por Méndez-Albores y colaboradores (2004) encontró altos
396 niveles de contaminación con aflatoxina B₂ en pozol en venta en el estado de Chiapas.

397 Aunado a esto está el hecho de que en el país una gran parte de la venta de
398 alimentos se da a granel en los mercados, tianguis y centrales de abastos regionales,
399 los cuales se encuentran generalmente en un vacío regulatorio y científico. La práctica
400 de la agricultura de subsistencia (es decir, para consumo familiar y venta a pequeña
401 escala) también es extensamente practicada.

402 La suma de las investigaciones en esta materia ha llevado a los expertos a
403 concluir que el mayor desarrollo de aflatoxinas en maíz se da durante el
404 almacenamiento y debido a malas condiciones de este, y no en el campo previo a la
405 cosecha (Bucio-Villalobos, Guzmán-de-Peña y Peña-Cabriales, 2001; Martínez-Flores,
406 García-Aguirre y Melgarejo-Hernández, 2002), aunque también las condiciones de
407 siembra, crecimiento y cosecha del maíz tienen un efecto importante sobre el contenido

408 de aflatoxinas en este. En un estudio realizado por Martínez-Flores y colaboradores
409 (2002) se encontró que factores de estrés en el medio ambiente, como condiciones de
410 sequía y temperaturas altas, que provocan daños a las cosechas de maíz, pueden
411 incrementar la incidencia de aflatoxinas en el grano cosechado. En ese mismo estudio
412 se encontró también que no solo el maíz blanco nacional estaba contaminado con
413 aflatoxinas, sino también el maíz amarillo importado, del cual se encontró que un 98%
414 del volumen estudiado se encontraba contaminado.

415 Además de las toxinas producidas por los mohos del género *Aspergillus*,
416 también se han reportado múltiples casos de contaminación con las toxinas producidas
417 por el género *Fusarium*, el cual es una especie que comúnmente infecta el maíz y
418 cuyas toxinas (denominadas “fumonisinas”) también tienen efectos carcinogénicos en
419 humanos y pueden producir efectos nocivos en el feto durante la gestación (García y
420 Heredia, 2006). En un estudio realizado por García-Aguirre y Martínez-Flores (2010) se
421 encontró contaminación por diversas especies de *Fusarium* en maíz de la región de
422 Ciudad Serdán, en el estado de Puebla. De las especies de *Fusarium* aisladas en este
423 estudio, *F. moniliforme* y *F. verticilloides* son capaces de producir fumonisinas y fueron
424 aislados de todas las muestras de maíz blanco recolectadas.

425 Aunque estos estudios se han realizado principalmente sobre el maíz, es posible
426 extrapolarlos a otros alimentos secos en venta a granel en el territorio nacional ya que
427 la regulación del maíz es generalmente más estricta que la de otros alimentos y existe
428 una mayor cantidad de información respecto a él, dada su importancia, y aun así sus
429 niveles de contaminación son alarmantes (Guzmán de Peña y Peña-Cabrales, 2005).
430 Adicionalmente, existen algunos indicios de que el problema con la contaminación por

431 toxinas fúngicas va más allá del maíz. Adaya-González y colaboradores (2015)
432 encontraron que el 100% de las muestras de nuez de castilla, nuez pecana y anacardo
433 recolectadas en la ciudad de México presentaban contaminación con algún tipo de
434 aflatoxina, aunque se encontró que ninguna se encontraba por encima de lo permitido
435 por la norma mexicana correspondiente (NOM-247-SSA1-2008) de 20 µg/kg. Sin
436 embargo, no se especificó en este estudio si las muestras de nueces fueron obtenidas
437 sin cáscara o fueron descascaradas para el estudio. También es importante destacar
438 que algunos expertos en la materia consideran que un límite de 20 µg/kg de aflatoxinas
439 no es suficiente para prevenir riesgos a la salud de la población (Adaya-González *et al.*,
440 2015; Martínez-Flores *et al.*, 2002). Las muestras de nuez de castilla obtenidas en las
441 delegaciones Iztacalco y Xochimilco y las muestras de anacardo obtenidas en las
442 delegaciones Milpa Alta y Gustavo A. Madero presentaron niveles de aflatoxinas totales
443 por encima del límite establecido por la Unión Europea de 4 µg/kg (EFSA CONTAM
444 Panel *et al.*, 2018).

445 En México, el cáncer de hígado es el cuarto más incidente en hombres y el
446 tercero en mujeres y las principales causas de cáncer de hígado son complicaciones de
447 la cirrosis y la hepatitis C. En años recientes (a partir de 1999) se ha observado un
448 aumento importante en la incidencia de cáncer de hígado, tanto a nivel nacional como a
449 nivel global. Esto se debe más a una mejora en la clasificación y diagnóstico de los
450 cánceres hepáticos que a un aumento real en la incidencia de esta enfermedad. A
451 pesar de esto, no se puede descartar la importancia de esta enfermedad cuando la
452 mortalidad por cáncer de hígado a nivel nacional fue de aproximadamente 13000
453 muertes al año entre 2005 y 2009 (Torres-Sanchez, Rojas-Martínez, Escamilla-Nuñez,

454 de la Vara-Salazar y Lazcano-Ponce, 2014). En estas cifras no se cita al consumo de
455 aflatoxinas como una potencial causa de cáncer de hígado, sin embargo, como se
456 mencionó anteriormente, el consumo continuo de aflatoxinas en los alimentos actúa
457 como agravante de la cirrosis y la hepatitis, haciendo más probable que estas
458 condiciones se desarrollen hasta provocar cáncer.

459 *4.3. Tratamientos por irradiación con luz UV como una alternativa para la desinfección* 460 *de alimentos*

461 La desinfección de alimentos por medio de luz ultravioleta (UV) es una técnica
462 emergente que ha presentado grandes avances en tiempos recientes. La luz
463 ultravioleta comprende radiación electromagnética fuera del espectro visible que se
464 encuentra en el rango de 100 a 400 nm de longitud de onda. Dentro del espectro de la
465 luz UV, es la luz UV de onda corta (UV-C) la que se sabe que tiene efectos letales
466 sobre los microorganismos (Orlowska et al., 2012). Este rango de radiación
467 electromagnética comprende las longitudes de onda entre 200 y 280 nm. Los
468 tratamientos con luz UV tienen varias ventajas por sobre otros tratamientos de uso
469 convencional: a diferencia de los tratamientos térmicos, los tratamientos con luz UV
470 difícilmente provocan cambios negativos en las cualidades organolépticas, nutricionales
471 y fisicoquímicas de los alimentos (Elmnasser *et al.*, 2008). También tienen cierta
472 ventaja sobre los tratamientos con desinfectantes, los cuales pueden dejar residuos en
473 la superficie de los alimentos que podrían ser nocivos para la salud (Agüero *et al.*,
474 2016; Martín-Diana *et al.*, 2008, Nieuwenhuijsen *et al.*, 2000; Ölmez y Kertzchmar
475 2009; Rico *et al.*, 2007). Utilizando tratamientos de luz UV se han logrado

476 inactivaciones de 5 ciclos logarítmicos en contra de diversos microorganismos como lo
477 son *Escherichia coli* (Keyser *et al.*, 2008; Franz *et al.*, 2009; Char *et al.*, 2010; Caminiti
478 *et al.*, 2012), *Salmonella* Typhimurium (Mansor *et al.*, 2014), y *Alicyclobacillus*
479 *acidoterrestris* (Baysal *et al.*, 2013), aunque la mayoría de estos estudios se han hecho
480 solo sobre sustratos líquidos. Los tratamientos en sustratos líquidos tienen la ventaja
481 de que se puede realizar el tratamiento dentro de un reactor, lo cual permite una
482 distribución homogénea de la energía luminosa y, por lo tanto, una desinfección más
483 homogénea del alimento.

484 Existe bastante evidencia de que los tratamientos con radiación son capaces de
485 evitar el crecimiento de microorganismos en los alimentos. Se han desarrollado
486 tratamientos con luz ultravioleta, microondas y radiación-γ que han probado ser
487 efectivos en el control de microorganismos (Kim, Kim y Kang, 2016; Kanapitsas *et al.*,
488 2015; Sommers, Cooke y Sites, 2009). También existen algunas evidencias de que
489 tratamientos con radiación son capaces de reducir la carga de aflatoxinas en los
490 alimentos que fueron contaminados con mohos que las producen (Jubeen *et al.*, 2012).

491 La mayoría de los estudios con radiación para la desinfección de alimentos se han
492 realizado sobre bacterias, como *E. coli* (Sharma y Demirci, 2003), pero también existe
493 evidencia de que los tratamientos son efectivos para lidiar con mohos y levaduras
494 (Kanapitsas *et al.*, 2015).

495 El mayor campo de aplicación para la desinfección de alimentos con radiación
496 actualmente es sobre alimentos líquidos como jugos y lácteos y sobre alimentos secos
497 de bajo volumen, como las especias, debido principalmente a que su efectividad se
498 considera limitada sobre alimentos que son opacos y de grosor considerable (Li y Farid,

499 2016). Se han investigado aplicaciones sobre alimentos sólidos de mayor volumen,
500 pero su aplicación industrial en este ramo sigue en las etapas iniciales (Roberts, 2014).
501 A pesar de esto, muchos expertos en el área de procesado de alimentos consideran
502 tanto la radiación ultravioleta, como la radiación ionizante como dos de los prospectos
503 más atractivos dentro de las tecnologías emergentes para el procesado de alimentos,
504 por encima de otras tecnologías como los tratamientos con ozono y ultrasonido
505 (Jermann, Koutchma, Margas, Leadey y Ros-Polsqui, 2015). El principal obstáculo de
506 la aplicación de estas tecnologías pareciera ser uno de percepción, ya que la industria
507 de alimentos teme una respuesta negativa por parte de los consumidores ante estas
508 tecnologías, aunque pareciera que estos temores son infundados (Roberts, 2014).

509 En México en particular existe un gran potencial para la expansión del mercado de
510 alimentos tratados con radiación: México es el principal exportador de alimentos
511 irradiados hacia Estados Unidos, los cuales consisten principalmente de frutas como
512 guayabas, limones y mangos (Eustice, 2017).

513 **4.3.1. Irradiación como método de conservación: aplicaciones en alimentos sólidos**

514 Existe una gran variedad de factores que pueden afectar la efectividad de un
515 tratamiento con fuentes de radiación. La distancia de la fuente de luz al objeto, la
516 intensidad luminosa y las características de la superficie a desinfectar son algunas de
517 las más importantes (Gómez-Lopez, Devlieghere, Bonduelle y Devebere, 2005).

518 Varios autores han estudiado las aplicaciones de los tratamientos con radiación
519 sobre alimentos sólidos. En la tabla 1 se puede ver un resumen de algunas
520 investigaciones con diferentes tratamientos con radiación sobre diferentes alimentos

521 sólidos, donde se ve que ha habido estudios tanto en alimentos con baja humedad
522 (semilla de alfalfa, nueces), humedad intermedia (pasas) y humedad alta (queso en
523 rebanadas, salchichas).

524 Dependiendo de las dosis y de las características del alimento, algunos de los
525 estudios han logrado una desinfección muy efectiva de los alimentos. Por ejemplo, Kim
526 y colaboradores (2016), lograron hasta 6 reducciones logarítmicas de *E. coli*, y *S.*
527 *typhimurium* en queso, lo cual es comparable a haber realizado un proceso de
528 pasteurización.

529

530 Por otro lado, Jubeen y colaboradores (2012) encontraron que los tratamientos con
531 UV-C son capaces de reducir tanto la población microbiana en nueces y cacahuates,
532 como de destruir de manera significativa los metabolitos tóxicos producidos por mohos.
533 Hussein y colaboradores (2015) encontraron que los tratamientos con luz ultravioleta
534 son efectivos para limitar el crecimiento de *Aspergillus flavus*. Estos resultados apuntan
535 a que los tratamientos por irradiación son también efectivos para la desinfección de
536 alimentos sólidos de baja humedad, como lo son las nueces, las semillas y los
537 cacahuates.

538 **4.3.2. Tratamientos con luz ultravioleta de onda corta (UV-C)**

539 De las tecnologías para la desinfección de alimentos por medio de irradiación, la luz
540 ultravioleta probablemente es la más estudiada y la que actualmente tiene mayores
541 aplicaciones industriales. Sin embargo, las lámparas ultravioleta convencionales tienen
542 varias limitaciones que dificultan su uso en la industria de alimentos (Kim *et al.*, 2016).

543 Las limitaciones derivan del poder de penetración de la luz UV-C, por lo que los
544 líquidos transparentes son generalmente más susceptibles a ser tratados con esta
545 tecnología. En años recientes ha habido avances tecnológicos significativos que
546 podrían mejorar los tratamientos con luz ultravioleta, haciéndolos más efectivos y
547 menos costosos. Uno de los avances más recientes y más importantes ha sido el
548 desarrollo de los diodos emisores de luz (o LED, por sus siglas en inglés). Estos
549 aparatos han permitido la miniaturización de los sistemas emisores de luz ultravioleta,
550 así como incrementado su eficiencia energética (D'Souza, Yuk, Khoo y Zhou, 2015).

551 Kim y colaboradores (2016) desarrollaron un tratamiento altamente efectivo a base
552 de LED de luz ultravioleta de onda corta para pasteurizar queso en rebanadas (tabla 1),
553 mientras que Shin y colaboradores (2016) encontraron resultados similares al aplicar
554 tratamientos con LED UV-C sobre cultivos bacterianos. Anteriormente, ya varios
555 autores han reportado la efectividad de tratamientos con fuentes convencionales de luz
556 UV-C. Por ejemplo, Sommers y colaboradores (2009) lograron la inactivación de *L.*
557 *monocytogenes* sobre salchichas Frankfurt. También, Jubeen y colaboradores (2012)
558 lograron la disminución de la carga microbiana en algunas nueces y cacahuates.

559 Los efectos antimicrobianos de la luz ultravioleta de onda corta se basan
560 principalmente en su capacidad de dañar directamente el ADN de las células, así como
561 otras estructuras como las mitocondrias, cloroplastos, membranas y proteínas (Urban,
562 Charles, Alcântara de Miranda y Aarouf, 2016). Además de estos efectos, la luz UV-C
563 tiene efectos indirectos sobre la célula, como la producción de especies reactivas de
564 oxígeno y el daño a ácidos grasos, los cuales también contribuyen a los efectos
565 antimicrobianos de la luz UV-C.

566 4.3.3. Tratamientos con pulsos de luz de alta intensidad (PLAI)

567 Los pulsos de luz de alta intensidad (PLAI) son una tecnología emergente que utiliza
568 destellos de luz blanca de amplio espectro, de corta duración, para eliminar
569 microorganismos de los objetos (Gómez-Lopez *et al.*, 2005). En principio, los
570 tratamientos con PLAI funcionan de manera similar a los tratamientos con luz UV-C
571 continua, ya que ambos hacen uso de la luz UV-C para la inactivación de
572 microorganismos. Sin embargo, los tratamientos con PLAI utilizan capacitores para
573 almacenar energía y después liberarla en ráfagas de luz de alta potencia. Las ventajas
574 de los tratamientos con PLAI sobre los tratamientos con luz UV continua son menores
575 tiempos de proceso, menor tiempo de exposición a luz ultravioleta y la exclusión de
576 lámparas de mercurio, las cuales pueden tener consecuencias negativas en el medio
577 ambiente (Heinrich *et al.*, 2016). Sin embargo, los tratamientos con PLAI también tienen
578 ciertas desventajas, en particular relacionadas con las altas dosis de energía luminosa
579 que reciben los alimentos. Estas altas dosis provocan aumentos de temperatura en los
580 alimentos, lo cual puede provocar daños a compuestos termosensibles. El potencial
581 oxidativo de la luz UV se ve incrementado en los tratamientos con PLAI, debido a la
582 generación de especies reactivas de oxígeno como el ozono, lo cual puede llevar a la
583 degradación de lípidos, pigmentos y antioxidantes. Finalmente, los tratamientos con
584 PLAI pierden efectividad cuando se utilizan en alimentos con superficies irregulares
585 (Franco-Vega *et al.*, 2021).

586 Varios estudios han demostrado la efectividad de los tratamientos con PLAI para la
587 desinfección de alimentos. Por ejemplo, Hwang y colaboradores (2018) demostraron su
588 efectividad sobre semillas de casia y mijo glutinoso. En un estudio anterior, Marquenie

589 y colaboradores (2003) lograron de 3 a 4 disminuciones logarítmicas en *Botrytis cinerea*
590 y *Monilia fructigena*, los cuales son mohos patógenos de las cosechas. En otro estudio,
591 Sharma y Demirci (2003) lograron la inactivación de *E. coli* O157:H7 por medio de
592 pulsos de luz ultravioleta. En general, las bacterias parecen ser más sensibles a los
593 tratamientos con PLAI que los mohos y las levaduras, y las esporas fúngicas, al igual
594 que las bacterianas, presentan cierta resistencia a estos tratamientos (Gómez-López *et*
595 *al.*, 2005), aunque aparentemente son más vulnerables a los tratamientos con PLAI que
596 a los tratamientos con UV-C (Li y Farid, 2016).

597 **4.3.3.1. Factores que afectan la efectividad de los tratamientos con PLAI**

598 La efectividad de los tratamientos con PLAI está dada por varios factores, relacionados
599 tanto con las características del alimento, como de los microorganismos y del sistema
600 de tratamiento. Dado que las características del sistema pueden ser adecuadas por el
601 usuario para una aplicación en particular, las principales limitaciones de la técnica
602 están relacionadas con las características del alimento y de los microorganismos
603 presentes en este.

604 **4.3.3.2. Resistencia microbiana a los tratamientos con PLAI**

605 Diferentes microorganismos tienen diferentes niveles de susceptibilidad a los pulsos de
606 luz de alta intensidad. A través de diferentes estudios se ha llegado a la conclusión de
607 que el orden de susceptibilidad de los microorganismos a los PLAI, de los más
608 susceptibles a los menos susceptibles es: virus, bacterias Gramnegativas, bacterias
609 Grampositivas, levaduras, mohos filamentosos, esporas de bacterias y esporas de

610 mohos. Sin embargo, en la práctica es complicado verificar esta conclusión, ya que los
 611 resultados de pruebas con PLAI son inconsistentes (Tabla 1).

612 **Tabla 1.** Estudios sobre la efectividad de tratamientos con PLAI en diferentes
 613 microorganismos.

Microorganismo	Contenido inicial (log UFC/g o log UFC/mL)	Alimento	Dosis (J/cm ²)	Inactivación máxima	Referencia
Bacterias					
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> ATCC 49025T	5 a 6	Jarabe de sacarosa (65 y 67° Bx)	1.86	3	Chaine <i>et al.</i> , 2012
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 402	5 a 6	Jarabe de sacarosa (65 y 67° Bx)	1.86	>4	Chaine <i>et al.</i> , 2012
<i>Escherichia coli</i> LRF 1.107	7	Espinaca (<i>Spinacia oleracea</i> L. cv. Polka)	12	2.3	Agüero <i>et al.</i> , 2016
<i>E. coli</i> LRF 1.107	6	Jitomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill cv. Daniela)	8	>1	Valdivia-Nájar <i>et al.</i> , 2017

<i>E. coli</i> LRF 1.107	8	Aguacate (<i>Presea americana</i> Mill var. Hass)	12	3.33	Ramos- Villarroel, Martín- Belloso, & Soliva- Fortuny, 2011
<i>E. coli</i> ATCC 25922	5 a 7	Queso Cheddar	12.29	>3	Proulx <i>et al.</i> , 2015
<i>E. coli</i> ATCC 25922	5 a 7	Queso procesado	12.29	5.41	Proulx <i>et al.</i> , 2015
<i>E. coli</i> ATCC 25922	7	Leche descremada en polvo reconstituida (9.8% sólidos totales)	8.41	2.05	Miller, Sauer, & Moraru, 2012
<i>E. coli</i> ATCC 25922	7	Leche descremada en polvo reconstituida (25% sólidos totales)	8.41	0.62	Miller, Sauer, & Moraru, 2012

<i>E. coli</i> ATCC 25922	7	Leche descremada en polvo reconstituida (45% sólidos totales)	8.41	0.45	Miller, Sauer, & Moraru, 2012
<i>E. coli</i> ATCC 25922	7	Leche descremada comercial	14.85	3.36	Miller, Sauer, & Moraru, 2012
<i>E. coli</i> ATCC 25922	7	Leche comercial con 2% de grasa	14.85	2.89	Miller, Sauer, & Moraru, 2012
<i>E. coli</i> ATCC 25922	7	Leche entera comercial (3.25% de grasa)	14.85	2.94	Miller, Sauer, & Moraru, 2012
<i>E. coli</i> ATCC 11229	6 a 7.5	Rebanadas de manzana <i>(Malus pumila</i> var. Granny Smith)	221.1	2.25	Gómez <i>et</i> <i>al.</i> , 2012b

<i>E. coli</i> DH5α	7	Leche de cabra	10	6	Kasahara, Carrasco, & Aguilar, 2015
<i>E. coli</i> O157:H7 CECT 4972	3 log CFU/cm ²	Carpacho de res	11.9	1.2	Hierro <i>et al.</i> , 2012
<i>E. coli</i> O157:H7 251	8	Fresas	5.9	1.5	Huang <i>et al.</i> , 2017
<i>E. coli</i> O157:H7 251	8	Moras azules	5.9	5.4	Huang <i>et al.</i> , 2017
<i>E. coli</i> O157:H7 CFS 932, CFS 994, CFS E0018, CFS H1730 y CFS F4546	4 a 5	Semillas de alfalfa	504	4.80	Sharma & Demirci, 2003
<i>E. coli</i> K12 MDD 333	8	Huevos cocidos	19.4	^a 4.78	Macias- Rodriguez <i>et al.</i> , 2014
<i>Geobacillus</i> <i>stearothermophilus</i> CIP 6623 ^o	5 a 6	Jarabe de sacarosa (65 y 67° Bx)	1.86	>4	Chaine <i>et al.</i> , 2012

<i>Listeria innocua</i> LRF 1.117	7	Espinaca (<i>Spinacia</i> <i>oleracea</i> L. cv. Polka)	12	2.6	Agüero <i>et al.</i> , 2016
<i>L. innocua</i> NTC 11288	4 a 5 log CFU/cm ²	Queso Gouda	0.9	3	Fernández <i>et al.</i> , 2016
<i>L. innocua</i> NTC 11288	4 a 5 log CFU/cm ²	Queso Manchego	0.9	<1	Fernández <i>et al.</i> , 2016
<i>L. innocua</i> CECT 4030	4 a 5 log CFU/cm ²	Queso Gouda	0.9	3	Fernández <i>et al.</i> , 2016
<i>L. innocua</i> CECT 4030	4 a 5 log CFU/cm ²	Queso Manchego	0.9	<1	Fernández <i>et al.</i> , 2016
<i>L. innocua</i> CLIP 11262	6	Jitomate (<i>Lycopersicon</i> <i>esculentum</i> Mill cv. Daniela)	8	<1	Valdivia- Nájar <i>et al.</i> , 2017
<i>L. innocua</i> FSL C2- 008	5 a 7	Queso Cheddar	12	3.37	Proulx <i>et al.</i> , 2015
<i>L. innocua</i> FSL C2- 008	5 a 7	Queso procesado	12	>3	Proulx <i>et al.</i> , 2015

<i>L. innocua</i> ATCC 33090	6 a 7.5	Rebanadas de manzana (<i>Malus pumila</i> var. Granny Smith)	119.4	1.7	Gómez <i>et al.</i> , 2012b
<i>L. innocua</i> LRF 1.17	8	Aguacate (<i>Presea americana</i> Mill var. Hass)	12	2.97	Ramos-Villarroel, Martín-Beloso, & Soliva-Fortuny, 2011
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 43256	8	Queso procesado	152	3.08	Can <i>et al.</i> , 2014
<i>L. monocytogenes</i> KCCM 40307	4	Filetes de lenguado (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	12.1	1.9	Cheigh, Hwang, & Chung, 2013
<i>L. monocytogenes</i> KCCM 40307	4	Filetes de salmón (<i>Salmo salar</i>)	12.1	2.1	Cheigh, Hwang, & Chung, 2013

<i>L. monocytogenes</i> KCCM 40307	4	Filetes de camarón (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	12.1	2.4	Cheigh, Hwang, & Chung, 2013
<i>L. monocytogenes</i> CECT 4032, CECT 7467 y Scott A	4 a 5 UFC/cm ²	Salchichón	11.9	1.81	Ganan <i>et al.</i> , 2013
<i>L. monocytogenes</i> CECT 4032, CECT 7467 y Scott A	4 a 5 UFC/cm ²	Lomo curado	11.9	1.48	Ganan <i>et al.</i> , 2013
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	7 UFC/cm ²	Jamón cocido	8.4	1.78	Hierro <i>et al.</i> , 2011
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	7 UFC/cm ²	Boloña	8.4	1.11	Hierro <i>et al.</i> , 2011
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	3 UFC/cm ²	Carpacho de atún	11.9	0.7	Hierro <i>et al.</i> , 2012
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	3 UFC/cm ²	Carpacho de res	11.9	0.8	Hierro <i>et al.</i> , 2012
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 1150	5 a 7	Queso cheddar	12.29	3.74	Proulx <i>et al.</i> , 2015
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 1150	5 a 7	Queso procesado	12.29	>3	Proulx <i>et al.</i> , 2015

<i>Salmonella enterica</i> serotipo <i>Typhimurium</i> CECT 7159 y CECT 4371	4 a 5 UFC/ cm ²	Salchichón	11.9	1.48	Ganan <i>et al.</i> , 2013
<i>Salmonella</i> spp.	4 a 5 UFC/cm ²	Lomo curado	11.9	1.73	Ganan <i>et al.</i> , 2013
<i>Salmonella</i> spp. CECT 443	3 UFC/cm ²	Carpacho de res	11.9	1	Hierro <i>et al.</i> , 2012
<i>S. enterica</i> serotipo <i>Enteritidis</i> ATCC 13076	4.5 UFC/unidad	Huevos sin lavar	12	2.49	Hierro <i>et al.</i> , 2009
<i>S. enterica</i> serotipo <i>Enteritidis</i> ATCC 13076	6 UFC/unidad	Huevos lavados	12	1.85	Hierro <i>et al.</i> , 2009
<i>S. enterica</i> serotipo <i>Newport</i> H1275	8	Fresas	5.9	2.1	Huang <i>et al.</i> , 2017
<i>S. enterica</i> serotipo <i>Newport</i> H1275	8	Moras azules	22.5	4.2	Huang <i>et al.</i> , 2017
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> DSMZ	5 a 6	Tallarines de huevo	0.7	2.5	Manzocco <i>et al.</i> , 2004

<i>Vibrio parahaemolyticus</i> CECT 511T	3 UFC/cm ²	Carpacho de atún	11.9	0.8	Hierro <i>et al.</i> , 2012
<hr/>					
Levaduras					
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5	Epidermis de jitomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> L. var. Climberly)	4	0.9	Aguiló-Aguayo <i>et al.</i> , 2013
<i>S. cerevisiae</i> CBS 1171	7.0	Harina de trigo	31.12	<0.1	Fine & Gervais, 2004
<i>S. cerevisiae</i> CBS 1171	6.6	Pimienta negra en polvo	31.12	0.3	Fine & Gervais, 2004
<i>S. cerevisiae</i> KE 162	6 a 7.5	Rebanadas de manzana (<i>Malus pumila</i> var. Granny Smith)	221.1	>7.5	Gómez <i>et al.</i> , 2012b
<hr/>					
Mohos filamentosos					
<i>Aspergillus niger</i> IMI 11414	9	Agar extracto de malta	-	3 to 4.5	Anderson <i>et al.</i> , 2000

<i>A. niger</i> ATCC 9642	4	Jarabe de sacarosa (65 y 67° Bx)	1.2	1.3	Chaine <i>et al.</i> , 2012
<i>A. niger</i> FRC A-409	5	Harina de maíz	-	4	Jun <i>et al.</i> , 2003
<i>A. niger</i> DSM 1988	6 a 7	Agar extracto de malta	1.25	<1	Levy <i>et al.</i> , 2012
<i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110	7	Queso procesado	152	1.32	Can <i>et al.</i> , 2014
<hr/> Virus <hr/>					
Norovirus murino (MNV-1) línea celular de macrófago murino RAW 264.7	8.7 log UFP/mL	Fresa	22.5	0.9 log UFP/mL	Huang <i>et al.</i> , 2017
Norovirus murino (MNV-1) línea celular de macrófago murino RAW 264.7	8.7 log UFP/mL	Mora azul	22.5	3.8 log UFP/mL	Huang <i>et al.</i> , 2017
Microflora nativa					

Microflora nativa	4 a 5	Semillas de ajonjolí (<i>Sesamum indicum</i> L.)	37.85	0.99	Hwang, Cheigh, & Chung, 2017
Bacterias nativas	-	Mijo glutinoso	54.43	0.66	Hwang, Cheigh, & Chung, 2018
Bacterias nativas	-	Semillas de casia (<i>Cinnamomum cassia</i>)	54.43	0.74	Hwang, Cheigh, & Chung, 2018
Bacterias nativas	-	Jitomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> L. var. Climberly)	4	0.9	Aguiló- Aguayo <i>et al.</i> , 2013
Bacterias nativas	89 CFU/mL	Manzana (<i>Malus pumila</i> var. Granny Smith)	71.6	0.8	Gomez <i>et al.</i> , 2012
Mohos nativos	-	Fresa (<i>Fragaria x Ananassa</i>)	47.8	Reducción del 42% en el crecimiento de	Duarte- Molina <i>et al.</i> , 2016

		Duch cv. Camarosa)		mohos superficiales después del almacenamiento	
Mohos nativos	147 CFU/mL	Manzana (<i>Malus pumila</i> var. Granny Smith)	71.6	1	Gomez <i>et al.</i> , 2012
Mohos y levaduras nativos	5.34	<i>Triticum</i> <i>aestivum</i> L. var. Dropla	51.2	3.81	Aron Maftei <i>et al.</i> , 2014
Mohos y levaduras nativos	5.34	<i>Triticum</i> <i>aestivum</i> L. var. Vulgare	51.2	3.81	Aron Maftei <i>et al.</i> , 2014

614

615 **4.3.4. Efectos de la irradiación con UV-C y PLAI sobre microorganismos**

616 Los mecanismos de acción de la luz UV-C y los PLAI son similares, ya que estos
617 últimos cuentan con un componente importante de luz UV-C como uno de los
618 principales factores que afectan su efectividad para la inactivación de microorganismos
619 (Gómez-Lopez *et al.*, 2005; Kramer y Muranyi, 2017). La inactivación a través de luz
620 UV-C se da principalmente por daño al ADN de los microorganismos al provocar el
621 entrecruzamiento de bases de pirimidina adyacentes (García-Carrillo *et al.*, 2017). Los
622 diferentes microorganismos presentan diferentes niveles de resistencia a los

623 tratamientos con luz UV-C, e incluso dentro de una misma especie, diferentes cepas
624 pueden presentar niveles diversos de susceptibilidad.

625 Los tratamientos antimicrobianos se pueden clasificar de acuerdo con la forma en la
626 que producen lesiones subletales en los microorganismos. Wuytack y colaboradores
627 (2003) proponen la siguiente clasificación:

- 628 1. El tratamiento daña una única estructura vital del microorganismo sin la que éste
629 no puede subsistir. En estos casos, si el tratamiento no es suficiente para matar
630 al microorganismo, éste tampoco presentará lesiones subletales, por lo que los
631 autores los denominan tratamientos de “todo o nada”. Como ejemplos de esta
632 clase de tratamientos, los autores proponen los tratamientos con campos
633 eléctricos pulsados y los tratamientos por homogeneización a alta presión.
- 634 2. El tratamiento daña una estructura vital del microorganismo, pero éste cuenta
635 con copias redundantes de dicha estructura. En estos casos, el microorganismo
636 solo morirá si se logran destruir todas las copias de esta estructura mediante el
637 tratamiento, de lo contrario presentará una lesión subletal.
- 638 3. El tratamiento daña múltiples estructuras vitales del microorganismo, algunas
639 redundantes y otras únicas. En estos casos, el microorganismo morirá si se
640 logra destruir la estructura única o todas las copias de la estructura redundante.
641 La mayoría de los tratamientos antimicrobianos convencionales, como el
642 tratamiento térmico y el tratamiento por alta presión, caen dentro de esta
643 categoría.

644 Con base en estas clasificaciones, los tratamientos con PLAI deberían clasificarse
645 en la tercera categoría. En esto concuerdan otros estudios en los que se han evaluado
646 los efectos de los PLAI sobre los microorganismos

647 La luz ultravioleta actúa principalmente provocando daños al ADN de los
648 microorganismos, inhibiendo así su crecimiento y causando también su muerte, pero
649 también afecta los lípidos de membrana, las proteínas y las enzimas (Li y Farid, 2016;
650 Urban *et al.*, 2016). Adicionalmente, la luz ultravioleta produce especies reactivas de
651 oxígeno, las cuales dañan tanto el ADN como las proteínas de los microorganismos (Li
652 y Farid, 2016). De acuerdo con esta información, los tratamientos con luz UV caerían
653 también en la tercera categoría.

654 Cuando no es suficiente para causar la muerte de los microorganismos, la radiación
655 provoca lesiones subletales en la célula. La naturaleza de estas lesiones no ha sido tan
656 estudiada como las lesiones letales, pero se cree que se concentra también en el ADN
657 de la célula (Li y Farid, 2016; Mañas y Pagán, 2005). Las lesiones subletales son
658 particularmente aparentes en las esporas microbianas, las cuales son resistentes a los
659 tratamientos con radiación, pero pueden volverse sensibles a otros tratamientos (como
660 tratamientos térmicos) o a factores ambientales de estrés tras una exposición a niveles
661 subletales de radiación (Li y Farid, 2016; Mañas y Pagán, 2005)

662 Los PLAI, además de causar los daños asociados con la exposición a la radiación,
663 provocan daños adicionales debido a efectos fototérmicos dentro de la célula. Estos
664 efectos dañan las estructuras celulares directamente y no se han observado en
665 microorganismos tratados con luz ultravioleta continua (Kramer y Muranyi, 2017; Li y
666 Farid, 2016).

667 De particular interés para la eliminación de mohos es que la irradiación de los
668 alimentos es capaz de degradar las micotoxinas (Karlovsky *et al.*, 2016). Se ha
669 observado que la radiación ultravioleta es altamente efectiva para eliminar aflatoxinas,
670 ya que estas son capaces de absorber radiación en este espectro (Diao *et al.*, 2015).
671 Sin embargo, los PLAI también podrían poseer estas propiedades, ya que se ha
672 observado que la luz solar es capaz de reducir el contenido de micotoxinas en cereales
673 hasta en un 40% después de 3 horas de exposición y en un 75% después de 30 horas
674 de exposición (Herzallah, Alshawabkeh y Al Fataftah, 2008). Debido a que los PLAI
675 están compuestos por un espectro similar a la luz solar, pero con una intensidad hasta
676 20,000 veces mayor es posible que se obtengan efectos similares con tratamientos de
677 menor duración (Heinrich *et al.*, 2016; Zhang, Wang, Zeng, Han y Brennan, 2018).

678 **4.3.5. Desarrollo de resistencia de microorganismos a tratamientos con radiación**

679 Los tratamientos con irradiación son capaces de inactivar los microorganismos
680 contenidos en un alimento, sin embargo, su efectividad no es del 100%. Generalmente,
681 después de un tratamiento, es posible que en el alimento permanezcan células viables
682 que hayan sobrevivido a la irradiación. El tratamiento con irradiación, como parte de las
683 tecnologías emergentes para la conservación de alimentos, tiene el principal objetivo
684 de modificar lo menos posible las características fisicoquímicas y nutricionales del
685 alimento, por lo que es de esperarse que después de un tratamiento el alimento siga
686 siendo un ambiente para que los microorganismos sobrevivientes puedan
687 desarrollarse. Con esto en mente, es necesario investigar a qué grado los

688 microorganismos son capaces de desarrollar resistencia a los tratamientos con
689 radiación.

690 Un estudio llevado a cabo por Tavares y colaboradores (2010) encontró que es
691 difícil que las bacterias (*E. coli* y *Vibrio fischeri*) desarrollen resistencia a los
692 tratamientos con radiación. Sin embargo, se sabe que los hongos microscópicos son
693 más resistentes a la radiación que las bacterias, particularmente aquellos con la
694 capacidad de desarrollar conidios diploides o poliploides (como los del género
695 *Aspergillus*) y con conidios que contienen melanina (como los géneros *Curvularia* y
696 *Alternaria*) (Saleh, Mayo y Ahearn, 1988). Esto a tal grado que una levadura
697 (*Cryptococcus neoformans*) es el organismo dominante en ambientes altamente
698 irradiados, como el reactor destruido en Chernóbil y los enfriadores de reactores
699 nucleares activos (Jung et al., 2016). Además, existen estudios que indican que es
700 posible desarrollar microorganismos resistentes a la radiación por medio de
701 bioingeniería (Daly, 2000), por lo que no se puede descartar la posibilidad de que el
702 proceso pueda ocurrir naturalmente. En general, existe falta de información respecto a
703 la capacidad del moho para generar resistencia a los tratamientos con radiación, por lo
704 que es necesario realizar investigación al respecto.

705 **4.3.6. Efectos de los tratamientos por irradiación en las propiedades nutricionales,** 706 **físicoquímicas y sensoriales de los alimentos**

707 El propósito de desarrollar nuevas tecnologías para la conservación de alimentos es no
708 solo obtener alimentos más seguros, sino también de mejor calidad sensorial y
709 nutricional. Las tecnologías de irradiación son prometedores en este sentido pues sus

710 efectos sobre las características de los alimentos tratados con ellas prometen ser
711 pequeños. Sin embargo, dado que las radiaciones pueden afectar los lípidos en los
712 alimentos, es posible que su uso en alimentos ricos en lípidos (como las nueces y los
713 cacahuates) produzca sabores y aromas relacionados con la rancidez. Algunos
714 estudios han confirmado que, ciertamente, este es el caso, como el estudio realizado
715 por Gölge y Ova (2008) en el que se encontró que un tratamiento con rayos-γ provocó
716 el aumento de los valores de peróxidos en piñones, tanto de forma inmediata como
717 después de 3 meses de almacenamiento. Resultados similares se obtuvieron tras la
718 irradiación con rayos-γ de nueces de la India (Mexis y Kontominas, 2009). En el primer
719 estudio se reportó que, a pesar del aumento en el contenido de hidroperóxidos, los
720 piñones no sufrieron de cambios significativos en sus propiedades sensoriales. Por otro
721 lado, en el segundo estudio, se encontró que sí hubo cambios significativos en el sabor
722 de las nueces que se probaron.

723 ***4.4. Modelación matemática de tratamientos PLAI***

724 En la mayor parte de los estudios donde se han modelado los efectos de los
725 tratamientos con PLAI, los autores han reportado curvas de inactivación no lineales. En
726 la Tabla 2 se muestra un resumen de algunos estudios en los que se ha realizado la
727 modelación matemática de estos tratamientos.

Tabla 2. Modelación de tratamientos con PLAI en sistemas sólidos.

Modelo	Condiciones de tratamiento			Microorganismo	Inactivación	Parámetros		Referencia
	Intensidad del tratamiento*	Otras condiciones	Sistema			del modelo	Ajuste del modelo*	
Weibull	0-120 kJ/m ²	Emisión máxima de energía: 700J Espectro de longitud de onda: 180-1100 nm Duración del pulso: 0.3 ms Distancia: 8.5 cm Número de pulsos: 0-30 Distancia: 5-13 cm Tiempo de tratamiento: 5-60 s	Hojas de espinaca	<i>Listeria innocua</i>	1.85-2.6 log UFC/g	b = 0.72 n = 0.117	R ² = 0.917	Agüero <i>et al.</i> , 2016
				<i>Escherichia coli</i>	1.72-2.3 log UFC/g	b = 0.003 n = 0.191	R ² = 0.975	
Weibull	2.9-67.0 J/cm ²	Distancia: 5-13 cm Tiempo de tratamiento: 5-60 s	Pechugas de pollo	<i>Salmonella</i> Typhimurium	1.2-2.4 log UFC/cm ²	b = 0.817- 1.111 n = 0.134- 0.254	RMCE = 0.059-0.614 %RMCE = 3.105- 10.361 R ² = 0.785-0.943 Factor de sesgo: 505- 1.270 Factor de precisión: 1.271-1.376	Keklik <i>et al.</i> , 2010b; 2012

728

729

Tabla 2. Modelación de tratamientos con PLAI en sistemas sólidos.

Modelo	Condiciones de tratamiento			Microorganismo	Inactivación	Parámetros		Referencia
	Intensidad del tratamiento*	Otras condiciones	Sistema			del modelo	Ajuste del modelo*	
Weibull	2.9-67.0 J/cm ²	Distancia: 5-13 cm Tiempo de tratamiento: 5-60 s	Pechugas de pollo empacadas al vacío	<i>Salmonella</i> Typhimurium	0.8-2.4 log UFC/cm ²	b = 0.419-0.899 n = 0.195-0.394	RMCE = 0.081-0.116 %RMCE = 5.541-12.711 R ² = 0.929-0.955 Factor de sesgo: 0.625-0.861 Factor de precisión: 1.263-1.335	Keklik <i>et al.</i> , 2010b; 2012
Weibull	2.9-67.0 J/cm ²	Distancia: 5-13 cm Tiempo de tratamiento: 5-60 s	Salchichas de pollo	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.1-1.9 log UFC/cm ²	b = 0.086-0.234 n = 0.458-0.768	RMCE = 0.043-0.164 %RMCE = 6.038-14.338 R ² = 0.851-0.867 Factor de sesgo = 0.869-1.144 Factor de precisión: 1.375-1.398	Keklik <i>et al.</i> , 2009; 2012
Weibull	1.2-35.3 J/cm ²	Distancia: 9.5-14.5 cm Tiempo de tratamiento: 1-30 s	Huevos	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1.3-7.7 log UFC/cm ²	b = 1.275-1.501 n = 0.397-0.504	RMCE = 0.401-0.824 %RMCE = 13.026-21.182 R ² = 0.747-0.921 Factor de sesgo = 0.971-1.309 Factor de precisión = 2.193-6.874	Keklik <i>et al.</i> , 2010a; 2012

Tabla 2. Modelación de tratamientos con PLAI en sistemas sólidos.

Modelo	Condiciones de tratamiento		Sistema	Microorganismo	Inactivación	Parámetros		Referencia
	Intensidad del tratamiento*	Otras condiciones				del modelo	Ajuste del modelo*	
Weibull modificado	0.17-5.28 J/cm ²	Longitud de onda del espectro: 200-1100 nm Duración del pulso: 250 µs Número de pulsos: 1-10 Voltaje: 1-3 kV	Agar	<i>Bacillus subtilis</i>	0-5 log	F ₁ = 0.24	NR	Levy <i>et al.</i> , 2012
					UFC/cm ²	F ₃ = 0.53		
				<i>Aspergillus niger</i>	<1 log	F ₅ = 0.8		
					UFC/cm ²	F ₁ = 1.24 F ₂ = 2.24 F ₃ = 3.52		
Log lineal	0.19-12.22 J/cm ²	Voltaje: 1.5-2.5 kV Energía por pulso: 200-800 J Duración del pulso: 0.5 ms Distancia: 17.5 cm	Lechuga (<i>Lactuca sativa</i> var. <i>capitata</i> L.) Col (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.) Zanahoria (<i>Daucus carota</i> L.)	Flora microbiana nativa	~2 log UFC/g	K _{max} = 0.35	R ² = 0.7376 RMCE = 0.3764	Izquier y Gómez-López, 2011
					~2 log UFC/g	K _{max} = 0.35	R ² = 0.8042 RMCE = 0.3764	
					~1.5 log UFC/g	K _{max} = 0.32	R ² = 0.6973 RMCE = 0.2289	

Tabla 2. Modelación de tratamientos con PLAI en sistemas sólidos.

Modelo	Condiciones de tratamiento			Microorganismo	Inactivación	Parámetros		Referencia
	Intensidad del tratamiento*	Otras condiciones	Sistema			del modelo	Ajuste del modelo*	
Weibull	0.19-12.22 J/cm ²	Voltaje: 1.5-2.5 kV Energía por pulso: 200-800 J Duración del pulso: 0.5 ms Distancia: 17.5 cm	Lechuga	Flora microbiana nativa	~2 log UFC/g	b = 0.44	R ² = 0.9481	Izquier y Gómez-López, 2011
			(<i>Lactuca sativa</i> var. <i>capitata</i> L.)			n = 0.33	RMCE = 0.2289	
			Col		~2 log UFC/g	b = 0.46	R ² = 0.9942	
			(<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.)		n = 0.30	RMCE = 0.0725		
			Zanahoria		~1.5 log UFC/g	b = 0.54	R ² = 0.9822	
			(<i>Daucus carota</i> L.)			n = 0.23	RMCE = 0.1235	
Log lineal con cola	0.19-12.22 J/cm ²	Voltaje: 1.5-2.5 kV Energía por pulso: 200-800 J Duración del pulso: 0.5 ms Distancia: 17.5 cm	Lechuga	Flora microbiana nativa	~2 log UFC/g	K _{max} = 2.32	R ² = 0.9323	Izquier y Gómez-López, 2011
			(<i>Lactuca sativa</i> var. <i>capitata</i> L.)				RMCE = 0.2613	
			Col		~2 log UFC/g	K _{max} = 0.75	R ² = 0.8727	
			(<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.)			RMCE = 0.3394		
			Zanahoria		~1.5 log UFC/g	K _{max} = 1.51	R ² = 0.998	
			(<i>Daucus carota</i> L.)				RMCE = 0.3727	

Tabla 2. Modelación de tratamientos con PLAI en sistemas sólidos.

Condiciones de tratamiento								
Modelo	Intensidad del tratamiento*		Sistema	Microorganismo	Inactivación	Parámetros del modelo		Referencia
	Otras condiciones	Ajuste del modelo*						
Log lineal con hombro y cola	0-0.421 J/cm ²	Longitud de onda del espectro: 200-1100 Duración del pulso: 325 µs	Agar	<i>Listeria innocua</i>	0-6.5 log UFC/cm ²	H ₁ = 0.060 K _{max} = 73.78 N _{res} = 1.2	R ² = 0.939 RMCE = 0.320	Lasagabaster y Martínez de Marañón, 2014
Weibull	1.29-19.35 J/cm ²	Voltaje: 3800 V Longitud de onda del espectro: 100-1100 nm Duración del pulso: 360 µs Distancia: 10.8 cm Número de pulsos: 3-45 Tiempo: 1-15 s	Semillas de chíá (<i>Salvia hispanica</i> L.)	<i>Salmonella</i> Typhimurium	0.21 – 4.88 log UFC/g	b = 0.013 n = 2.017	R ² = 0.939 RMCE = 0.320	Reyes-Jurado <i>et al.</i> , 2019
Weibull	4.05-20.25 J/cm ²	Longitud de onda del espectro: 200-1100 nm Energía por pulso: 505 J Frecuencia de pulso: 3 s ⁻¹ Tiempo: 3-15 s Distancia: 4.26 in	Semillas de girasol	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	2.32-3.22 log UFC/ml	b = 1.7872 n = 0.2181	NR	Sucar-Escamilla, 2018

Tabla 2. Modelación de tratamientos con PLAI en sistemas sólidos.

Modelo	Condiciones de tratamiento		Sistema	Microorganismo	Inactivación	Parámetros		Referencia
	Intensidad del tratamiento*	Otras condiciones				del modelo	Ajuste del modelo*	
Weibull	0.83-1.61 W/cm ²	Voltaje: 3800 V Longitud de onda del espectro: 200-1100 nm Duración del pulso: 300 μs Frecuencia de pulso: 3 s ⁻¹ Tiempo: 5-45 s Distancia: 8-13 cm	Pastrima	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.47-2.99 log UFC/cm ²	b = 1.823- 3.445 n = 0.582- 0.803	R ² = 0.973-0.989 RMCE = 0.107-0.181 A _f = 1.055-1.097	Keklik, 2019
Modelo de Cerf	0.83-1.61 W/cm ²	Voltaje: 3800 V Longitud de onda del espectro: 200-1100 nm Duración del pulso: 300 μs Frecuencia de pulso: 3 s ⁻¹ Tiempo: 5-45 s Distancia: 8-13 cm	Pastrima	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.47-2.99 log UFC/cm ²	f = 0.181- 0.560 k ₁ = 0.070- 0.128 k ₂ = 0.450- 0.890	R ² = 0.989-0.998 RMCE = 0.069-0.131 A _f = 1.013-1.046	Keklik, 2019
Modelo de Kamau	0.83-1.61 W/cm ²	Voltaje: 3800 V Longitud de onda del espectro: 200-1100 nm Duración del pulso: 300 μs Frecuencia de pulso: 3 s ⁻¹ Tiempo: 5-45 s Distancia: 8-13 cm	Pastrima	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.47-2.99 log UFC/cm ²	f = 0.181- 0.560 b ₁ = 0.76- 0.135 b ₂ = 0.534- 0.650	R ² = 0.991-0.999 RMEC = 0.049-0.116 A _f = 1.013-1.046	Keklik, 2019

Tabla 2. Modelación de tratamientos con PLAI en sistemas sólidos.

Modelo	Condiciones de tratamiento		Sistema	Microorganismo	Inactivación	Parámetros		Referencia
	Intensidad del tratamiento*	Otras condiciones				del modelo	Ajuste del modelo*	
Regresión lineal	NR	Energía máxima por pulso: 505J Frecuencia de pulso: 3 s ⁻¹ Distancia: 4.47-12.09 cm Tiempo: 5-60 s	Carne de cabra	<i>Escherichia coli</i>	0.32-1.66 UFC/ml	$\beta_0 = 0.925$ $\beta_1 = -0.045$ $\beta_2 = 0.014$	R _P = 0.61	Bryant <i>et al.</i> , 2021
Regresión lineal	NR	Energía máxima por pulso: 505J Frecuencia de pulso: 3 s ⁻¹ Distancia: 4.47-12.09 cm Tiempo: 5-60 s	Carne de res	<i>Escherichia coli</i>	0.32-1.66 UFC/ml	$\beta_0 = 1.331$ $\beta_1 = -0.074$ $\beta_2 = 0.011$	R _P = 0.66	Bryant <i>et al.</i> , 2021
Weibull	0-37.8 J/cm ²	Longitud de onda del espectro; 250-110 nm Voltaje: 1200-2400 V Distancia: 20 cm Tiempo: 0-180 s Agitación: mezclador Vortex de una velocidad	Semillas de rábano Semillas de pak choi	Flora microbiana nativa	0-1.41 log UFC/g 0-1.78 log UFC/g	$f_R = 24.5 \text{ J/cm}^2$ $f_R = 20.81 \text{ J/cm}^2$	NR	Kim <i>et al.</i> , 2019
Log lineal	NR	Irradiancia: 0.66 W/cm ² Frecuencia de pulso: 100 s ⁻¹ Tiempo: 0-30 min Agitación: superficie vibratoria (60 Hz) Descontaminación y secado por aire simultáneos	Croquetas secas de alimento para animales	<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> y <i>Seftenberg</i>	0-2.26 log UFC/g	D = 11.9	R ² = 0.957 RMCE = 0.325	Subedi y Roopesh, 2020

Tabla 2. Modelación de tratamientos con PLAI en sistemas sólidos.

Modelo	Condiciones de tratamiento			Microorganismo	Inactivación	Parámetros del modelo	Ajuste del modelo*	Referencia
	Intensidad del tratamiento*	Otras condiciones	Sistema					
Weibull	NR	Irradiancia: 0.66 W/cm ² Frecuencia de pulso: 100 s ⁻¹ Tiempo: 0-30 min Agitación: superficie vibratoria (60 Hz) Descontaminación y secado por aire simultáneos	Croquetas secas de alimento para animales	<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> y <i>Seftenberg</i>	0-2.26 log UFC/g	b = 0.15 n = 0.810	R ² = 0.972 RMCE = 0.302	Subedi y Roopesh

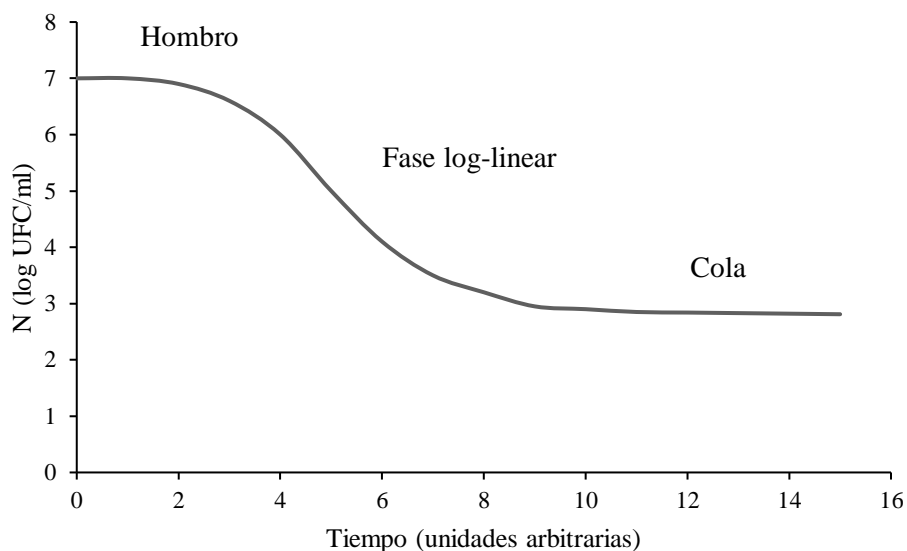
* NR: No reportado

R²: Coeficiente de correlación

RMCE: Raíz de la media cuadrática del error

R_p: Coeficiente de correlación de Pearson

739 La forma de la curva de inactivación microbiana puede ayudar a determinar qué tan
740 adecuado es un determinado modelo, ya que algunos modelos (como el modelo de
741 Weibull) solo son capaces de modelar con precisión curvas en las que solo existe la
742 fase log-lineal, es decir, que no presentan “hombros” ni “colas” (Figura 5).



743
744 **Figura 5.** Curva de inactivación arbitraria mostrando las tres estructuras características
745 correspondientes a las tres fases de inactivación microbiana.

746 La presencia de un hombro indica que la inactivación no comienza al mismo tiempo
747 que el tratamiento, mientras que la presencia de una cola indica una pérdida de eficacia
748 del tratamiento una vez que la reducción microbiana ha alcanzado un determinado
749 punto. Los tratamientos con PLAI generalmente no presentan hombros en sus curvas
750 de inactivación, ya que el tratamiento siempre arranca a su máxima potencia y presenta
751 letalidad significativa incluso en dosis bajas. Sin embargo, algunos estudios han
752 mostrado que estos tratamientos pueden presentar colas (Izquier y Gómez-López,
753 2011). Adicionalmente, la variable de proceso que se selecciona para la modelación

754 tiene inferencia en la forma de la curva de inactivación. Por ejemplo, una curva con
755 respecto al tiempo (con intensidad del tratamiento constante) presentará diferentes
756 características a una curva con respecto a la intensidad del tratamiento (con el tiempo
757 como constante). En este caso en particular, una curva con respecto al tiempo puede
758 presentar hombro, mientras que una con respecto a la intensidad probablemente no lo
759 presentará (Lasagabaster y Martínez de Marañón, 2014).

760

761 4.4.1. Modelo de Weibull

762 El modelo de Weibull es el más comúnmente utilizado para predecir el comportamiento
763 de los tratamientos con PLAI. Este modelo es una herramienta que se utiliza en
764 diversos campos, como medicina e ingeniería, para el análisis de tiempo de vida, lo que
765 lo hace útil también en aplicaciones microbiológicas. Para este modelo se asume que
766 cada célula microbiana se inactiva en un momento determinado, además de que se
767 asume que la curva de inactivación no presente hombros ni colas (Flores-Cervantes *et*
768 *al.*, 2013; Papoulis y Pillai, 2002; Schenk *et al.*, 2008; Taze *et al.*, 2015). Las dos
769 formas más comunes del modelo de Weibull se presentan a continuación en las
770 ecuaciones Ec. 1 y Ec. 2:

$$S(t) = \log\left(\frac{N}{N_0}\right) = b \cdot t^n \quad \text{Ec. 1}$$

$$S(t) = \log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta \quad \text{Ec. 2}$$

771

772 La ecuación Ec. 1 representa la fracción logarítmica ($\log\left(\frac{N}{N_0}\right)$) de
773 microorganismos sobrevivientes ($S(t)$) a un tiempo (t) determinado, donde b y n son los
774 parámetros de escala y forma, respectivamente. El modelo de Weibull se puede
775 modificar para que sea dependiente de un parámetro diferente, como la dosis del
776 tratamiento, en lugar del tiempo (Agüero *et al.*, 2016). En algunos estudios, el modelo
777 de Weibull aparece también en la forma mostrada en la ecuación Ec. 2, donde α es el
778 parámetro de escala y β es el parámetro de forma (Agüero *et al.*, 2016; Keklik *et al.*,
779 2012; Ringus y Moraru, 2013). Los parámetros de forma n y β indican si la curva de
780 inactivación es cóncava o convexa: si el parámetro es >1 , la curva es cóncava; si el
781 parámetro es $= 1$, la curva será lineal y si el parámetro es <1 , la curva será convexa. En
782 términos de resistencia microbiana, una curva cóncava indicaría que la efectividad del
783 tratamiento incrementa conforme incrementa el valor del parámetro de proceso, una
784 curva lineal indicaría que la efectividad se mantiene constante y una curva convexa
785 indicaría que la efectividad va disminuyendo (Karaoglan *et al.*, 2017).

786 El modelo de Weibull se ha utilizado con éxito para la modelación de la
787 inactivación de microorganismos tanto en superficies como en líquidos. Se han hecho
788 estudios en espinaca (Agüero *et al.*, 2016), lechuga, col, zanahorias (Izquier y Gómez-
789 López, 2011), material de empaque (Ringus y Moraru, 2013), vidrio, metal (Levy *et al.*,
790 2012) y sistemas modelo (Kramer *et al.*, 2017; Levy *et al.*, 2012).

791 La efectividad del modelo de Weibull depende de que no existan hombros ni colas
792 en la curva de inactivación, ya que solo está diseñado para modelar la fase log-lineal.
793 De acuerdo con algunos autores, la habilidad del modelo de Weibull se deteriora

794 cuando existen efectos significativos de las propiedades del substrato en la inactivación
795 microbiana, como por ejemplo efectos de sombreado causados por substratos solidos
796 con superficies rugosas (Ferrario *et al.*, 2013; Uesugi *et al.*, 2007).
797

798 **5. Materiales y Métodos**

799 *5.1. Obtención de muestras*

800 Para la obtención de muestras de los alimentos objeto de este estudio se dividió el país
801 en cinco regiones geográficas, cuya distribución se puede ver en la Tabla 3.

Tabla 3. Características de las regiones para el estudio (INEGI, 2020).

No.	Regiones y los estados que las conforman	Descripción de la región
1	Noroeste (Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Sinaloa y Sonora)	Clima predominantemente desértico o semiárido (Köppen BSh/BWh). La región está escasamente poblada y es predominantemente rural. El mayor centro poblacional es la ciudad de Tijuana, B. C.
2	Noreste (Coahuila, Durango, Nuevo León, San Luis Potosí y Tamaulipas)	Clima predominantemente semiárido (Köpen BSh/BSk). La región está escasamente poblada y es principalmente rural con algunas áreas urbanas y suburbanas densamente pobladas. El centro poblacional más grande es la ciudad de Monterrey, N. L.
3	Occidente (Aguascalientes, Colima, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Querétaro, and Zacatecas)	Clima variado, con áreas semiáridas (Köppen BSh/BSk) y presencia importante de áreas de sabana tropical (Köppen Aw). La región está densamente poblada y altamente urbanizada. El centro poblacional más grande es la ciudad de Guadalajara, Jal.
4	Centro (Ciudad de México, México, Guerrero, Hidalgo, Morelos, Puebla, and Tlaxcala)	Clima predominantemente oceánico templado (Köppen Cfb). La región está densamente poblada y extremadamente urbanizada, ya que contiene el complejo urbano de la Megalópolis de

- la Ciudad de México. El centro poblacional más grande es la Ciudad de México.
- 5 Sudeste (Campeche, Chiapas, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz, and Yucatán) El clima es predominantemente tropical (Köppen Aw). La región está escasamente poblada con algunas áreas urbanas y suburbanas. El centro poblacional más grande es la ciudad de Mérida, Yuc.

802

803 Se procuró obtener al menos una muestra de cada fruto en cada región del país.

804 Sin embargo, la temporalidad de la nuez de castilla dificultó la obtención de muestras

805 con las características necesarias para el estudio, por lo que no se obtuvieron muestras

806 de este fruto en todas las regiones del país. Las muestras de las semillas se obtuvieron

807 sin cáscara con el objetivo de cuantificar la contaminación postcosecha con mohos y

808 sus toxinas en la parte comestible del alimento. Una lista de las muestras obtenidas

809 para el estudio se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4. Lista de muestras de frutos secos por región

Fruto seco	Región	Número de muestras
Cacahuete	Centro	18
	Sudeste	6
	Oeste	3
	Noreste	6
	Noroeste	3
Nuez pecana	Centro	12
	Sudeste	3

	Occidente	3
	Noreste	6
	Noroeste	6
Nuez de castilla	Centro	6
	Oeste	3
	Noroeste	3
Pepita de Calabaza	Centro	12
	Occidente	3
	Sudeste	3
	Noreste	6
	Noroeste	9

810 A las muestras obtenidas se les evaluó la actividad de agua y el contenido de
811 humedad inmediatamente después de su llegada al laboratorio para evitar
812 fluctuaciones debido a las condiciones ambientales. Las muestras fueron trituradas con
813 mortero y pistilo para realizar estas evaluaciones. Para la evaluación de actividad de
814 agua se utilizó un sistema Aqualab 4TEV (METER Group, Inc., E.U.A.). Se colocó
815 suficiente muestra en los recipientes plásticos con tapa (suministrados con el equipo)
816 para cubrir el fondo y se realizaron las pruebas por triplicado. El equipo realizó las
817 mediciones a $24.97 \pm 0.13^\circ \text{C}$.

818 Por otro lado, el contenido de humedad de las muestras trituradas se determinó de
819 acuerdo con lo establecido por la norma mexicana NMX-F-083-1986. Se pesaron
820 alrededor de 2 g de la muestra triturada, registrando su peso exacto. Las muestras

821 pesadas fueron colocadas en charolas de aluminio con arena de sílice, cuyo peso
822 constante fue determinado con anterioridad. Las semillas se secaron en una estufa a
823 $103\pm 1^\circ$ C hasta que alcanzaran su peso constante. El contenido de humedad de las
824 semillas se realizó por triplicado y se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{(P - P_1)}{P_2} \times 100 \quad \text{Ec. 3}$$

825 Donde P es el peso de la charola de aluminio con la muestra húmeda, P_1 es el peso
826 de la charola con la muestra seca y P_2 es el peso de la muestra húmeda.

827 **5.2. Aislamiento e identificación de mohos incidentes**

828 **5.2.1. Recuento de mohos y levaduras**

829 Para el recuento de mohos y levaduras se pesaron 10 g de cada muestra y se
830 colocaron en una bolsa estéril con 90 mL de agua peptonada (0.1% p/v). Las muestras
831 se homogeneizaron después en una trituradora de laboratorio Stomacher 80 (Seward
832 Medical Ltd., Reino Unido) y se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-5} con agua
833 peptonada estéril. Las diluciones fueron inoculadas en PDA acidificado con 1.6 ml de
834 una solución de ácido tartárico al 10% por cada 100 ml de medio de cultivo. Las placas
835 inoculadas se incubaron a 25° C por 7 días, y se realizó el conteo tomando en cuenta
836 solo la dilución en la que las placas tuvieran entre 15 y 150 colonias de mohos y/o
837 levaduras. En muestras en las que el crecimiento de *Rhizopus* spp. fue prominente, se
838 realizó una segunda determinación inoculando las diluciones en agar diclorán
839 cloranfenicol rosa de bengala (DRBC) con la finalidad de restringir el desarrollo de

840 estos mohos y permitir el desarrollo de aquellas especies con una velocidad de
841 crecimiento menor. Cada determinación se hizo por triplicado.

842 **5.2.2. Aislamiento e identificación de mohos**

843 El aislamiento de las especies individuales de mohos se hizo tomando colonias
844 individuales de las placas de conteo e inoculándolas en placas de agar Czapek con
845 extracto de levadura (CYA). Las placas fueron incubadas a 25° C por 7 a 14 días y las
846 colonias de moho individuales resultantes fueron transferidas a placas nuevas
847 sucesivamente las veces necesarias para obtener un cultivo puro. Estos cultivos puros
848 fueron utilizados para la identificación de las diferentes especies de moho por medio de
849 técnicas morfológicas.

850 Se sembraron las colonias de los mohos aislados en agar extracto de malta (MEA),
851 CYA y agar nitrato con 25% de glicerol (G25N). Las placas se incubarán por 7 a 14
852 días a 5, 25, y 36° C y se procedió a la identificación de las especies de mohos por
853 medio de las claves dicotómicas descritas por Samson, Hoekstra, Frisvad y Filtenborg
854 (2000), por Malloch (2009) y por Pitt y Hocking (2009).

855 Para la identificación de las especies de *Penicillium* en el subgénero *Penicillium*, se
856 utilizó la técnica del agar creatina sacarosa neutro (CSN) descrita por Pitt y Hocking
857 (2009). Dicho medio de cultivo proporciona un criterio adicional para la identificación de
858 especies cuyas características son demasiado similares para discriminarlas por medio
859 de los métodos antes descritos. Dependiendo de si la especie es capaz de metabolizar
860 la sacarosa y/o la creatina, se produjo en el medio de cultivo una reacción ácida

861 (amarilla), alcalina (violeta) y/o neutra (gris). Las fórmulas de los medios de cultivo
862 empleados en esta etapa se pueden encontrar en el anexo 3.

863 Para las observaciones microscópicas se tomó una muestra directamente de la
864 colonia a observar utilizando cinta adhesiva de poliestireno o tomando una porción de
865 la colonia junto con una porción del medio de cultivo utilizando una aguja estéril. Las
866 muestras de las colonias se montaron sobre portaobjetos de vidrio a los cuales se les
867 añadió previamente una gota de solución de azul de anilina al 1% en ácido láctico al
868 95%. Los portaobjetos se pasaron cuidadosamente por la flama de un mechero para
869 fundir el medio de cultivo y se les agregó una gota de solución de etanol al 70% con el
870 objetivo de permitir que se separaran los conidios. Las observaciones se realizaron en
871 un microscopio óptico MicroStar One-Ten (American Optical Corp., EUA) con objetivos
872 de aumento 40x y 100x. Para la toma de micrografías se utilizó una cámara Axiocam
873 ERc-5s (Carl Zeiss Microscopy, Alemania) acoplada al microscopio.

874 **5.2.2.1. Incidencia de los géneros y especies de mohos individuales**

875 La incidencia de especies y géneros individuales de moho se calculó como la fracción
876 de las muestras en las que se identificó una especie o género particular de moho
877 utilizando la siguiente ecuación:

$$I_s = \frac{n_c}{n_t} \times 100 \quad \text{Ec. 4}$$

878

879 Donde I_s es la incidencia (%) de un género o especie de moho en particular en un
880 grupo de muestras, n_c es el número de muestras dentro de ese grupo en las que se
881 detectó ese género o especie durante el proceso de aislamiento e identificación y n_t es

882 el número total de muestras en ese grupo. Las muestras se agruparon por región y por
883 tipo de semilla y, por lo tanto, la incidencia se expresó en términos de dichos grupos.

884 **5.2.3. Evaluación de la producción de toxinas fúngicas**

885 Habiendo identificado las especies de moho de mayor incidencia en cada uno de los
886 alimentos, se evaluó la capacidad de las cepas aisladas para producir toxinas fúngicas,
887 en particular, las cepas aisladas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, así
888 como las especies aisladas de *Penicillium* spp. La determinación se hizo mediante la
889 técnica del agar de crema de coco (CCA) descrita por Pitt y Hocking (2009) y
890 expandida por Mohamed et al. (2013). Los mohos identificados se inocularon en placas
891 de CCA y se incubaron a 25° C por 7 días. Posterior a este periodo las placas se
892 iluminaron con una lámpara de luz UV-A para observar la presencia de fluorescencia
893 en las colonias, la cual indicaría la producción de toxinas fúngicas.

894 **5.2.4. Selección de las especies de moho para estudios subsecuentes**

895 Con base en la capacidad de producción de toxinas, capacidad de deterioro de las
896 semillas, incidencia, experiencias previas y reportes de la literatura se determinó qué
897 las siguientes especies de mohos serían utilizadas en los experimentos subsecuentes:
898 *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium nalgiovense* y *Rhizopus oryzae*. Las
899 cepas de las especies seleccionadas fueron tomadas de los cultivos aislados como se
900 describió anteriormente.

901 **5.2.5. Análisis estadísticos**

902 Con el objetivo de evaluar la información recopilada, se realizaron diversos análisis
903 estadísticos de los datos.

904 **5.2.5.1. Análisis de varianza (ANOVA)**

905 Se realizó un análisis de varianza precedido de una prueba de igualdad de varianzas y
906 una prueba de normalidad. Se determinó que la prueba de igualdad de varianzas era
907 necesaria debido a las diferencias en los tamaños de las muestras. Esta prueba se
908 realizó por medio del método de Levene. La normalidad, por otro lado, se realizó por
909 medio del método de Ryan-Joiner.

910 En estos análisis previos se determinó que existían diferencias significativas
911 ($p < 0.05$) entre las varianzas de las muestras para las siguientes determinaciones: a_w ,
912 contenido de humedad y recuento de mohos y levaduras. Estas presentaron varianzas
913 significativamente diferentes para todos los grupos de muestras a excepción de la nuez
914 de castilla, para la cual no se encontró diferencia significativa entre las varianzas de las
915 distintas regiones.

916 La prueba de normalidad arrojó que la distribución de datos presentó una
917 distribución con desviaciones significativas ($p < 0.05$) de la normalidad en varias de las
918 categorías en las que se clasificaron los frutos secos evaluados en este estudio.

919 A raíz de estas exploraciones previas, se determinó realizar el análisis de varianza
920 considerando diferencias entre las varianzas y con el análisis de agrupación post-
921 ANOVA de Games-Howell.

922 Estos análisis se realizaron con el software estadístico Minitab 19 (Minitab LLC,
923 EUA).

924 **5.2.5.2. Análisis de componentes principales (ACP)**

925 Con el objetivo de ilustrar las relaciones entre las variables, se realizó un análisis de
926 componentes principales (ACP) entre las variables de a_w , %H, recuento de mohos y
927 levaduras, y número de especies identificadas. Las agrupaciones de los datos
928 puntuales se decidieron conforme a las variables categóricas del sistema (tipo de fruto
929 seco y región). El coeficiente de correlación cofenética (CCC) se calculó como un
930 parámetro para medir la precisión del ACP, donde un valor más cercano a 1.0
931 correspondería a una preservación más fidedigna de las correlaciones entre las
932 variables originales en los factores principales arrojados por el análisis (Ferrario &
933 Guerrero, 2016). Estos análisis se realizaron con el complemento estadístico para
934 Microsoft Excel XLSTAT 2019 (Addinsoft LLC, Paris, Francia).

935 **5.3. Tratamientos con pulsos de luz de alta intensidad**

936 Los tratamientos con PLAI se desarrollaron en dos etapas: en la primera etapa
937 (exploratoria), se probaron tratamientos con PLAI a tres distancias y tres tiempos
938 diferentes, con los mohos inoculados en la superficie de la semilla utilizando una
939 técnica de inoculación seca, descrita más adelante. Adicionalmente, se realizaron
940 pruebas *in-vitro* con los mohos inoculados sobre la superficie de placas de agar DRBC.
941 Con los resultados obtenidos, se probaron tres combinaciones de tiempo y distancia
942 adicionales, con el fin de encontrar el rango efectivo para los mohos en los frutos secos
943 seleccionados. Habiendo encontrado el rango efectivo, se realizaron las pruebas para
944 la modelación de inactivación de los mohos seleccionados en los frutos secos
945 pertinentes al estudio.

968 placa descritas anteriormente, obteniendo los niveles de contaminación iniciales
969 presentados en la Tabla 5.

Tabla 5. Niveles de inoculación obtenidos por medio del método de inoculación en seco.

Fruto seco	Microorganismo	Conteo (log UFC/g)
Cacahuete	<i>Aspergillus flavus</i>	6.2±0.40
	<i>Aspergillus niger</i>	6.6±0.07
	<i>Rhizopus oryzae</i>	5.5±0.62
Nuez pecana	<i>Aspergillus flavus</i>	5.9±0.53
	<i>Aspergillus niger</i>	6.4±0.05
	<i>Rhizopus oryzae</i>	5.2±0.15
Pepita	<i>Aspergillus flavus</i>	6.2±0.59
	<i>Aspergillus niger</i>	6.6±0.10
	<i>Rhizopus oryzae</i>	5.4±0.21

970 **5.3.1.2. Inoculación por gota**

971 Para la técnica de inoculación con gota se utilizaron semillas previamente
972 desinfectadas. Para la desinfección, se pesaron 100 g de cacahuete o pepita de
973 calabaza y se colocaron dentro de un matraz Erlenmeyer estéril. A continuación, las
974 semillas se lavaron utilizando una solución al 6% de peróxido de hidrógeno, bajo
975 agitación, por 15 min. Una vez concluido este periodo de tiempo, las semillas se
976 escurrieron y se enjuagaron utilizando agua destilada estéril, bajo agitación, por 15 min.
977 La fase de lavado con agua destilada se repitió dos veces. Posteriormente, las semillas
978 se secaron en un secador de alimentos por 8 h, hasta recuperar su nivel de humedad
979 original.

980 Para la inoculación se prepararon cuñas de agar extracto de malta con las especies
981 de mohos deseadas (*A. niger* y *A. flavus*). Las cuñas se incubaron a 25° C por 7 días y
982 posteriormente se realizó el lavado de esporas utilizando 10 ml de una solución estéril
983 de Tween 20 al 0.05%. Se realizó el conteo de esporas de las suspensiones, las cuales
984 presentaron un conteo de 6-7 log UFC/ml. Para inocular los frutos secos, las
985 suspensiones de esporas se diluyeron con la misma solución de Tween 20 al 0.05%
986 hasta obtener un conteo de esporas de ~3 log UFC/ml.

987 Para las pruebas con PLAI, se prepararon cajas Petri de vidrio con una cama de
988 almidón de maíz empacado. Las cajas con almidón se esterilizaron en un horno a 130°
989 C por 24 h. Posteriormente, se dejaron enfriar a temperatura ambiente, tapadas, dentro
990 de un desecador hasta que alcanzaran la temperatura ambiente (aproximadamente 3
991 h). Los frutos secos para el experimento se colocaron en grupos de 6 sobre la
992 superficie del almidón empacado, el cual sirvió para mantenerlas en su lugar durante el
993 traslado, así como para proveer de una superficie plana y nivelada, asegurando que
994 todos los frutos secos recibieran la misma cantidad de energía luminosa.

995 Usando las suspensiones de esporas diluidas, se inocularon las superficies de las
996 semillas aplicando una gota de 20 µL sobre la superficie. Se permitió que las gotas se
997 secaran dentro del ambiente estéril de una campana de flujo laminar por 15 min antes
998 de los tratamientos con PLAI.

999 **5.3.2. Tratamientos con PLAI**

1000 Para los tratamientos con PLAI se utilizó un equipo Xenon Z-1000 SteriPulse®. Se
1001 probó el efecto de las mismas variables sobre la efectividad del tratamiento: la distancia
1002 de la fuente de luz al alimento (cm), el tiempo de exposición a los pulsos de luz de alta

1003 intensidad (s) y la dosis o fluencia (J/cm^2). Debido al diseño del sistema de PLAI, la
1004 dosis debe ser ajustada mediante el tiempo y la distancia a la lámpara. El mismo
1005 aparato se utilizó para todas las pruebas con PLAI.

1006 **5.3.2.1. Pruebas *in vitro***

1007 Con el fin de determinar la eficacia de los tratamientos con PLAI sobre los mohos fuera
1008 de la superficie irregular de los frutos secos, se realizaron pruebas *in vitro* con
1009 *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Penicillium* spp. Para la inoculación, se
1010 prepararon cuñas de agar extracto de malta (MEA) con las cepas en cuestión, las
1011 cuales se incubaron a 25°C por 7 días. Pasado el tiempo de incubación, se realizó un
1012 lavado de esporas con una solución de Tween 20 al 0.05%. Se vertieron 10 ml de la
1013 solución dentro de la cuña y se agitó suavemente para desprender las esporas sin
1014 desprender el micelio. Posteriormente, el lavado de esporas se filtró a través de gasa
1015 estéril para remover la mayor cantidad posible de micelio y se realizó un conteo de
1016 esporas por medio de hemocitómetro. Se determinó que los lavados de esporas tenían
1017 concentraciones de $\sim 7 \log \text{CFU}/\text{ml}$, por lo que se realizaron diluciones hasta obtener
1018 una concentración homogénea para todas las suspensiones de esporas de $\sim 3 \log$
1019 CFU/ml . Posteriormente, se inocularon 100 μl de la suspensión diluida sobre placas
1020 Petri de agar diclorán cloranfenicol rosa de Bengala (DRBC), que se distribuyeron
1021 uniformemente sobre la superficie utilizando cuentas de vidrio estériles.

1022 Las placas inoculadas fueron expuestas a los pulsos de luz de alta intensidad
1023 por 1 a 10 s, a distancias de 4.47, 7.01, 9.55, 12.09 y 14.63 cm. Las fluencias
1024 resultantes para estas pruebas estuvieron entre 1.1 y $30.7 \text{ J}/\text{cm}^2$, y se pueden ver a
1025 detalle en la Tabla 6.

Tabla 6. Intensidad de los tratamientos con PLAI para las pruebas *in-vitro*.

Tiempo (s)	Distancia (cm)				
	4.47	7.01	9.55	12.09	14.63
Fluencia (J/cm ²)					
1	3.1	2.1	1.5	1.2	1.1
2	6.1	4.2	3.1	2.5	2.3
3	9.2	6.3	4.6	3.7	3.4
4	12.3	8.4	6.1	5.0	4.5
5	15.4	10.5	7.6	6.2	5.6
6	18.4	12.6	9.2	7.5	6.8
7	21.5	14.6	10.7	8.7	7.9
8	24.6	16.7	12.2	10.0	9.0
9	27.6	18.8	13.8	11.2	10.2
10	30.7	20.9	15.3	12.5	11.3

1026

1027 Finalmente, tras la exposición a los tratamientos con PLAI, las placas de agar se
 1028 incubaron a 25° por 5 días en el caso de *Penicillium* spp, y por 3 días en el caso de *A.*
 1029 *niger* y *A. flavus*. Tras el periodo de incubación, se realizó el conteo de colonias para
 1030 obtener la inactivación al comparar con un testigo positivo. Los ensayos se realizaron
 1031 por triplicado.

1032 5.3.2.2. Pruebas con inoculación en seco

1033 En la Tabla 7 se muestran los tiempos y distancias que fueron evaluados en las
 1034 pruebas con inoculación en seco y las dosis resultantes de acuerdo con las
 1035 especificaciones del fabricante. Tras cada tratamiento se realizó una cuantificación de
 1036 los microorganismos supervivientes en los alimentos.

Tabla 7. Combinaciones de tiempo y distancia para los tratamientos con PLAI de frutos secos inoculados en seco.

Tiempo (s)	Distancia (cm)	Fluencia (J/cm ²)
5	10.82	6.75
5	8.85	8.85
5	5.74	12.75

10	10.82	13.50
10	8.28	17.70
15	10.82	20.25
10	5.74	25.50
15	8.28	26.55
15	5.74	38.25

1037

1038 Tras los tratamientos con PLAI, los frutos secos se colocaron en bolsas estériles
1039 con 90 mL de agua peptonada, y se trituraron en una trituradora de laboratorio
1040 Stomacher (Seward). Se realizaron diluciones seriadas del sobrenadante con el fin de
1041 determinar la reducción lograda por los tratamientos. Se inocularon placas de agar
1042 DRBC para el conteo con 1000 µl del sobrenadante o de las diluciones, las cuales se
1043 incubaron a 25° C por 5 días, en el caso de *Penicillium* spp y por 3 días en el caso de
1044 *A. niger* y *A. flavus*. Tras la incubación, se realizó el conteo de colonias. Los ensayos
1045 se realizaron por triplicado.

1046 **5.3.2.3. Pruebas con inoculación por gota**

1047 Tras las pruebas con PLAI con semillas inoculadas en seco, se determinó que era
1048 necesaria una dosis mayor para lograr la inactivación de los microorganismos. Por lo
1049 tanto, se determinó utilizar las dosis mostradas en la Tabla 8 para las pruebas
1050 subsecuentes. Todas las pruebas con inoculación por gota se realizaron a una
1051 distancia de 7.01 cm de la lámpara, con una fluencia por pulso de 0.70 J/cm².

Tabla 8. Dosis de los tratamientos con PLAI para las pruebas con inoculación por gota.

Tiempo (s)	Fluencia total (J/cm ²)
20	42
30	63
40	84
50	105
60	126
80	168
100	210

1052

1053 Tras recibir el tratamiento, los frutos secos se transfirieron directamente a placas de
1054 agar DRBC y se incubaron a 25° C por 7 días, o hasta que se percibiera crecimiento
1055 del moho inoculado en la superficie del fruto seco. Los frutos secos se inspeccionaron
1056 diariamente bajo el microscopio óptico para determinar si existía crecimiento
1057 microbiano. Los ensayos se realizaron por triplicado.

1058 **5.3.2.4. Medición de temperatura**

1059 La temperatura superficial de los frutos secos inoculados por gota y de las placas de
1060 agar utilizadas en las pruebas *in-vitro* se midió utilizando un termómetro infrarrojo. La
1061 temperatura se midió antes y después de la exposición a los PLAI y se calculó el
1062 cambio en temperatura como ΔT (°C). Las mediciones de temperatura se realizaron a
1063 una distancia de 20 cm de la superficie de la muestra, como se indica en las
1064 especificaciones del fabricante del termómetro. Se midió la temperatura post
1065 tratamiento inmediatamente después del tratamiento, para evitar que las muestras se
1066 enfriasen.

1067 **5.3.3. Modelación matemática de la inactivación de los mohos seleccionados por medio**
1068 **de tratamientos con PLAI**

1069 **5.3.3.1. Modelo de Weibull**

1070 La modelación de la inactivación de mohos se realizó por medio del análisis del diseño
1071 experimental tipo superficie de respuesta, observando el cambio en el porcentaje de
1072 inactivación con respecto a las tres variables de proceso (distancia, tiempo e
1073 intensidad). Adicionalmente, los datos de inactivación de los mohos seleccionados en
1074 los frutos secos pertinentes al estudio se ajustaron al modelo de Weibull como se
1075 presenta en la Ec. 1. Con los parámetros de escala (b) y forma (n) obtenidos se
1076 desarrolló el gráfico de frecuencia de inactivación utilizando la siguiente ecuación,
1077 descrita por Peleg (1999):

$$f = \frac{dS}{dF} = bF^{n-1}e^{-bF^n} \quad \text{Ec. 5}$$

1078 Donde S es el número de supervivientes y F es la fluencia del tratamiento con
1079 pulsos de luz.

1080 Con estos mismos parámetros, utilizando las ecuaciones descritas por Peleg y Cole
1081 (1998), se calcularon también la moda (Ec. 6), media (Ec. 7), varianza (Ec. 8) y
1082 coeficiente de sesgo (Ec. 9).

$$F_m = \left(\frac{n-1}{bn}\right)^{\frac{1}{n}} \quad \text{Ec. 6}$$

1083

$$\bar{F} = \frac{\Gamma\left(\frac{n+1}{n}\right)}{b^{\frac{1}{n}}} \quad \text{Ec. 7}$$

1084

$$\sigma_{\bar{F}}^2 = \frac{\Gamma\left(\frac{n+2}{n}\right) - \left[\Gamma\left(\frac{n+1}{n}\right)\right]^2}{b^{\frac{2}{n}}} \quad \text{Ec. 8}$$

1085

$$v = \frac{\frac{\Gamma\left(1 + \frac{2}{n}\right)}{b^{\frac{3}{2}}}}{\left[\frac{\Gamma\left(1 + \frac{2}{n}\right)}{b^{\frac{2}{n}}}\right]^{\frac{3}{2}}} \quad \text{Ec. 9}$$

1086 Donde Γ representa la función gamma.

1087 Las ecuaciones anteriores y los parámetros resultantes se utilizaron como medidas
1088 de la efectividad de los tratamientos con pulsos de luz.

1089 **5.3.3.2. Modelo probabilístico**

1090 Los resultados de las pruebas con inoculación por gota se clasificaron como
1091 crecimiento (1) o no crecimiento (0) durante los 7 días de monitoreo de crecimiento.
1092 Los datos experimentales se ajustaron a un modelo probabilístico basado en la
1093 regresión logística mostrada en las ecuaciones Ec. 10 a Y. El análisis se realizó usando
1094 el software estadístico Minitab 19.

$$p(x) = \frac{e^{\sum_{i=1}^n \beta_i x_i}}{1 + e^{\sum_{i=1}^n \beta_i x_i}} \quad \text{Ec. 10}$$

1095

$$\text{logit}(p) = g(x) = \ln\left(\frac{p(x)}{1 - p(x)}\right) \quad \text{Ec. 11}$$

1096

$$g(x) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_i x_i + \dots + \beta_i^2 x_i^2 + \dots + \beta_{ij} x_i x_j \quad \text{Ec. 12}$$

1097

1098 Donde $p(x)$ es la probabilidad de crecimiento, $g(x)$ representa un modelo
 1099 polinómico, x_i son las variables independientes del modelo y β_i son los coeficientes de
 1100 las variables polinómicas. El modelo se construyó utilizando solo variables e
 1101 interacciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$), cuya significancia se determinó
 1102 por medio de eliminación por pares. Para determinar la bondad de ajuste del modelo,
 1103 se realizaron las pruebas de Hosmer-Lemeshow y Pearson.

1104 5.3.3.3. Análisis de tiempo de vida

1105 Con base en el tiempo hasta la detección visual de moho en la superficie de los frutos
 1106 secos a través del microscopio estereoscópico, se construyó un modelo polinomial para
 1107 describir el tiempo de falla (es decir, crecimiento del moho) para los frutos secos (Ec.
 1108 14). Para la realización de este modelo, se normalizaron las variables utilizando la
 1109 ecuación mostrada a continuación:

$$X = \frac{x - \bar{x}}{\sigma^2} \quad \text{Ec. 13}$$

1110

1111 Donde X es la variable normalizada, x es la variable original, \bar{x} es el promedio de
1112 todos los valores de la variable y σ^2 es su desviación estándar. Las variables
1113 normalizadas se utilizaron solo para el siguiente modelo:

$$\ln \text{TTD}(X) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_i X_i + \dots + \beta_i^2 X_i^2 + \dots + \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{Ec. 14}$$

1114

1115 Donde $\ln \text{TTD}(X)$ es el logaritmo del tiempo hasta la detección (TTD), β_i son los
1116 coeficientes del modelo polinómico y X_i son los valores normalizados de los factores
1117 estudiados. De la misma manera que con el modelo probabilístico, solo se utilizaron
1118 variables e interacciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para construir este
1119 modelo. El modelo se construyó utilizando Minitab 19.

1120 **5.3.3.4. Análisis y modelación de datos de inactivación de hongos en alimentos**

1121 Se realizó un análisis de datos de inactivación de hongos (mohos y levaduras)
1122 obtenidos de estudios previos realizados por otros autores. Para este análisis, se
1123 realizó una recopilación de varios estudios en los que se buscara la reducción del
1124 contenido de mohos y levaduras en alimentos y sistemas modelo. Una lista de los
1125 artículos analizados se puede encontrar en la Tabla 9. De los artículos seleccionados
1126 varios presentaron sus datos en forma de gráfico, por lo que se realizó la extracción
1127 manual de los datos por medio de medición directa, utilizando el software A Ruler For
1128 Windows v. 3.7.1. (Rob Latour, Ottawa, Canada). Los datos extraídos se utilizaron para
1129 construir modelos de inactivación por medio de la ecuación de Weibull (Ec. 1), así
1130 como para generar las curvas de frecuencia de inactivación utilizando la ecuación Ec.
1131 5. Por otro lado, también se calcularon los parámetros de la curva de inactivación,

1132 utilizando las ecuaciones Ec. 6 a la Ec. 9. El objetivo de este análisis fue obtener
 1133 puntos de comparación para las diferentes condiciones de inactivación de mohos y
 1134 levaduras en alimentos.
 1135

Tabla 9: Lista de los artículos utilizados para modelación de datos de inactivación

Datos bibliográficos de los artículos			Datos del estudio	
Referencia	Título	Publicación	Microorganismo	Sustrato
Aguiló- Aguayo <i>et al.</i> , 2013	Pulsed light effects on surface decontamination, physical qualities and nutritional composition of tomato fruit	Postharvest Biology and Technology	<i>S. cerevisiae</i>	Tomate
Anderson <i>et al.</i> , 2000	Inactivation of Food-Borne Enteropathogenic Bacteria and Spoilage Fungi Using Pulsed-Light	IEEE Transactions on Plasma Science	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>A. niger</i>	Agar
Aron Maftai <i>et al.</i> , 2014b	Pulsed light inactivation of naturally occurring moulds on wheat grain	Journal of the Science of Food and Agriculture	Mohos nativos	Granos de trigo
Can <i>et al.</i> , 2014	Decontamination of Hard Cheeses by Pulsed UV Light	Journal of Food Protection	<i>P. roqueforti</i>	Queso
Chaine <i>et al.</i> , 2012	Decontamination of Sugar Syrup by Pulsed Light	Journal of Food Protection	<i>S. cerevisiae</i> , <i>A. niger</i>	Jarabe de sacarosa
Aron Maftai <i>et al.</i> , 2014a	Influence of processing parameters on the pulsed light inactivation of <i>Penicillium expansum</i> in apple juice	Food Control	<i>P. expansum</i>	Jugo de manzana

Turtoi & Nicolau, 2007	Intense light pulse treatment as an alternative method for mould spores destruction on paper-polyethylene packaging material	Journal of Food Engineering	<i>A. niger</i> , <i>C. herbarum</i>	Material de empaque
Ferrario <i>et al.</i> , 2015	Study of the inactivation of spoilage microorganisms in apple juice by pulsed light and ultrasound	Food Microbiology	<i>S. cerevisiae</i>	Jugo de manzana
Zenklusen <i>et al.</i> , 2018	Inactivation of <i>Aspergillus carbonarius</i> and <i>Aspergillus flavus</i> in malting barley by pulsed light and impact on germination capacity and microstructure	Innovative Food Science and Emerging Technologies	<i>A. carbonarius</i> , <i>A. flavus</i>	Malta de cebada
Katarzyna <i>et al.</i> , 2021	Impact of pulsed light treatment on the quality properties and microbiological aspects of red bell pepper fresh cuts	LWT – Food Science and Technology	Mohos y levaduras nativos	Pimiento rojo

1137 **6. Resultados y discusión**

1138 *6.1. Análisis fisicoquímico de los frutos secos*

1139 En la Tabla 10 se pueden ver los resultados de los análisis de actividad de agua,
1140 contenido de humedad y conteo de mohos y levaduras de las semillas analizadas. El
1141 análisis de igualdad de varianzas mostró que existía una diferencia significativa
1142 ($p < 0.05$) en las varianzas de la humedad y actividad de agua de los diferentes grupos
1143 de semillas. Por esta razón, los análisis de varianza (ANOVA) se realizaron
1144 considerando varianzas significativamente diferentes y se utilizó el método de
1145 comparación por pares de Games-Howell para el análisis post-ANOVA. Los resultados
1146 del análisis mostraron que la mayoría de los frutos secos presentaron actividad de agua
1147 por debajo de 0.6 y contenido de humedad por debajo del 6%. Solo la nuez pecana de
1148 la región sureste mostró actividad de agua por encima de 0.6. A estos valores de
1149 actividad de agua, las semillas serían estables en almacenamiento, con poca
1150 probabilidad de desarrollo de mohos deterioradores. En general, para el
1151 almacenamiento de alimentos secos como granos y nueces, es preferible que se
1152 encuentren a actividades de agua por debajo de 0.68, que es el límite para el desarrollo
1153 de mohos xerófilos, como *Eurotium* spp., *A. flavus* y *A. niger* (Pitt y Hocking, 2009).

1154 Los cacahuates mostraron contenido de humedad de entre $2.40 \pm 1.03\%$ y
1155 $4.17 \pm 0.2\%$, el cual fue considerablemente más bajo que el reportado por Ghorbani y
1156 Hosseini (2017), quienes encontraron un contenido de humedad de $8.79 \pm 0.07\%$. Otros
1157 autores han reportado valores de contenido de humedad para cacahuates más
1158 cercanos a los encontrados en este estudio; por ejemplo, Liu et al. (2018), quienes

1159 reportaron valores de contenido de humedad de entre 3.65 ± 0.05 y $4.05\pm 0.09\%$. Los
1160 valores de actividad de agua de los cacahuates analizados en este estudio están en su
1161 mayoría dentro del rango considerado por Ghorbani y Hosseini (2017) como adecuado,
1162 de entre 0.33 y 0.43 a 25° C. Solo los cacahuates de la región noreste presentaron
1163 valores de actividad de agua fuera de este rango.

1164 Las muestras de cacahuete de diferentes regiones presentaron diferencias
1165 significativas ($p < 0.05$) en su actividad de agua y contenido de humedad. Los
1166 cacahuates de las regiones centro y noreste presentaron actividad de agua
1167 significativamente más alta que los cacahuates de la región occidente. Por otro lado,
1168 los cacahuates de la región occidente presentaron contenido de humedad
1169 significativamente más alto que los cacahuates de las regiones sureste y noreste, pero
1170 no presentaron diferencia con las semillas de la región centro. Estas diferencias
1171 probablemente se deban a una diferencia en composición de los cacahuates, ya que la
1172 actividad de agua no solo está determinada por el contenido de humedad del alimento,
1173 sino también por su contenido de sólidos solubles de bajo peso molecular. Se sabe que
1174 el contenido de humedad y la actividad de agua de los cacahuates también pueden
1175 variar dependiendo del punto de madurez en el que se cosecharon (Dorner, 2008). Es
1176 poco probable que la actividad de agua de los cacahuates haya sido influenciada por la
1177 humedad ambiental, ya que los cacahuates de la región sudeste con clima tropical
1178 presentaron actividad de agua más baja que los de otras regiones, incluyendo las
1179 regiones áridas del norte y occidente.

1180 Las muestras de nuez pecana también presentaron diferencias significativas
1181 tanto en actividad de agua como en contenido de humedad. Las nueces de la región

1182 sureste presentaron una actividad de agua significativamente ($p < 0.05$) más alta que las
1183 del resto del país. Las nueces de esta región también presentaron actividad de agua
1184 por encima del umbral de desarrollo de esporas de moho ($a_w > 0.6$), lo que podría
1185 volverlas susceptibles al deterioro y/o a la generación de aflatoxinas. Los niveles de
1186 actividad de agua encontrados fueron considerablemente más bajos que los reportados
1187 por Valle-García et al. (2019), quienes encontraron que todas las muestras de nuez
1188 pecana evaluadas en su estudio presentaban actividades de agua por encima del
1189 umbral de 0.6 y con niveles de hasta 0.9. Por otro lado, solo las nueces de la región
1190 noreste presentaron contenido de humedad más bajo que las de occidente y sureste, lo
1191 cual parece indicar nuevamente que la actividad de agua se debe a una diferencia en
1192 composición de los frutos secos. Los contenidos de humedad encontrados fueron más
1193 bajos que los reportados por Reis Ribeiro et al. (2020), quienes encontraron niveles de
1194 contenido de humedad en un rango de entre 4.56 a 5.50%. En el caso de la nuez
1195 pecana, el clima regional parece haber tenido una influencia en la actividad de agua de
1196 las muestras, puesto que solo las muestras de la región sureste presentaron actividad
1197 de agua por encima del umbral de crecimiento de moho.

1198 Las pepitas de calabaza presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en su
1199 actividad de agua solamente entre las regiones sureste y occidente. Por otro lado, la
1200 mayoría de las muestras provenientes de las diferentes regiones presentaron una
1201 diferencia significativa en contenido de humedad entre sí, siendo las semillas de la
1202 región occidente las que presentaron el mayor contenido de humedad con $6.10 \pm 0.03\%$.
1203 Ardabili et al. (2011) reportaron un contenido de humedad para semillas de *Cucurbita*
1204 *pepo* de 5.20 ± 0.28 , el cual se asemeja al encontrado en este estudio. Aún existe poca

1205 información bromatológica sobre las semillas de *Cucurbita argyrosperma*; a la fecha de
 1206 publicación de este estudio, no se ha encontrado otro reporte del contenido de
 1207 humedad y actividad de agua de las semillas de esta especie de calabaza, aunque es
 1208 razonable asumir que es similar al de otras especies del género *Cucurbita*.

1209 En general, los valores de actividad de agua se encontraron muy por debajo del
 1210 nivel óptimo para la producción de aflatoxinas de 0.96, así como del umbral de
 1211 producción de aflatoxinas, el cual se reporta como 0.85 (Liu *et al.*, 2017). Estos datos
 1212 por si solos no son suficientes para descartar la posibilidad de presencia de aflatoxinas
 1213 en estos frutos secos, debido a la posibilidad de contaminación cruzada. Sin embargo,
 1214 son indicativos del adecuado manejo y almacenamiento de las muestras para la
 1215 prevención del desarrollo de esporas de moho y la producción endógena de
 1216 aflatoxinas.

1217

Tabla 10. Humedad, actividad de agua y conteo de mohos y levaduras de las semillas analizadas.

<i>Semilla</i>	<i>Lugar de origen</i>	<i>Contenido de humedad (%)</i>	<i>Actividad de agua</i>	<i>Conteo de mohos y levaduras (UFC/g)</i>
<i>Cacahuete</i>	Puebla, Pue.	2.81±0.07	0.398±0.003	-
	Sn. Pedro Cholula, Pue.	4.88±0.09	0.422±0.006	-

	Coatepec, Ver.	1.67±0.01	0.327±0.001	<10
	Cuernavaca, Mor.	3.52±0.02	0.364±0.001	154
	Guadalajara, Jal.	4.17±0.02	0.341±0.001	170
<i>Nuez pecana</i>	Puebla, Pue.	2.75±0.07	0.461±0.002	-
	Cholula, Pue.	2.18±0.02	0.346±0.001	-
	Cuernavaca, Mor.	1.72±0.04	0.349±0.001	70
	Guadalajara, Jal.	2.44±0.03	0.293±0.015	100
<i>Nuez de castilla</i>	Puebla, Pue.	2.66±0.08	0.494±0.001	-
	Cuernavaca, Mor.	2.66±0.09	0.495±0.007	<10
	Guadalajara, Jal.	2.22±0.06	0.281±0.013	210
<i>Pepita de calabaza</i>	Puebla, Pue.	6.45±0.05	0.536±0.008	-
	Cholula, Pue.	5.18±0.03	0.394±0.004	-

Cuernavaca,	4.55±0.07	0.321±0.008	40
Mor.			
Guadalajara,	6.10±0.03	0.442±0.008	953
Jal.			

1218

1219 ***6.2. Conteo, aislamiento e identificación de mohos y levaduras en los frutos secos***

1220 Con los datos de conteo de mohos y levaduras mostrados en la Tabla 10, se puede ver
1221 que la mayoría de las semillas están por debajo del recuento de mohos y levaduras
1222 permitido por la norma mexicana correspondiente (NOM-247-SSA1-2008), el cual es de
1223 300 UFC/g. A pesar de esto, varias semillas presentaron niveles por encima de lo
1224 permitido por la norma: una muestra de nuez pecana de la región centro y tres
1225 muestras de pepita de calabaza (una de la región centro, una de la región occidente y
1226 una de la región noreste). Se presentó una gran variabilidad en lo que respecta al
1227 recuento de mohos y levaduras en las muestras de frutos secos analizadas, la cual se
1228 puede apreciar en la Figura 6.

1229 Se encontraron correlaciones significativas ($p < 0.05$) entre actividad de agua o
1230 humedad y el contenido de mohos y levaduras en algunos de los grupos de muestras
1231 (Tabla 11). En el caso de los cacahuates, se encontró una correlación positiva
1232 significativa entre el contenido de mohos y levaduras y la humedad, mientras que la
1233 correlación no fue significativa con la actividad de agua. Por otro lado, en las muestras
1234 de nuez pecana se encontró una correlación positiva significativa entre la actividad de
1235 agua y el contenido de mohos y levaduras, pero no con la humedad.

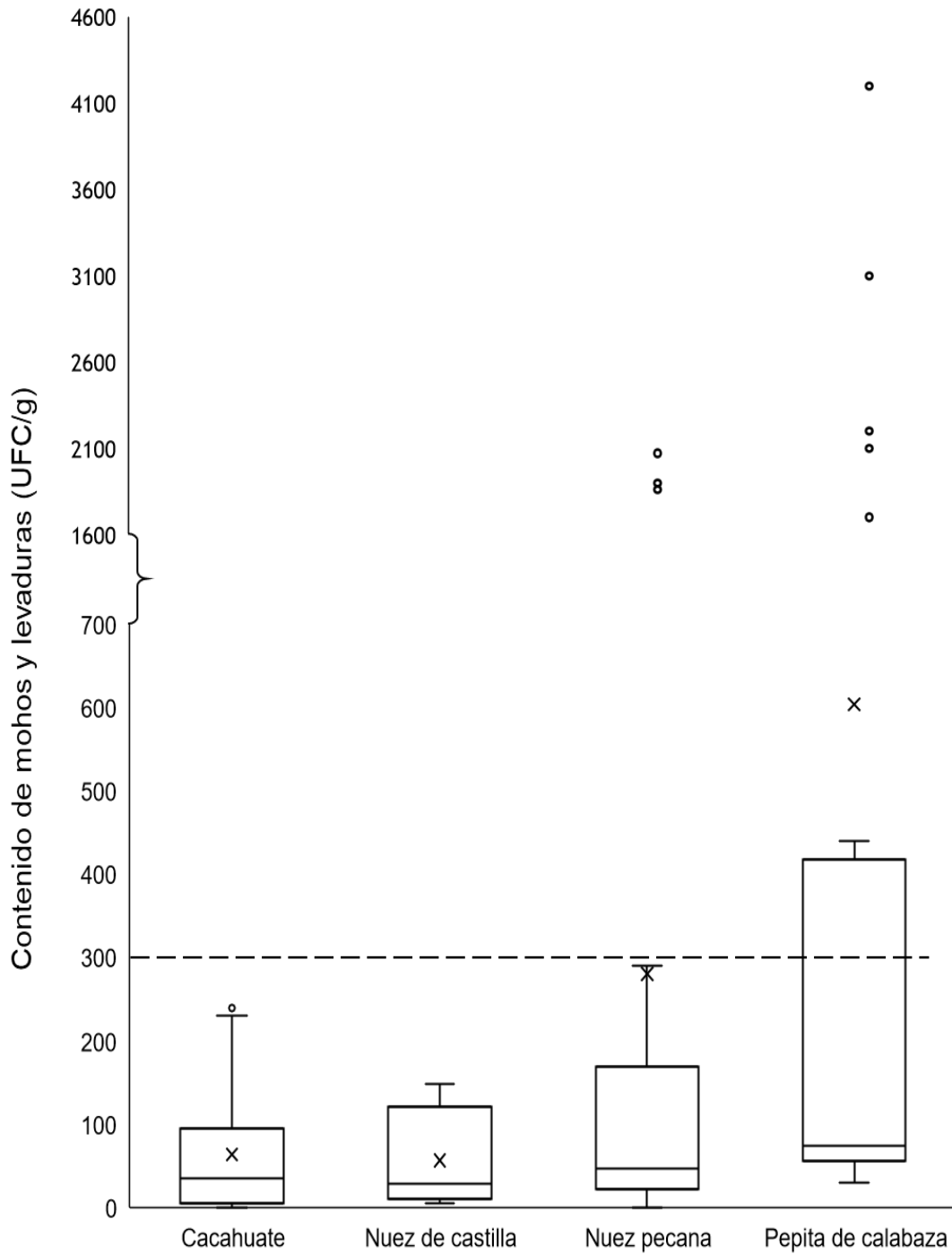


Figura 6. Diagrama de caja y bigote de la distribución del contenido de mohos y levaduras. La línea punteada indica el nivel máximo permitido por la legislación mexicana.

1238 En las muestras de pepita de calabaza no se encontró ninguna correlación
 1239 significativa entre la humedad o actividad de agua y el contenido de mohos y levaduras.
 1240 En el caso de las muestras de nuez de castilla, se encontró una correlación negativa
 1241 significativa entre la actividad de agua y el conteo de mohos y levaduras, mientras que
 1242 no se encontró correlación significativa con el contenido de humedad.

Tabla 11. Coeficientes de correlación (r) y valores de p para el conteo de mohos y levaduras contra actividad de agua y contenido de humedad para los distintos frutos secos.

Fruto seco	a_w		%H	
	r	p	r	p
Cacahuete	0.128	0.478	0.620	0.000
Nuez pecana	0.546	0.003	0.403	0.037
Nuez de castilla	-0.975	0.000	-0.527	0.145
Pepita de calabaza	-0.003	0.986	-0.070	0.713

1243 En general, se esperaría una correlación positiva entre alguna de las dos
 1244 variables (a_w o %H). Sin embargo, esto no necesariamente será cierto en todos los
 1245 casos ya que el crecimiento de mohos es limitado cuando se habla de bajos contenidos
 1246 de humedad o bajas actividades de agua. La falta de correlación entre la actividad de
 1247 agua o el contenido de humedad y el contenido de mohos y levaduras podría indicar
 1248 que no hubo crecimiento endógeno de mohos en las muestras de frutos secos y, por lo
 1249 tanto, que los mohos y levaduras detectados en las muestras provinieron de
 1250 contaminación exógena.

1251 A pesar de la percepción general de condiciones poco sanitarias en las
1252 plantaciones, mercados y centros de distribución mexicanos (Cedillo Camarena, 2013;
1253 García-Gómez *et al.*, 2002), los frutos secos se encuentran, en general, en buenas
1254 condiciones microbiológicas en lo que respecta al contenido de mohos y levaduras y de
1255 acuerdo con las regulaciones nacionales. La baja actividad de agua encontrada en los
1256 frutos secos indicaría también que estos fueron almacenados adecuadamente previo a
1257 su venta, pues incluso en regiones con clima húmedo (centro y sureste) los frutos
1258 secos no mostraron valores de actividad de agua que pudieran representar un riesgo
1259 de desarrollo de mohos.

1260 **6.2.1. Aislamiento e identificación de mohos**

1261 En la Tabla 12 se pueden observar las especies de mohos aisladas de las
1262 diferentes semillas. Destaca la presencia de diferentes especies toxígenas de
1263 *Aspergillus* y *Penicillium*, así como *Fusarium*. La prevalencia de *Aspergillus* y
1264 *Penicillium* en frutos secos se ha reportado con anterioridad y se considera que estos
1265 dos géneros son los más importantes deterioradores de esta clase de alimentos
1266 (Adebajo y Diyaolu, 2003; Khosravi, Shokri y Ziglari, 2007). Adicionalmente, muchas de
1267 estas especies son también capaces de producir micotoxinas. Se encontraron también
1268 algunas especies relacionadas con contaminación en el campo, como *Alternaria* spp.,
1269 *Phoma* spp. y *Cladosporium* spp. de las que no se ha reportado que sean
1270 deterioradoras de frutos secos y, de las cuales, solo *Alternaria* spp. es capaz de
1271 producir micotoxinas. Em general, la micobiota de los frutos secos analizados es
1272 consistente con lo reportado para frutos secos de una región tropical, con mohos

1273 adaptados a climas cálidos y húmedos (como *R. oryzae*, *A. flavus* y *A. niger*) siendo los
 1274 más predominantes.

Tabla 12. Especies de moho aisladas de las diferentes semillas.

<i>Especie de moho aislada</i>	<i>Semilla</i>	<i>Procedencia</i>
<i>Alternaria alternata</i>	Cacahuate	San Andrés Cholula, Pue.
<i>Aspergillus candidus</i>	Cacahuate	San Andrés Cholula, Pue.
<i>Aspergillus flavus</i>	Cacahuate	Puebla, Pue.
<i>Aspergillus niger</i>	Cacahuate	Puebla, Pue.
<i>Aspergillus terreus</i>	Cacahuate	Veracruz, Ver.
<i>Aspergillus ustus</i>	Cacahuate	San Andrés Cholula, Pue.
<i>Aspergillus ustus</i>	Nuez de castilla	Puebla, Pue.
<i>Aspergillus versicolor</i>	Cacahuate	San Andrés Cholula, Pue.
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Cacahuate	San Andrés Cholula, Pue.
<i>Epicoccum</i> spp.	Cacahuate	San Andrés Cholula, Pue.
<i>Eurotium amstelodami</i>	Nuez pecana	Puebla, Pue.
<i>Fusarium</i> spp.	Nuez pecana	Guadalajara, Jal.
<i>Mucor hiemalis</i>	Nuez pecana	Puebla, Pue
<i>Neosatorya fisheri</i>	Cacahuate	Veracruz, Ver.
<i>Paecilomyces variotii</i>	Nuez de castilla	Puebla, Pue.
<i>Penicillium citrinum</i>	Cacahuate	San Andrés Cholula, Pue.
<i>Penicillium echinulatum</i>	Cacahuate	Puebla, Pue.
<i>Penicillium expansum</i>	Nuez de castilla	Puebla, Pue.

<i>Penicillium funiculosum</i>	Nuez de castilla	Puebla, Pue.
<i>Penicillium glabrum</i>	Cacahuate	San Andrés Cholula, Pue.
<i>Penicillium nalgiovense</i>	Cacahuate	San Andrés Cholula, Pue.
<i>Penicillium nalgiovense</i>	Nuez pecana	Puebla, Pue.
<i>Penicillium rugulosum</i>	Nuez de castilla	Puebla, Pue.
<i>Penicillium</i> spp.	Cacahuate	San Andrés Cholula, Pue.
<i>Phoma</i> spp.	Cacahuate	San Andrés Cholula, Pue.
<i>Phoma</i> spp.	Cacahuate	San Andrés Cholula, Pue.
<i>Phoma</i> spp.	Cacahuate	Puebla, Pue.
<i>Rhizopus oryzae</i>	Pepita de calabaza	Puebla, Pue.
<i>Ulocladium chartarum</i>	Cacahuate	San Andrés Cholula, Pue.

1275

1276 En la Tabla 13 se muestra una lista de las especies de moho identificadas en los
1277 frutos secos y las características principales que permitieron su identificación de
1278 acuerdo con las claves dicotómicas mencionadas anteriormente. Se observó una
1279 mayor diversidad de especies de moho en las muestras de cacahuate, mientras que las
1280 muestras de pepita de calabaza se encontraron dominadas principalmente por *R.*
1281 *oryzae* y *A. niger*.

1282 Las características morfológicas de los mohos encontrados en este estudio
1283 concordaron, en su mayor parte, con aquellas reportadas en la literatura previamente.
1284 Comenzando por *A. alternata*, la morfología encontrada en este estudio coincide con la
1285 reportada por Armitage *et al.* (2015), exceptuando el diámetro de las colonias en el
1286 medio de cultivo PDA, el cual se reportó como un máximo de 68 mm. En el caso de

1287 *Aspergillus candidus*, otros autores han reportado también la morfología encontrada en
1288 este estudio, siendo sus características definitorias el color de sus colonias (blanco) y la
1289 textura de sus conidios (lisa). El diámetro de los conidios, de 2.0 μm , fue menor al
1290 reportado en otros estudios (Varga *et al.*, 2007).

1291 *A. flavus* se distinguió de otras especies similares como *A. oryzae* y *A. parasiticus*
1292 por la textura de sus estipes (rugosas) y sus conidios (ligeramente rugosas), como se
1293 ha reportado previamente (Diba *et al.*, 2007; Samson *et al.*, 1995). *A. niger* se identificó
1294 por sus colonias características de color negro y gran diámetro, así como por sus
1295 conidios pequeños (<6 μm de diámetro), producidos en conidióforos que presentan
1296 tanto fiálides como métulas, como lo describen Pitt y Hocking (2009). *A. tamarii* se
1297 identificó por el color café característico de sus colonias en los diferentes medios de
1298 cultivo, así como por sus conidios grandes (>3 μm de diámetro) y de paredes rugosas y
1299 sus conidióforos radiales (Balajee, 2009; Pitt y Hocking, 2009). Se encontraron también
1300 dos especies no identificables de *Aspergillus*, para las cuales no fueron suficientes las
1301 técnicas de identificación disponibles y se requeriría de más pruebas para determinar la
1302 especie.

1303 Se identificaron cultivos de *P. variotii*, *P. citrinum*, *P. funiculosum*, *P. glabrum* y *P.*
1304 *rugulosum* usando solo las características de las colonias, de los penicilios y de las
1305 fiálides. Para estas especies no se utilizó el agar CSN debido a que este carece de la
1306 capacidad de diferenciar especies fuera del subgénero *Penicillium* (Houbraken *et al.*,
1307 2010b).

1308 *P. variotii* se identificó gracias a sus fiálides características: ampuliformes con cuello
1309 alargado curvado de manera excéntrica, así como por sus conidios elípticos, los

1310 cuales distinguen a la especie de otras en el género *Paecilomyces* (Pitt y Hocking,
1311 2009). Estas mismas características fueron reportadas por Houbraken *et al.* (2010a).
1312 *P. citrinum* fue caracterizado por su micelio blanco con conidios color verde opaco,
1313 colonias de ~15 mm de diámetro con reverso color café y fiálides ampuliformes nacidas
1314 en penicilios biverticilados, tal como fue descrito por Pitt y Hocking (2009), quienes
1315 describieron colonias de 12-18 mm de diámetro en MEA y fiálides ampuliformes con 7-
1316 12 μm de longitud. P Houbraken *et al.* (2010b) no reportaron longitud de las fiálides,
1317 pero reportaron conidios color azul o verde grisáceo con colonias color café amarillento
1318 en el reverso en MEA. Las diferencias encontradas en la longitud de las fiálides en los
1319 diferentes estudios podrían atribuirse a los distintos medios de cultivo empleados.

1320 *P. funiculosum* fue identificado debido a su micelio color blanco con conidios color
1321 verde opaco, colonias color verde pálido en el reverso de 38.2 mm de diámetro y
1322 fiálides acerosos nacidos en penicilios terverticilados de 10.0 μm de longitud. Estas
1323 características coinciden con las reportadas por Pitt y Hocking (2009), quienes
1324 reportaron colonias de entre 25-45 mm de diámetro en MEA, conidios color verde
1325 opaco con micelio color blanco a rojizo y fiálides acerosas de entre 9-11 μm , de
1326 longitud. Bandh *et al.* (2011) reportaron colonias color verde en el anverso y cafés en el
1327 reverso, con 39 mm de longitud en MEA y fiálides cilíndricas nacidas en penicilios
1328 terverticilados.

1329 Por otro lado, *P. glabrum* se identificó por sus conidios verdes y colonias con
1330 reverso color café, de 40 mm de diámetro. Las fiálides de esta especie registraron
1331 longitudes de ~8.6 μm , morfología ampuliforme y penicilios biverticilados. Bajo el
1332 microscopio, los conidios presentaron superficie lisa. Estas características coinciden

1333 con las reportadas por Pitt y Hocking (2009) y Barreto *et al.* (2011), quienes indican que
1334 adicionalmente a la morfología macroscópica de las colonias, el distintivo de esta
1335 especie son los conidios con superficie lisa a ligeramente rugosa.

Tabla 13. Identificación de especies de mohos en base a sus características morfológicas.

Especie	Medio de cultivo	Características macroscópicas					Características microscópicas											
		Diámetro de las colonias	Color de las colonias		Reacción al medio		Estipe		Conidióforo	Fiálide			Conidio					
			Anverso	Reverso	Anverso	Reverso	Color	Textura		Forma	Textura	Tamaño (µm)	Forma	Textura	Tamaño (µm)			
<i>Alternaria alternata</i>	PDA	80.0	Negro/café	Café	N/A	Hialino	Lisa	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Obclavada	Rugosa	19.5x8.9			
	MEA	60.0	Negro/café	Café		-	-						-	-	-	-	-	-
	CZD	58.0	Negro/café	Café		-	-						-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus candidus</i>	PDA	30.0	Blanco	Café	N/A	Hialino	Lisa	Globoso	N/A	N/A	N/A	N/A	Esférica	Lisa	2.0			
	MEA	25.0	Blanco	Café		-	-	-					-	-	-	-		
	CZD	33.0	Blanco	Café		-	-	-					-	-	-	-		
<i>Aspergillus niger</i>	PDA	85.0	Negro	Blanco	N/A	Hialino	Ligeramente rugosa	Globoso	N/A	N/A	N/A	N/A	Esférica	Ligeramente rugosa	2.8			
	MEA	36.2	Negro	Blanco		-	-	-					-	-	-	-		
	CZD	48.7	Blanco	Blanco		-	-	-					-	-	-	-		
<i>Aspergillus tamarii</i>	PDA	71.2	Café	Blanco	N/A	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-			
	MEA	59.0	Café	Crema		-	-	-					-	-	-	-		
	CYA	47.5	Café dorado	Crema		Hialino	Lisa	Globoso					Esférica	Rugosa	4.1			
<i>Aspergillus spp.</i>	PDA	70.0	Café olivo	Blanco	N/A	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-			
	MEA	78.0	Blanco	Blanco		Hialino	Rugosidades finas	Globoso					Esférica	Lisa	2.3			
	CZD	80.0	Café	Amarillo		-	-	-					-	-	-			
<i>Aspergillus spp.</i>	PDA	55.0	Café olivo	Blanco	N/A	Hialino	Rugosidades finas	Globoso	N/A	N/A	N/A	N/A	Esférica	Lisa	-			
	MEA	80.0	Blanco	Blanco		-	-	-					-	-	-			
	CZD	65.0	Café	Blanco		-	-	-					-	-	-			

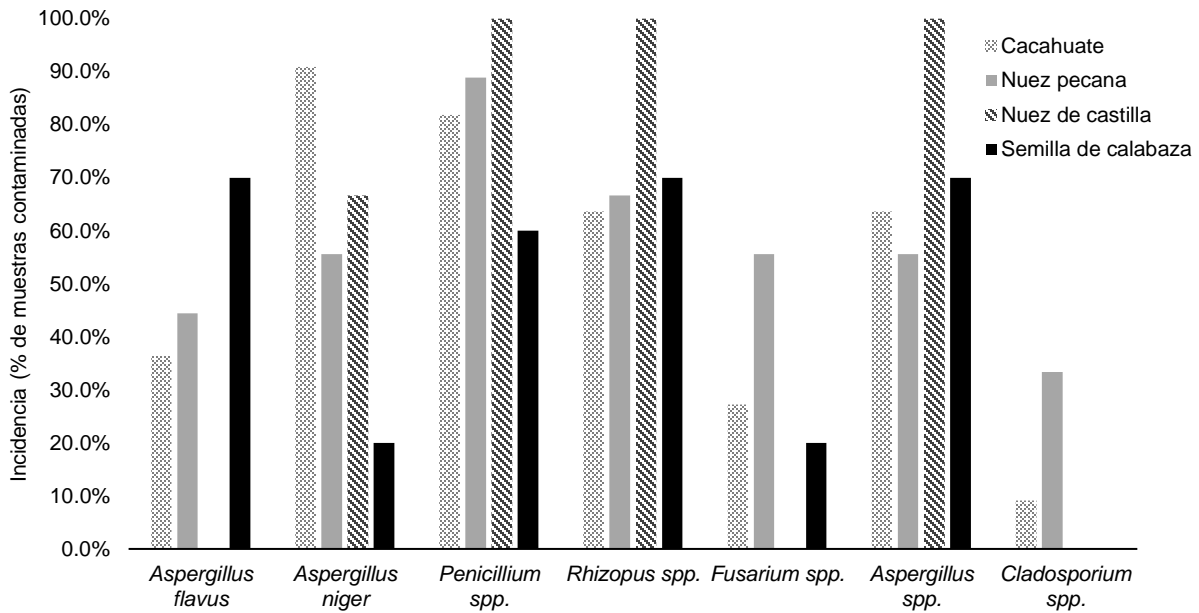
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	PDA	22.0	Verde oscuro	Negro	N/A	-	-	-	N/A	-	-	-	
	MEA	24.0	Verde oscuro	Negro		-	-	-		-	-	-	-
	CZD	22.0	Verde oscuro	Negro		Hialino	Liso	Ramificado		Elipsoidal	Lisa	6.6x2.9	
<i>Epicoccum spp.</i>	PDA	76.0	Negro	Negro	N/A	Café	Liso	N/A	N/A	Esférica	Rugosa	8.1	
	MEA	29.0	Blanco	Blanco		-	-			-	-	-	-
	CYA	62.0	Gris	Blanco		-	-			-	-	-	-
<i>Neosartorya fisheri</i>	PDA	59.1	Blanco	Blanco	N/A	-	-	N/A	N/A	-	-	-	
	MEA	52.6	Blanco	Blanco		-	-			-	-	-	-
	CYA	74.8	Blanco	Amarillo		Hialino	Liso			Globoso	Esférica	Esferoide	2.2
<i>Phoma spp.</i>	PDA	13.9	Café dorado	Café	N/A	-	-	N/A	N/A	-	-	-	
	MEA	12.7	Café dorado	Café		-	-			-	-	-	-
	CYA	16.5	Café dorado	Amarillo		Hialino	Lisa			Piriforme	Cilíndrica	Lisa	1.9
<i>Rhizopus oryzae</i>	PDA	87.4	Blanco	Gris	N/A	Café	Lisa	Globoso	N/A	Elíptica	Estriada	-	
	MEA	87.4	Blanco	Gris		-	-	-		-	-	-	
	CYA	87.4	Blanco	Gris		-	-	-		-	-	-	
<i>Ulocladium spp.</i>	PDA	53.0	Negro	Café	N/A	Café	Lisa	N/A	N/A	Apiculada	Lisa	29.0x7.9	
	MEA	40.0	Negro	Café									
	CZD	45.0	Negro/Café	Café									

1337 Finalmente, *P. rugulosum* se identificó por sus colonias color verde en el anverso
1338 (debido a la producción de conidios) y color café en el reverso, de 12.1 mm de
1339 diámetro, así como sus fiálides de morfología acerosa con ~7.6 µm de longitud nacidas
1340 en penicilios terverticilados. Estas características coinciden con las reportadas por
1341 Sidrim *et al.* (2010), mientras que Pitt y Hocking reportaron fiálides ligeramente más
1342 largas, de entre 8-11 µm de longitud.

1343

1344 **6.2.2. Incidencia de diferentes géneros de moho**

1345 En la Figura 7 se puede observar la incidencia de diferentes especies y géneros de
1346 mohos de importancia en las semillas evaluadas. Los resultados están en concordancia
1347 con otros estudios en la materia, en los que se reporta que *A. niger*, *A. flavus* y
1348 *Penicillium* suelen ser los contaminantes con mayor incidencia en frutos secos
1349 (Adebajo y Diyaolu, 2003; Khosravi, Shokri y Ziglari, 2007, Tournas, Niazi y Kohn.
1350 2015). Destaca la gran incidencia de *Rhizopus*, los cuales no son comúnmente
1351 reportados como contaminantes en frutos secos, pero se sabe que *Rhizopus oryzae* es
1352 un contaminante común en cacahuates y en particular si estos provienen de regiones
1353 tropicales (Pitt y Hocking, 2009).



1354

1355 **Figura 7.** Incidencia de especies de moho importantes en los frutos secos estudiados.

1356 Se encontró una alta incidencia de mohos tóxicos y deterioradores en todos los
 1357 frutos secos. La incidencia de *A. flavus* fue más alta en la pepita de calabaza, en donde
 1358 un 80% de las muestras examinadas presentaron contaminación con este moho. Por
 1359 otro lado, sólo 30% de las muestras de cacahuete examinadas presentaron
 1360 contaminación con *A. flavus*. Las muestras de cacahuete presentaron contaminación
 1361 frecuente con *A. niger*, el cual no está normalmente relacionado con la producción de
 1362 micotoxinas, pero es capaz de deteriorar los frutos secos. La nuez pecana mostró
 1363 incidencia similar de *A. flavus* y *A. niger*. Se sabe que estas dos especies de moho son
 1364 antagonistas entre sí y por lo tanto rara vez se encuentran juntas en una muestra. En
 1365 este caso, solo 5 de las 30 muestras analizadas presentaron contaminación con ambas
 1366 especies, mientras que 6 muestras no presentaron contaminación con ninguna de ellas.

1367 La incidencia de especies del género *Penicillium* fue de más del 50% en cacahuete,
1368 pepita y nuez pecana. Esta alta incidencia era de esperarse debido a que *Penicillium* es
1369 un género cosmopolita de mohos. Muchas especies de este género son capaces de
1370 producir micotoxinas, por lo que su presencia en tan alta incidencia es causa de
1371 preocupación.

1372 La incidencia de especies de *Rhizopus*, principalmente representadas por *R.*
1373 *oryzae*, también fue mayor del 50% en cacahuete, pepita y nuez pecana. *R. oryzae* es
1374 un contaminante común en granos de regiones tropicales y es capaz de deteriorar
1375 alimentos almacenados inadecuadamente. Sin embargo, no se sabe de alguna cepa
1376 que sea toxígena.

1377 Las especies de moho encontradas en cacahuates fueron similares a las que
1378 reportaron otros autores. *A. flavus* se ha reportado en cacahuates tostados de
1379 Sudáfrica (Adjetuni *et al.*, 2020) y Bangladesh (Khandaker *et al.*, 2019a; 2019b). En
1380 cacahuates crudos se ha reportado en Benín (Adjou *et al.*, 2012), Pakistán (Abbas *et*
1381 *al.*, 2019) y Turquía (Gürses, 2006). Estos mismos estudios han reportado también la
1382 presencia de *A. niger*, *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria alternata*, *Rhizopus*
1383 spp., *Cladosporium* spp. *Mucor* spp., entre otras especies y géneros. En general, la
1384 micobiota de los cacahuates se reporta como muy variada, pero siempre con una gran
1385 incidencia de mohos del género *Aspergillus*, en particular de *A. flavus* y *A. niger*.

1386 Las especies de moho encontradas en muestras de nuez pecana fueron similares a
1387 las encontradas por Valle-García *et al.* (2019) en muestras de nuez del estado de Rio
1388 Grande do Sul (Brasil), aunque la frecuencia con la que se presentaron especies en
1389 particular fue diferente. Estos autores reportaron ausencia de *A. flavus* en las muestras

1390 analizadas, caso contrario a lo encontrado en este estudio. Por otro lado, Valle-García
1391 *et al.* (2019) también reportaron una predominancia de otras especies del género
1392 *Aspergillus*. En las muestras analizadas en este estudio se encontró una incidencia de
1393 especies de *Penicillium* más alta que en las reportadas por Valle-García *et al.* (2019).
1394 Finalmente, tanto en este estudio como en el de Valle-García *et al.* (2019) se encontró
1395 una incidencia de *Cladosporium* spp. de alrededor del 30%. Este género de mohos es
1396 un patógeno común del árbol pecanero y se ha reportado con anterioridad en nuez
1397 pecana mexicana (Walker *et al.*, 2016).

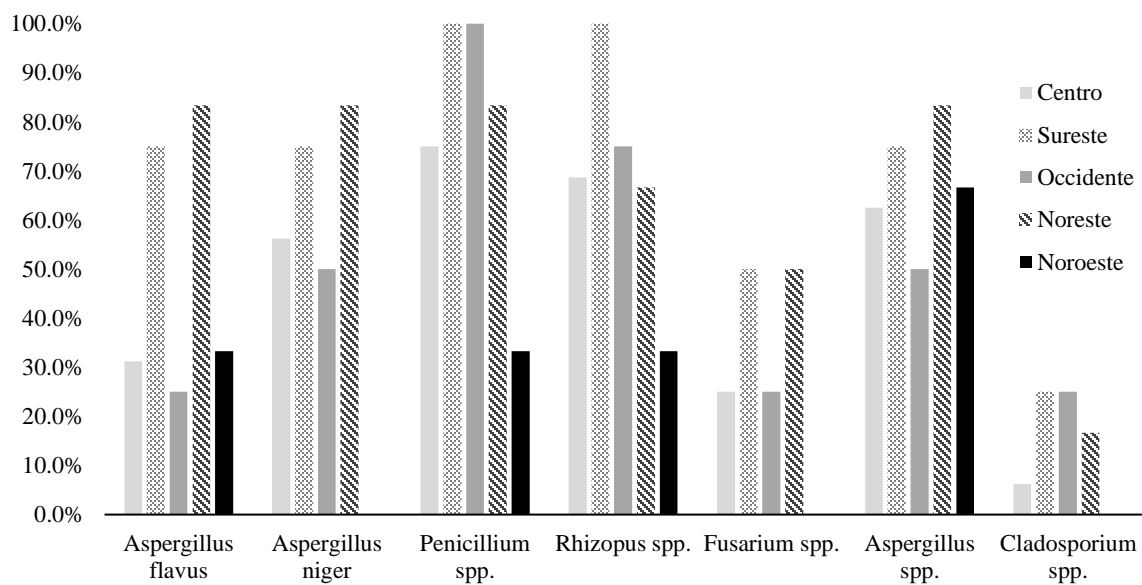
1398 Tal como ocurre con otras características de la semilla de *Cucurbita argyrosperma*
1399 la micobiota de la semilla se ha estudiado poco. Se ha reportado que los mohos
1400 fitopatógenos *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* pueden causar
1401 descomposición del fruto de *C. argyrosperma* (Díaz Nájera *et al.*, 2015; 2018); sin
1402 embargo, no se ha hecho hasta la fecha ningún estudio sobre la ecología micológica de
1403 las semillas de esta especie de calabaza. Es posible asumir que la micobiota de las
1404 semillas de *C. argyrosperma* es similar a la de las semillas de otras cucúrbitas, como *C.*
1405 *pepo*. Rahim *et al.* (2018) han reportado la presencia de más de 100 especies
1406 diferentes de moho en las semillas de *C. pepo*, entre las cuales están las encontradas
1407 en este estudio. De manera similar a los demás frutos secos evaluados en este estudio,
1408 las semillas de *C. pepo* presentaron alta incidencia de mohos del género *Aspergillus*.
1409 En particular, la alta incidencia de *Aspergillus flavus* (encontrada en un 70% de las
1410 muestras evaluadas) es causa de preocupación, ya que la incidencia fue mucho más
1411 alta que en las muestras de cacahuete y nuez pecana.

1412 A pesar de la alta incidencia de contaminación con mohos la mayor parte de las
1413 muestras analizadas en este estudio presentaron niveles de contaminación con mohos
1414 por debajo de lo permitido por la norma oficial mexicana correspondiente. Esto indicaría
1415 que, en general, los frutos secos en venta en México son seguros para su consumo a
1416 pesar de estar contaminados con mohos. Sin embargo, se debe de cuidar que las
1417 condiciones de transporte y almacenamiento de estos productos sean adecuadas, ya
1418 que las esporas de moho pueden desarrollarse e incrementar los niveles de
1419 contaminación si las circunstancias son adecuadas. También se debe de tomar en
1420 cuenta que los datos presentados en este estudio pertenecen en su mayor parte (por el
1421 número de muestras analizadas) a la región centro del país, la cual contiene algunos
1422 de los estados más urbanizados, así como la Megalópolis del Valle de México, una de
1423 las áreas urbanas más grandes y pobladas del mundo. Es sabido que los alimentos
1424 provenientes de las áreas rurales son más susceptibles a presentar mala calidad
1425 microbiológica que aquellos provenientes de las áreas urbanas (Zuki-Orozco *et al.*,
1426 2018) y los resultados presentados en este estudio podrían reflejar un sesgo en ese
1427 sentido en los datos.

1428 **6.2.3. Variación regional en la micobiota de los frutos secos.**

1429 Se observó variación en la micobiota de los frutos secos en diferentes regiones,
1430 como se muestra en la Figura 8. Cabe resaltar que *A. flavus*, *A. niger* y *Fusarium* spp.
1431 fueron más prevalentes en las muestras de las regiones Noreste y Sureste, mientras
1432 que otras especies de moho mostraron una distribución más uniforme en las distintas
1433 regiones. Las variaciones regionales en la micobiota de los frutos secos se han

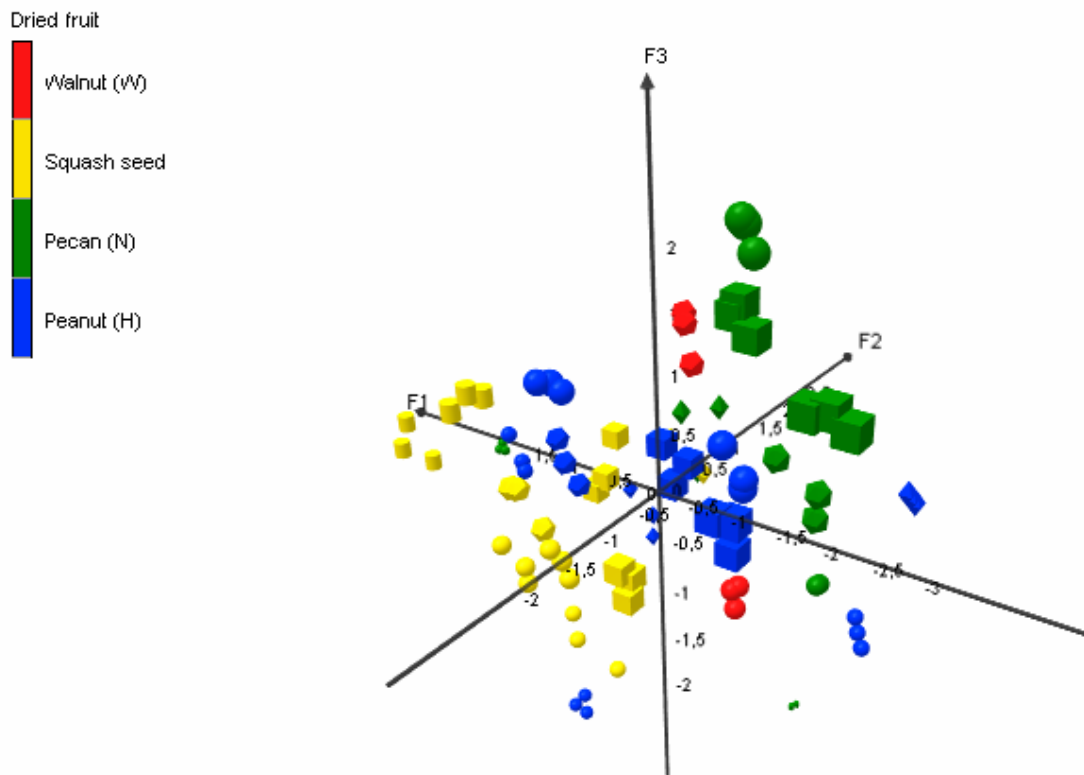
1434 reportado en estudios realizados en otros países y se ha demostrado que están
 1435 relacionadas con el clima regional, en particular a la temperatura y humedad relativa
 1436 (Aveling *et al.*, 2020; Fatahinia *et al.*, 2018; Jayashree y Wesley, 2019; Temperini *et al.*,
 1437 2019). Lugares y estaciones con alta humedad relativa presentan una mayor carga
 1438 fúngica, así como mayor diversidad, cuando se comparan con lugares secos (Fatahinia
 1439 *et al.*, 2018). La influencia del clima también se puede observar en este estudio: la
 1440 incidencia de especies de moho en la región Noroeste, la más árida de las cinco
 1441 regiones en el estudio, muestra una menor incidencia de todas las especies de moho,
 1442 excepto por especies de *Aspergillus* distintas de *A. flavus* y *A. niger*.



1443
 1444 **Figura 8:** Incidencia de algunas especies importantes de moho en los frutos secos del
 1445 estudio, en las diferentes regiones de México.

1446 **6.2.4. Análisis de componentes principales**

1447 En la Figura 9 se muestra un gráfico de los tres principales componentes (F_1 , F_2
1448 y F_3) obtenidos como resultado del análisis de componentes principales (ACP). Se
1449 obtuvo un coeficiente de correlación cofenética de 0.98, indicando que los tres
1450 componentes principales seleccionados representan una reducción adecuada en el
1451 número de variables para este análisis. Entre los tres factores se explica un 84.4% de
1452 la variabilidad en los datos, siendo cada variable responsable por 38.6, 28.6 y 17.2% de
1453 la variabilidad, respectivamente.



1454 **Figura 9.** Gráfico de dispersión en los ejes de los componentes principales F_1 , F_2 y F_3 . Las
1455 figuras corresponden a cada una de las regiones en la siguiente manera: centro (esfera),
1456 noreste (cubo), noroeste (cilindro), sureste (octaedro) y occidente (icosaedro).
1457

1458 A partir de los resultados del ACP se puede observar claramente que el tipo de
 1459 fruto seco es un predictor más confiable para las variables analizadas que la región.
 1460 Esto es de esperarse, pues hay mayor similitud entre dos frutos secos de la misma
 1461 especie, pero de diferentes regiones, que entre dos frutos secos de diferente especie,
 1462 pero de la misma región. Las pepitas de calabaza y las nueces pecanas mostraron
 1463 agrupamiento en áreas distintas del espacio [F_1 , F_2 , F_3], en particular sobre el plano [F_1 ,
 1464 F_2]. Esto se debió a la correlación de F_1 y F_2 con el contenido de mohos y levaduras
 1465 (Tabla 14), donde las pepitas de calabaza mostraron los valores más ampliamente
 1466 distribuidos de todos los frutos secos evaluados.

Tabla 14. Correlaciones entre las variables y los componentes principales.

	F_1	F_2	F_3
Actividad de agua (aw)	0.703	0.375	-0.436
Contenido de humedad (%H)	0.693	-0.427	-0.269
Recuento de mohos y levaduras (UFC/g)	0.750	-0.073	0.643
Número de especies identificadas.	0.096	0.902	0.106

* El signo indica una correlación directa (+) o indirecta (-) entre la variable y el componente principal.

1467

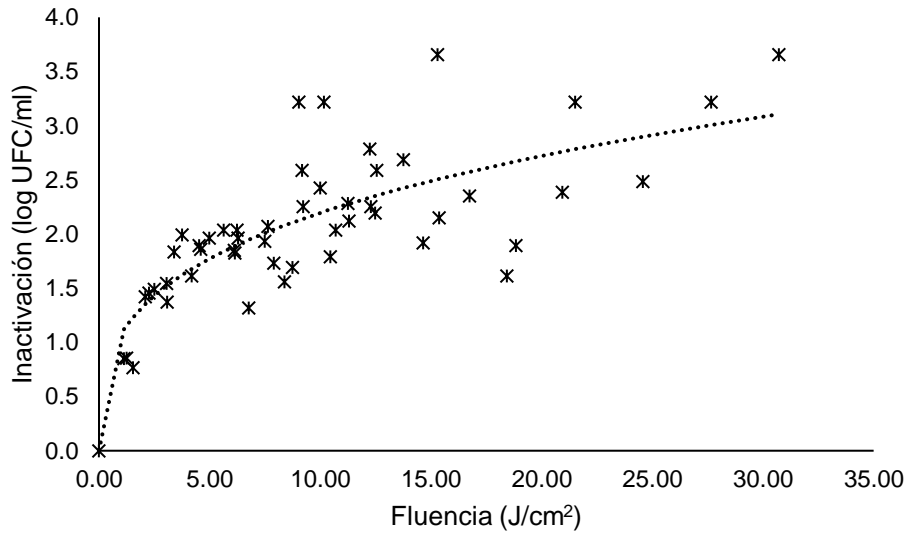
1468 **6.3. Tratamientos con pulsos de luz de alta intensidad**

1469 En primera instancia, se realizaron tratamientos con PLAI de manera exploratoria para
 1470 determinar las dosis eficaces contra los microorganismos de interés. Los tratamientos
 1471 exploratorios se realizaron tanto en las semillas como en medio de cultivo. La

1472 inoculación en semillas se realizó por medio de dos métodos: inoculación en seco e
1473 inoculación por gota. Los niveles de inoculación obtenidos por medio de la inoculación
1474 en seco se muestran en la Tabla 5. A continuación, se muestran y discuten los
1475 resultados de estas pruebas.

1476 **6.3.1. Pruebas in-vitro**

1477 Se probó la resistencia de diferentes especies de moho en placas de agar DRBC. Los
1478 microorganismos se inocularon a una concentración de $\sim 3 \log$ UFC/ml y se expusieron
1479 a diferentes intensidades de tratamiento con PLAI (Tabla 6), la cual se controló
1480 variando la distancia de la lámpara hasta las muestras. Se hicieron pruebas con tres
1481 diferentes especies de moho: *A. flavus*, *A. niger*, y *Penicillium* spp. y cada una mostró
1482 diferentes niveles de resistencia a los tratamientos con PLAI. La mayor resistencia la
1483 mostró *A. niger*, para el cual no hubo inactivación completa en ninguno de los niveles
1484 de tratamiento. Por otro lado, se logró la inactivación completa de *A. flavus* y
1485 *Penicillium* spp. a 5.64 J/cm^2 y 6.24 J/cm^2 , respectivamente. Las curvas de inactivación
1486 de los mohos se pueden ver en las figuras Figura **10** a Figura **12**.

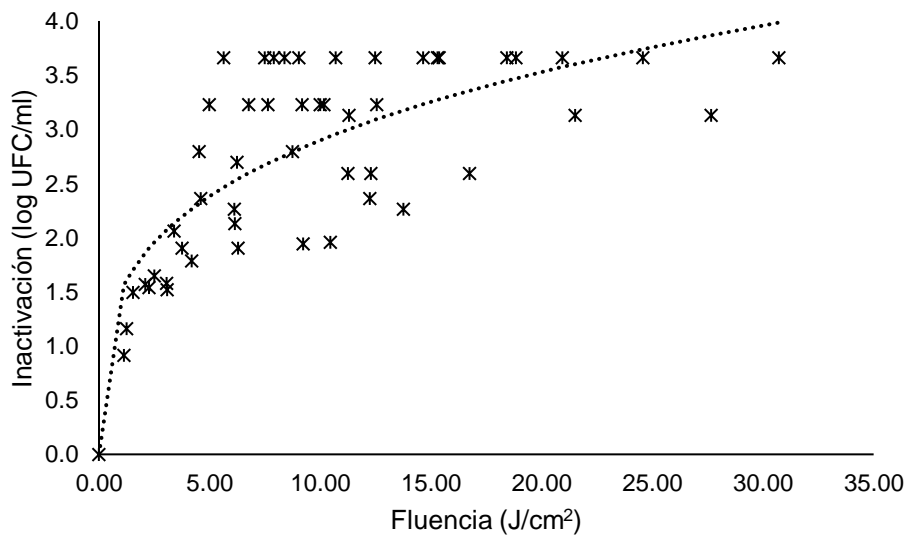


1487

1488

Figura 10. Curva de inactivación de *A. niger* ajustada al modelo de Weibull.

1489

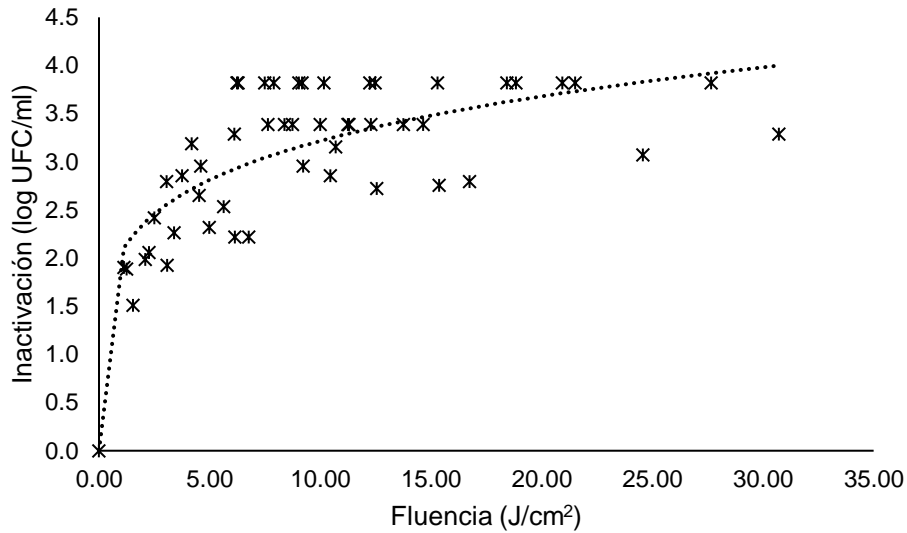


1490

1491

Figura 11. Curva de inactivación de *A. flavus* ajustada al modelo de Weibull.

1492



1493

1494 **Figura 12.** Curva de inactivación de *Penicillium* spp. ajustada al modelo de Weibull

1495

Como se puede ver en las figuras, *A. niger* presentó la mayor resistencia a los

1496

tratamientos, mientras que *A. flavus* presentó la menor resistencia. De acuerdo con las

1497

mediciones de temperatura (Figura 13), la inactivación probablemente se debió a la

1498

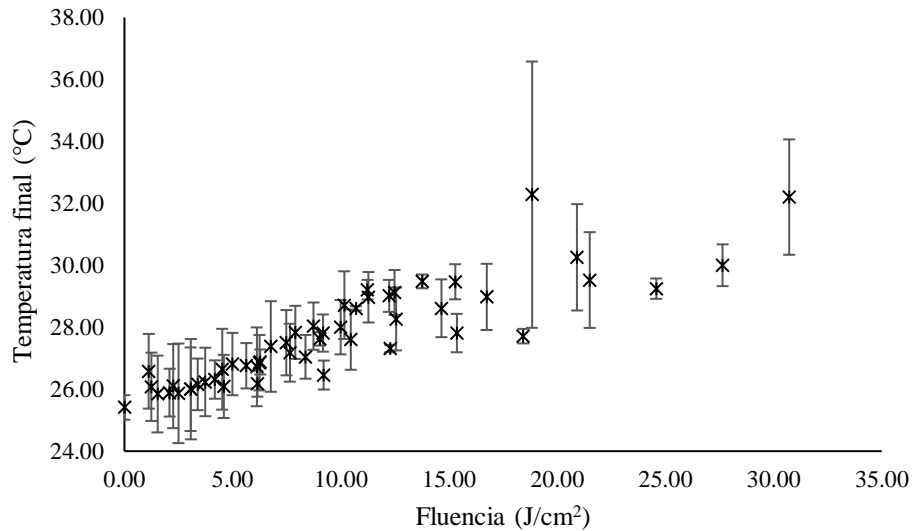
exposición a los PLAI, ya que la temperatura de las muestras se mantuvo por debajo

1499

de los 34° C para la mayoría de las pruebas. La temperatura inicial de las muestras fue

1500

de $24.8 \pm 0.8^\circ \text{C}$, con un ΔT máximo de 8.01°C a 18.83 J/cm^2 .



1501

1502 **Figura 13.** Mediciones de temperatura para la inactivación de mohos *in-vitro* a
 1503 diferentes fluencias de PLAI.

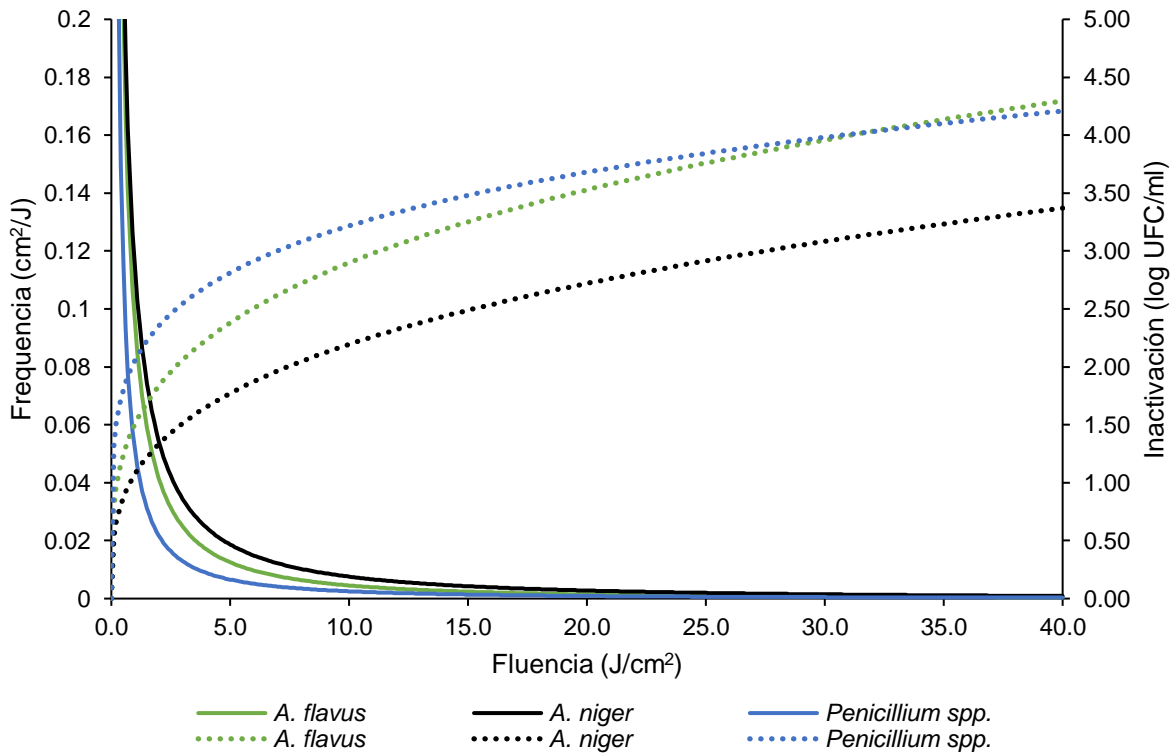
1504 En la Tabla 15 se muestran los parámetros obtenidos para los ajustes al modelo
 1505 de Weibull de los diferentes mohos en las pruebas *in-vitro*. También se muestran los
 1506 valores de R^2 y de la raíz del error cuadrático medio (RMSE) como medidas del ajuste
 1507 del modelo a los datos experimentales. Los valores de las pruebas de ajuste permiten
 1508 ver que el modelo es adecuado para predecir el comportamiento microbiano ante la
 1509 exposición a los PLAI. Los valores del parámetro $n < 1$, lo cual indica que las curvas de
 1510 inactivación presentan concavidad hacia abajo. Adicionalmente, como se puede ver en
 1511 la Figura 14, las curvas de frecuencia de inactivación no presentaron moda, lo cual
 1512 indica que la inactivación de microorganismos comenzó desde los tratamientos menos
 1513 intensos. Los valores del coeficiente de sesgo muestran que la inactivación esta
 1514 ligeramente sesgada hacia la derecha en todos los casos, lo cual indica que hay una
 1515 tendencia de inactivación de los conidios en las fluencias más bajas. Los valores altos

1516 de varianza indican que hay una amplia distribución de resistencia entre los conidios
 1517 individuales. Los valores de la media de la frecuencia muestran nuevamente la mayor
 1518 resistencia de *A. niger* a los tratamientos con PLAI.

Tabla 15. Parámetros del modelo de Weibull para las pruebas con PLAI *in-vitro*.

Especies de moho	Parámetros del modelo de Weibull						R ²	RMSE
	b	n	Moda	Media	Varianza	Sesgo		
<i>A. niger</i>	1.08	0.31	N/A	2.83	300.12	0.055	0.80	0.42
<i>A. flavus</i>	1.51	0.28	N/A	6.38	1046.07	0.663	0.79	0.56
<i>Penicillium</i> spp.	2.06	0.19	N/A	3.79	4418.28	0.001	0.80	0.47

1519
 1520 El comportamiento de los microorganismos en este estudio fue similar al
 1521 reportado por otros autores en estudios similares. Por ejemplo, Romero Bernal *et al.*
 1522 (2019) reportaron un comportamiento similar al exponer esporas de *Botrytis cinerea* a
 1523 tratamientos con PLAI sobre la superficie de fresas. Estos autores reportaron una curva
 1524 de frecuencia sin moda con un fuerte sesgo a la derecha y una varianza alta, de
 1525 manera similar a lo visto en este estudio. Adicionalmente, Romero Bernal *et al.* (2019)
 1526 también reportaron valores de $n < 1$.
 1527



1528

1529 **Figura 14.** Curvas de frecuencia para el modelo de Weibull de los mohos evaluados en
 1530 este estudio. Las líneas punteadas representan el modelo de Weibull, las líneas
 1531 continuas representan las curvas de frecuencia.

1532 Por otro lado, Kramer et al. (2017) probaron la eficacia de los tratamientos con
 1533 PLAI sobre diferentes microorganismos en una superficie de gel. En dicho estudio, la
 1534 mayoría de los microorganismos evaluados (incluyendo a los mohos *A. brasiliensis* y *A.*
 1535 *niger*) presentaron valores de $n > 1$, indicando un incremento exponencial de la eficacia
 1536 del tratamiento al incrementar la fluencia (concavidad hacia abajo).

1537 Los diferentes resultados obtenidos por estos autores son un ejemplo del efecto que
 1538 tiene la geometría de la superficie sobre la que se está realizando el tratamiento con
 1539 PLAI. Es evidente que los microorganismos tratados sobre la superficie uniforme de un

1540 gel presentaron una menor resistencia al tratamiento que los microorganismos tratados
1541 sobre la superficie irregular de una fruta.

1542 **6.3.2. Pruebas con inoculación en seco**

1543 Para las pruebas con inoculación en seco se obtuvieron niveles iniciales de
1544 contaminación en las semillas mayores a 5 log CFU/g, los cuales fueron mucho
1545 mayores que los niveles originales de inoculación en las semillas (~2 log CFU/g). En la
1546 Figura 15 se muestran imágenes del proceso de inoculación, así como de las semillas
1547 inoculadas. Como se puede ver, la cobertura de la superficie de la semilla fue total y
1548 homogénea en todos los casos.



1549

1550 **Figura 15.** Frutos secos durante el proceso de inoculación en seco

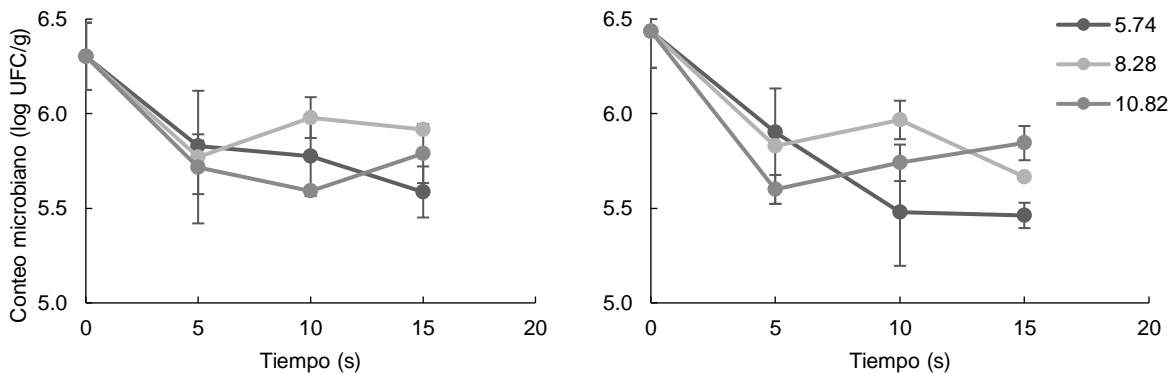
1550

1551 Para las pruebas con PLAI se utilizaron solamente cacahuates y pepitas de
1552 calabaza, cuyas superficies son las menos irregulares de los frutos secos
1553 seleccionados. Las irregularidades en la superficie de los alimentos tienen un efecto
1554 negativo sobre la eficacia de los tratamientos con PLAI, por lo que se descartaron los
1555 tratamientos sobre las nueces de castilla y pecanas.

1556 El nivel de inoculación en los frutos secos alcanzado para las pruebas en seco
1557 fue relativamente alto, lo cual se vio reflejado en los resultados de las pruebas. Otros
1558 autores han reportado un efecto significativo del nivel de contaminación sobre la

1559 efectividad del tratamiento, por ejemplo, Aron Maftei *et al.* (2014) encontraron que un
1560 nivel de inoculación de 5.45 log CFU/ml se logró un nivel de inactivación menor que
1561 con un inóculo inicial de 4.34 log CFU/ml.

1562 En la Figura 16 se muestran de manera gráfica los resultados de las pruebas con
1563 PLAI a tres diferentes distancias de la lámpara (5.74, 8.28 y 10.82 cm), tanto para
1564 cacahuate como para pepita de calabaza, inoculadas con ~6 log UFC/g de *Aspergillus*
1565 *flavus*. Se puede ver que en todos los casos se logró una inactivación de < 1 log
1566 UFC/g, resultando un tratamiento con poca eficacia.



1567
1568 **Figura 16.** Inactivación de *Aspergillus flavus* en cacahuate (derecha) y pepita de calabaza
1569 (izquierda) a tres distancias de la lámpara (5.74, 8.28 y 10.82 cm).

1570 La poca eficacia del tratamiento en estos casos se puede atribuir tanto al nivel de
1571 inoculación, como a la geometría de los frutos secos. También es posible que se
1572 requiriera un mayor tiempo de tratamiento para lograr una inactivación más eficaz. En
1573 ambos casos, la dosis máxima de PLAI que se administró a los frutos secos fue de 38.2
1574 J/cm², de acuerdo con el manual de usuario del equipo, la cual está por encima de los
1575 12 J/cm² citados como máximo permitido en las regulaciones de la FDA sobre

1576 tratamientos con PLAI (Pulsed Light for the Treatment of Foods, 1996). Sin embargo,
1577 estas dosis se encuentran aún por debajo de las dosis reportadas como eficaces en
1578 alimentos sólidos por otros autores. Por ejemplo, Zenklusen *et al.* (2018) lograron una
1579 inactivación máxima de *A. flavus* en malta de cebada de $< 2 \log$ UFC/g, con una
1580 intensidad de tratamiento de 89.6 J/cm^2 , mientras que Can *et al.* (2014) lograron una
1581 inactivación de $1.32 \log$ UFC/g de *P. roqueforti* en rebanadas de queso con una
1582 intensidad de tratamiento de 53.4 J/cm^2 . Considerando estos resultados, es posible que
1583 los tratamientos efectuados en esta fase de la investigación fueran demasiado ligeros
1584 como para lograr una mayor inactivación.

1585 **6.3.3. Pruebas con inoculación por gota**

1586 Tomando en consideración los resultados obtenidos en las pruebas con inoculación en
1587 seco, se realizaron cambios en las dosis para las pruebas con inoculación por gota. Se
1588 incrementaron las dosis máximas de tratamiento con PLAI a fin de obtener una
1589 inactivación más eficaz de los microorganismos (Tabla 8). Los resultados de estas
1590 pruebas se pueden ver en las figuras Figura **17** a Figura **20**. En dichas figuras es
1591 posible observar que se incrementó el tiempo de aparición de los mohos de 2 días en
1592 las pruebas sin tratamientos a 3 días o más en las pruebas desde 20 s de tratamiento.
1593 Los tratamientos más largos retrasaron más el crecimiento de los mohos, hasta por 7
1594 días. Los tratamientos se realizaron por hasta 100 s en los cacahuates y hasta 60 s en
1595 las pepitas de calabaza. Se encontró que tratamientos mayores a los 60 s en la pepita
1596 provocaban daño considerable al fruto seco, llegando hasta la ignición de la semilla. En
1597 las figuras Figura **19** y Figura **20** se puede ver el daño causado a las pepitas de

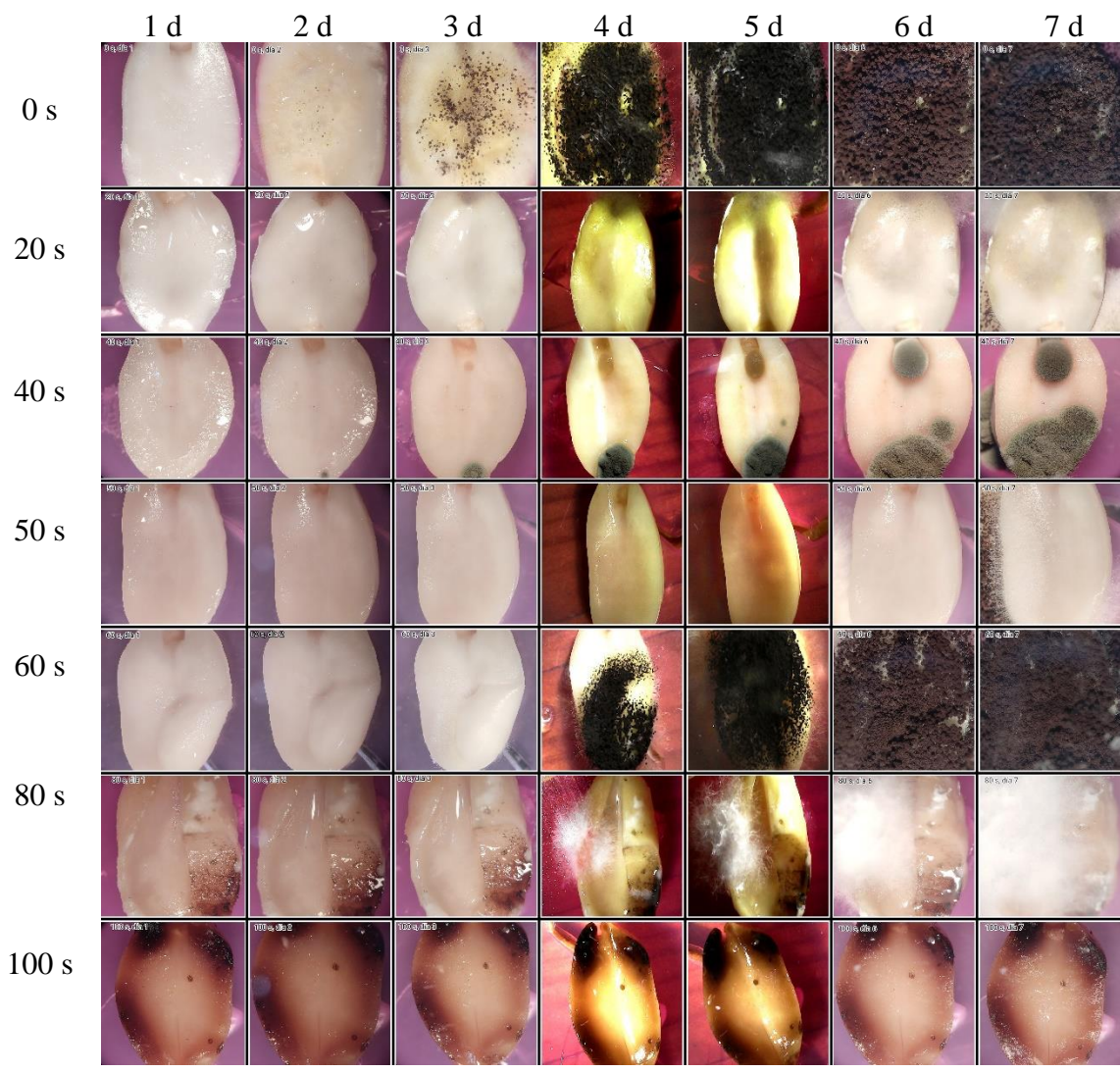
1598 calabaza por los tratamientos con PLAI. Se puede ver que a partir de los 40 s
 1599 comienzan a aparecer manchas negras en la superficie, así como decoloración. Por
 1600 otro lado, el daño provocado a la superficie de los cacahuates fue menor. En dicho fruto
 1601 seco, se observaron quemaduras superficiales solo a los 100 s de tratamiento, y la
 1602 decoloración se hizo aparente solo a partir de los tratamientos de 80 s, como se puede
 1603 ver en las figuras Figura 17 y Figura 18. No se observó ignición de los cacahuates a
 1604 ningún nivel de tratamiento probado en este estudio.

1605 En la Tabla 16 se pueden encontrar los coeficientes resultantes de los modelos
 1606 aplicados a las pruebas con inoculación por gota, tanto del modelo logístico como del
 1607 modelo de tiempo de vida.

Tabla 16. Coeficientes del modelo logístico y modelo de tiempo de vida.

<i>Variable o interacción</i>	<i>Coeficiente del modelo logístico</i>	<i>Coeficiente del modelo de tiempo de vida</i>
Constante	-4.046	3.49582
Especie de moho	1.216	0.352415
Tipo de fruto seco	2.135	1.26228
Tiempo de incubación	0.7549	N/A
Tiempo de tratamiento	0.1587	1.63348
Especie de moho-Tipo de fruto seco	-1.093	N/A
Especie de moho-tiempo de tratamiento	-0.03235	0.220807
Tipo de fruto seco-tiempo de tratamiento	-0.1515	0.919477
Tiempo de tratamiento-tiempo de incubación	-0.00468	N/A

1608
 1609 Las ecuaciones obtenidas para cada modelo se utilizaron para predecir el
 1610 comportamiento de los microorganismos bajo diferentes niveles de tratamiento con
 1611 PLAI.



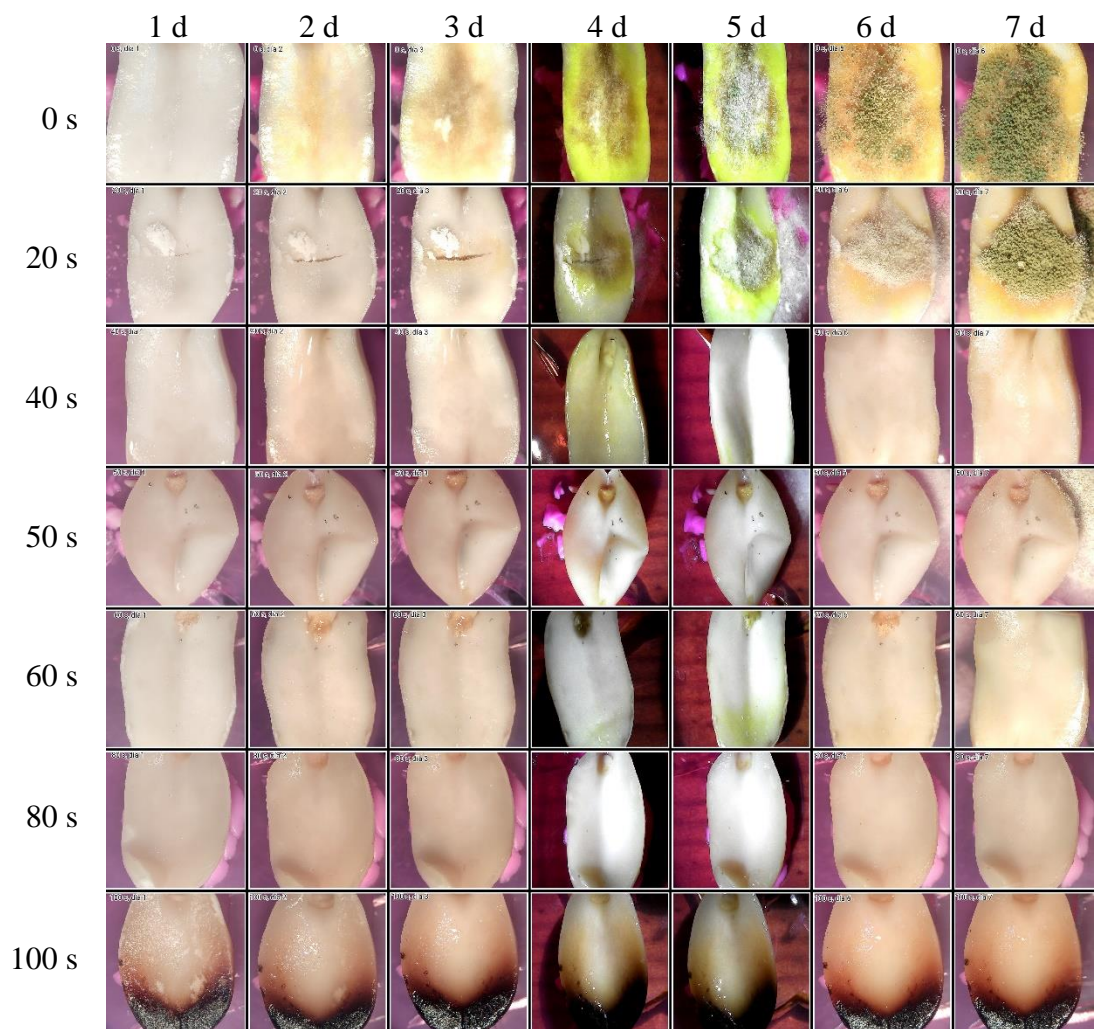
1612

1613

Figura 17. Progreso del crecimiento de *A. niger* en cacahuate durante 7 días tras la

1614

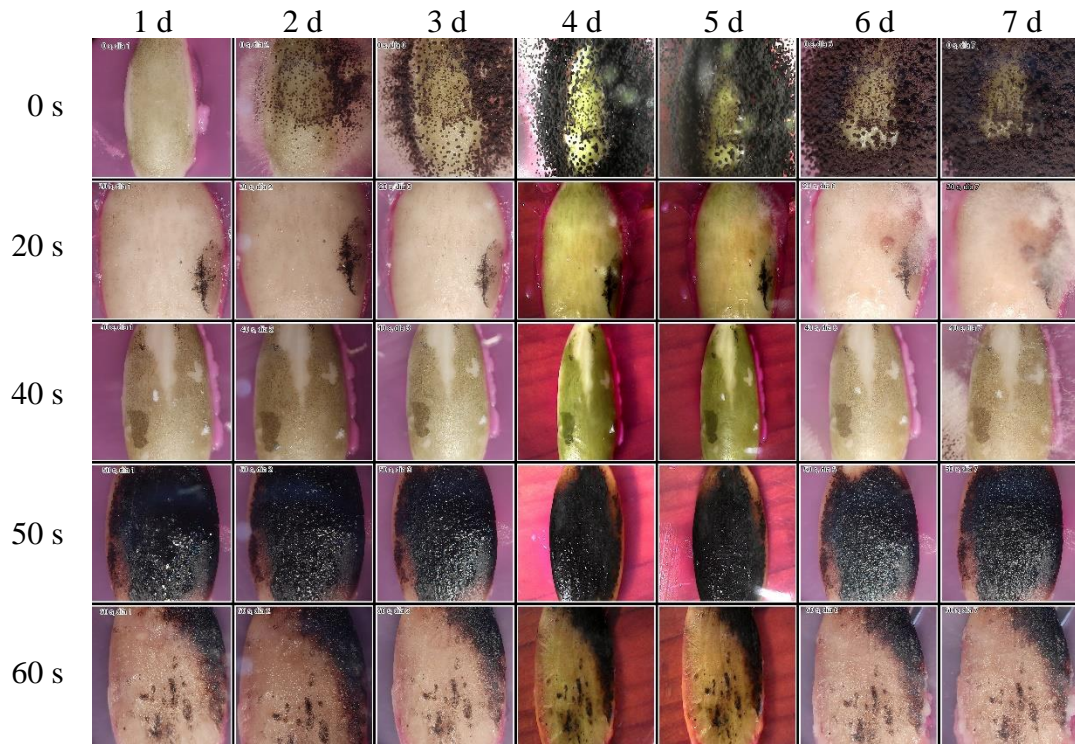
exposición a los tratamientos con PLAI.



1615

1616 **Figura 18.** Progreso del crecimiento de *A. flavus* en cacahuate durante 7 días tras la

1617 exposición a los tratamientos con PLAI.

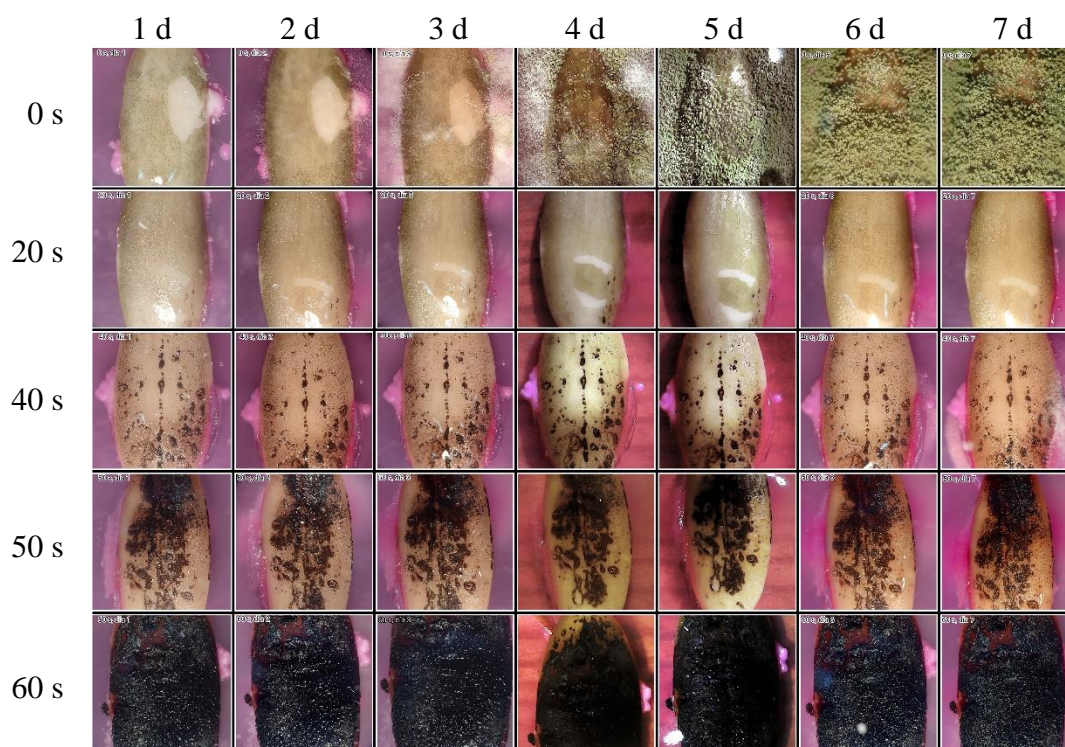


1618

1619 **Figura 19.** Progreso del crecimiento de *A. niger* en pepita de calabaza durante 7 días

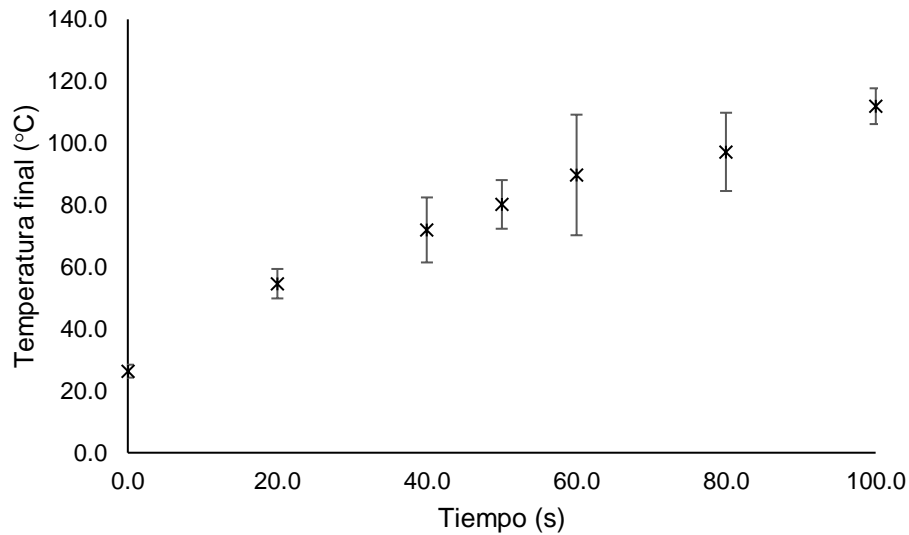
1620

tras la exposición a los tratamientos con PLAI.



1621
 1622 **Figura 20.** Progreso del crecimiento de *A. flavus* en pepita de calabaza durante 7 días
 1623 tras la exposición a los tratamientos con PLAI.

1624 Se midieron las temperaturas superficiales de los frutos secos tras las pruebas
 1625 utilizando un termómetro infrarrojo. A diferencia de las pruebas in-vitro, los incrementos
 1626 de temperatura en las superficies de los frutos secos fueron considerables debido a la
 1627 longitud de los tratamientos (Figura 21). Se registró una temperatura máxima de
 1628 $111.9 \pm 5.8^\circ \text{C}$ con los tratamientos de 100 s de duración, resultando en un ΔT de
 1629 $81.2 \pm 11.1^\circ \text{C}$.



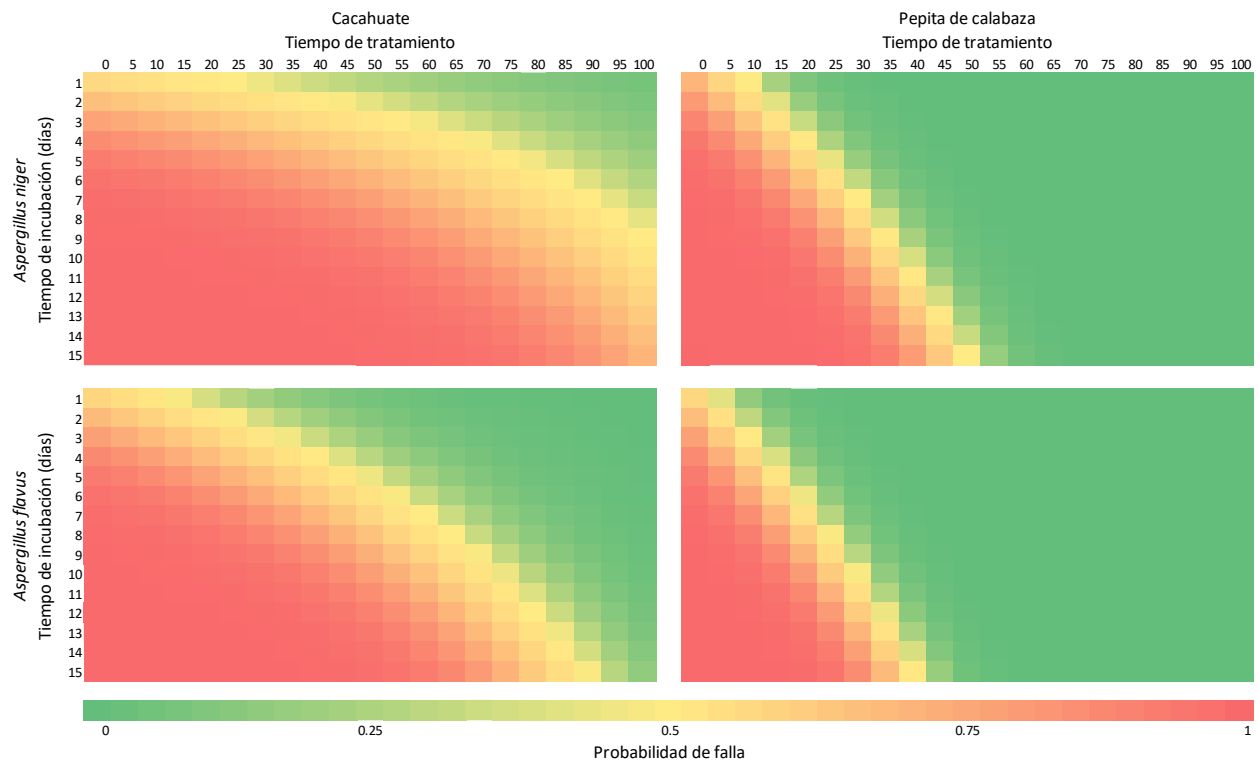
1630

1631 **Figura 21.** Temperaturas de las muestras de frutos secos tras los tratamientos con
 1632 PLAI. Las barras muestran la desviación estándar.

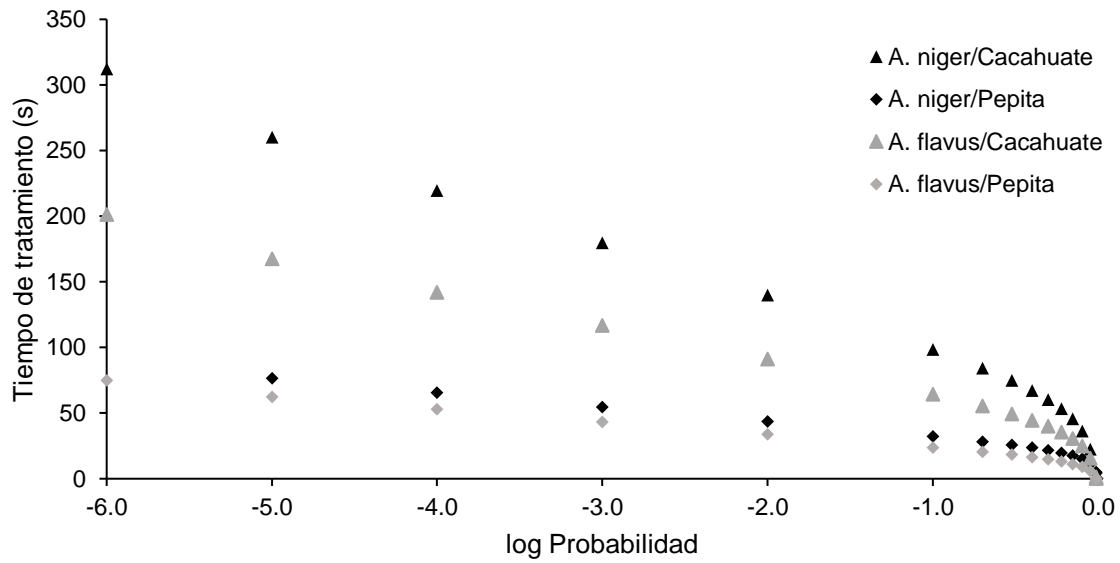
1633 En la Figura 22 se pueden ver los resultados de la modelación logística de la
 1634 inactivación de microorganismos en la superficie de los frutos secos. La Figura 22
 1635 muestra los mapas de calor correspondientes a la probabilidad de crecimiento de un
 1636 moho tras un determinado tratamiento con PLAI. De manera similar a lo encontrado en
 1637 los tratamientos *in-vitro*, se puede ver que *A. niger* presenta una mayor resistencia al
 1638 tratamiento con PLAI que *A. flavus*. Adicionalmente, se puede ver que para ambos
 1639 mohos los tratamientos resultaron más efectivos sobre las semillas de calabaza que
 1640 sobre los cacahuates. Esto podría atribuirse a la diferencia en la geometría superficial
 1641 de ambos frutos secos.

1642 Adicionalmente, en la Figura 23 se puede observar un gráfico indicando la dosis
 1643 de PLAI necesaria para obtener una determinada probabilidad de falla para cada
 1644 combinación de mohos y frutos secos tras 7 días de incubación. En esta gráfica es

1645 evidente que los tratamientos con PLAI son considerablemente más efectivos en la
1646 superficie de las pepitas de calabaza, mientras que para la superficie de cacahuates,
1647 se necesitan tratamientos severos para reducir la probabilidad de falla a 7 días.
1648



1649 **Figura 22.** Mapa de probabilidad de falla para los tratamientos con PLAI en frutos
1650 secos inoculados por gota.
1651
1652



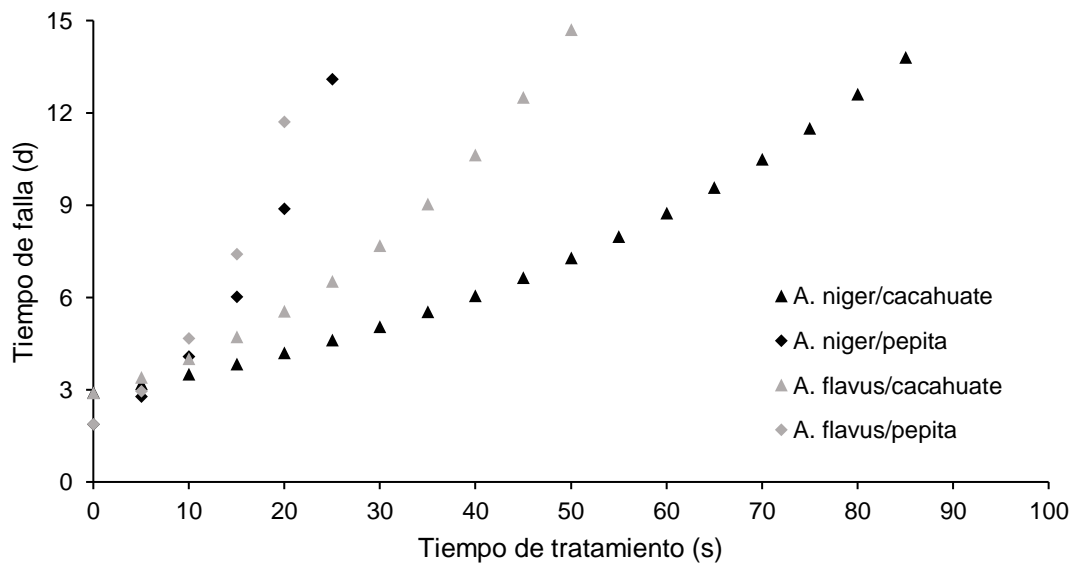
1653

1654

Figura 23. Tiempos de tratamiento necesarios para reducir la probabilidad de crecimiento de distintas combinaciones de mohos y frutos secos tras 7 días de incubación.

1655

1656



1657

1658

Figura 24. Tiempo de falla para diferentes combinaciones de mohos y frutos secos en función del tiempo de tratamiento con PLAI.

1659

1660 El modelo de tiempo de falla arrojó resultados similares al modelo logístico,
1661 mostrando que en el caso de cacahuete se necesitan tratamientos severos para
1662 aumentar el tiempo de falla por encima de los 7 días, en particular para *A. niger*. Los
1663 resultados de estos modelos indicarían que los tratamientos con PLAI son más
1664 efectivos en las pepitas que en los cacahuates y también que son suficientemente
1665 efectivos para reducir la probabilidad de crecimiento de *A. flavus*.
1666

1667 **7. Conclusiones**

1668 A lo largo de este proyecto se estudiaron diversas características fisicoquímicas y
1669 microbiológicas de algunos frutos secos. Se tomaron muestras de frutos secos de
1670 diversos puntos de la República Mexicana con el objetivo de evaluar la distribución de
1671 la contaminación de mohos en los frutos secos evaluados, así como buscar una
1672 relación entre las cualidades fisicoquímicas de los frutos secos, las características
1673 ambientales de la región y la contaminación por mohos. Se lograron obtener muestras
1674 de varios estados de la república, representando cada una de las regiones del país, y
1675 los análisis arrojaron diferencias en las especies de mohos encontradas en las
1676 diferentes regiones asociadas con las condiciones atmosféricas de cada región. Los
1677 análisis también arrojaron relaciones entre las características fisicoquímicas de los
1678 frutos secos y la microbiota de estos.

1679 Se encontró una gran variedad de especies de mohos diferentes en los frutos
1680 secos, entre mohos deterioradores como *Aspergillus niger* y *Rhizopus oryzae*, mohos
1681 toxígenos como *Aspergillus flavus* y *Fusarium* spp., y mohos inertes como
1682 *Cladosporium cladosporoides*. El contenido total de mohos en los frutos secos estuvo,
1683 en promedio, por debajo de los límites permitidos por la norma oficial mexicana
1684 correspondiente, con solo algunas muestras mostrando niveles superiores a lo
1685 permitido. Esto permitió concluir que los frutos secos en venta a granel en las
1686 diferentes regiones del país son, en su mayor parte, seguros en términos
1687 microbiológicos.

1688 Además del análisis fisicoquímico y microbiológico de los frutos secos, se
1689 realizaron pruebas para determinar si los tratamientos con pulsos de luz de alta
1690 intensidad son una alternativa viable para la desinfección de frutos secos, con énfasis
1691 en la eliminación de esporas de mohos deterioradores y toxígenos. Se realizaron
1692 pruebas *in-vitro* en la superficie de placas de agar, como paso inicial exploratorio y se
1693 encontró que los tratamientos con PLAI son capaces de inactivar conidios de *A. niger*,
1694 *A. flavus* y *Penicillium* en la superficie del medio de cultivo. Posteriormente, se
1695 realizaron pruebas para la inactivación de mohos en la superficie de los frutos secos.
1696 Se encontró que, como se ha reportado previamente en la literatura, los tratamientos
1697 con PLAI pierden efectividad cuando se hace la transición de la superficie de medio de
1698 cultivo a la superficie de un alimento. Debido a este efecto, se aumentaron las dosis de
1699 PLAI para las pruebas en la superficie de los frutos secos. Con estas dosis más altas
1700 se logró la inactivación de *A. niger* y *A. flavus* inoculados por gota sobre la superficie de
1701 cacahuates y pepitas de calabaza. Sin embargo, también se encontró que dosis
1702 superiores a los 126 J/cm² y a 210 J/cm² provocaron daños considerables a las pepitas
1703 y cacahuates, respectivamente. Este daño probablemente se debió al incremento
1704 drástico de la temperatura de los frutos secos, el cual llegó a ser de hasta más de 100°
1705 C. Adicionalmente, las dosis efectivas para la eliminación de mohos en estos frutos
1706 secos se encuentran muy por encima del límite regulatorio de 12 J/cm² establecido por
1707 la agencia de fármacos y alimentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en
1708 inglés). Es necesario, en este sentido, establecer regulaciones más robustas para
1709 permitir el uso de los PLAI de manera más efectiva en medios sólidos con superficies
1710 irregulares, como es el caso de los frutos secos evaluados en este estudio.

1711 Finalmente, es necesario continuar evaluando métodos para la aplicación de
1712 PLAI en alimentos sólidos. Uno de los mayores retos para esta tecnología continúa
1713 siendo la aplicación uniforme del tratamiento sobre la superficie del alimento. Estudios
1714 como este demuestran la viabilidad de la tecnología como método alternativo de
1715 desinfección, sin embargo, la aplicación de la tecnología a escala industrial aún
1716 requiere de desarrollo. Para estudios futuros, se recomienda la evaluación de sistemas
1717 que permitan la rotación automática del alimento. En el caso de semillas y frutos secos,
1718 algunas opciones podrían ser el uso de mesas vibratorias, sistemas de fluidización
1719 neumática o rodillos mecánicos. También es necesario desarrollar sistemas que
1720 permitan el control de la temperatura del alimento. Para alimentos secos como los
1721 evaluados en este estudio, un sistema de ventilación neumático permitiría evitar el
1722 sobrecalentamiento de los frutos secos sin humedecer el producto.

1723 La tecnología de tratamientos con PLAI se muestra prometedora como una opción
1724 para productos termosensibles o que requieren de un procesamiento en seco, sin
1725 embargo aún se requiere de mucho trabajo para poderla aplicar efectivamente a un
1726 nivel industrial en esta clase de productos.

1727 **8. Referencias**

- 1728 Abbas, M., Naz, S. A., Shafique, M., Jabeen, N. y Abbas, S. (2019). Fungal contamination in
1729 dried fruits and nuts: a possible source of mycosis and mycotoxicosis. *Pakistan Journal of*
1730 *Botany*, 51(4), 1523-1529.
- 1731 Adaya-González, J., Carvajal-Moreno, M., Rojo-Callejas, F. y Ruiz-Velazco, S. (2015). Aflatoxins
1732 in Walnut (*Juglans regia* L.), Pecan (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch) and Cashew
1733 (*Anacardium occidentale* L.) Nuts of Mexico. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 6(2), 338.
- 1734 Adebajo, L. O. y Diyaolu S. A. (2003). Mycology and spoilage of retail cashew nuts.
1735 *African Journal of Biotechnology*, 2(10), 369-373.
- 1736 Adetunji, M. C., Ezeokoli, O. T., Ngoma, L. y Mwanza, M. (2020). Phylogenetic diversity
1737 and prevalence of mycoflora in ready-to-eat supermarket and roadside-vended
1738 peanuts. *Mycologia*, 113(1), 1-11.
- 1739 Adjou, E. S., Dahouenon-Ahoussi, E., y Soumanou, M. M. (2012). Investigations on the
1740 mycoflora and processing effects on the nutritional quality of peanut (*Arachis*
1741 *hypogea* L. var. TS 32-1). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food*
1742 *Sciences*, 2(3), 1025-1039.
- 1743 Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (1993). *IARC Monograph*
1744 *on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*, vol. 56. Lyon: IARC.
- 1745 Agüero, M. V., Jagus, R. J., Martín-Belloso, O., & Soliva-Fortuny, R. (2016). Surface
1746 decontamination of spinach by intense pulsed light treatments: Impact on quality
1747 attributes. *Postharvest Biology and Technology*, 121, 118-125. DOI:
1748 10.1016/j.postharvbio.2016.07.018.

1749 Aguiló-Aguayo, I., Charles, F., Renard, C. M. G. C., Page, D., y Carlin, F. (2013).
1750 Pulsed light effects on surface decontamination, physical qualities and nutritional
1751 composition of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 29-36.

1752 Anderson, J. G., Rowan, N. J., MacGregor, S. J., Fouracre, R. A., y Farish, O. (2000).
1753 Inactivation of Food-Borne Enteropathogenic Bacteria and Spoilage Fungi Using
1754 Pulsed-Light

1755 Armitage, A. D., Barbara, D. J., Harrison, R. J., Lane, C. R., Sreenivasaprasad, S.,
1756 Woodhall, J. W. y Clarkson, J. P. (2015). Discrete lineages within *Alternaria*
1757 *alternata* species group: Identification using new highly variable loci and support
1758 from morphological characters. *Fungal Biology*, 119(11), 994-1006.

1759 Aron Maftei, N., Ramos-Villarroel, A. Y., Nicolau A. I., Martín-Belloso, O. y Soliva-
1760 Fortuny, R. (2014a). Influence of processing parameters on the pulsed-light
1761 inactivation of *Penicillium expansum* in apple juice. *Food Control*, 41, 27-31.

1762 Aron Maftei, N., Ramos-Villarroel, A. Y., Nicolau, A. I., Martín-Belloso, O. y Soliva-
1763 Fortuny, R. (2014b). Pulsed light inactivation of naturally occurring moulds on
1764 wheat grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 721-726.

1765 Asemoloye, M. D., Jonathan, S. G., Saddaf, R., Habiba, Z., Okoawo, E. E. y Bello, T. S.
1766 (2017). Incidence and Chemical Implications of Aflatoxin in Street-Vended
1767 Foods. En *Aflatoxin Control, Analysis, Detection and Health Risks* (págs. 153-
1768 176). InTech.

1769 Atanasov, A. G., Sabharanjak, S. M., Zengin, G., Mollica, A., Szostak, A., Simirgiotis,
1770 M., ..., y Mocan, A. (2018). Pecan nuts: A review of reported bioactivities and
1771 health effects. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 246-257.

- 1772 Aveling, T. A. S., de Ridder, K., Olivier, N. A. y Berger, D. K. (2020). Seasonal variation
1773 in mycoflora associated with asymptomatic maize grain from smallholder farms in
1774 two provinces of South Africa. *Journal of Agriculture and Rural Development in*
1775 *the Tropics and Subtropics*, 121(2), 265-275.
- 1776 Balajee, S. A. (2009). *Aspergillus terreus* complex. *Medical mycology*, 47, S42-S46.
- 1777 Balvino-Olvera, F. J., Sánchez-Gómez, K. F., Lobo, J. A., Avila-Sakar, G., Cruz-Reyes,
1778 R., Sánchez-Montoya, G., ... y Quesada, M. (2017). Latitudinal structured
1779 populations of the Mexican wild squash *Cucurbita argyrosperma* subsp. *sororia*
1780 revealed by microsatellite markers. *Crop & Pasture Science*, 68, 850-858.
- 1781 Barragán Romero, I. M. y Bautista Justo, M. (2014). Caracterización fisicoquímica de la
1782 semilla de chicayota (*Cucurbita argyrosperma sororia*) y su empleo en
1783 panificación. *Jóvenes en la Ciencia*, 1(1), 83-90.
- 1784 Barrera-Redondo, J. Ibarra-Laclette, E., Vázquez-Lobo, A., Gutiérrez-Guerrero, Y. T.,
1785 Sánchez-de la Vega, G., Piñero, D., ... y Eguiarte, L. E. (2019). The Genome of
1786 *Cucurbita argyrosperma* (Silver-Seed Gourd) Reveals Faster Rate of Protein-
1787 Coding Gene and Long Noncoding RNA Turnover and Neofunctionalization
1788 within *Cucurbita*. *Molecular Plant*, 12, 506-520.
- 1789 Barreto, M. C., Houbraken, J., Samson, R. A., Frisvad, J. C. y San-Romão, M. V.
1790 (2011). Identification of some *Penicillium* species by traditional approach of
1791 morphological observation and culture. *African Journal of Microbiology Research*,
1792 5(21), 3493-3496.

- 1793 Barroyeta, J., Chavarri, M., Rumbos, N., Garrido, M. J. y Mazzani, C. (2013). Microbiota
1794 toxigénica y aflatoxinas en granos de maíz blanco provenientes de los estados
1795 Yaracuy y Guárico, Venezuela. *Fitopatología Venezolana*, 26(1), 2-6.
- 1796 Baysal, A. H., Molya, C., & Unluturk, S. (2013). UV-C light inactivation and modeling
1797 kinetics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in white grape and apple juices.
1798 *International Journal of Food Microbiology*, 166, 494-498.
- 1799 Bryant, M. T., Degala, H. L., Mahapatra, A., Gosukonda, R. M. y Kannan, G. (2021).
1800 Inactivation of *Escherichia coli* K12 by pulsed UV light on goat meat and beef:
1801 microbial responses and modelling. *Journal of Food Science and Technology*,
1802 56(2), 563-572.
- 1803 Bucio-Villalobos, C. M., Guzmán-de-Peña, D. y Peña-Cabriales, J. J. (2001). Aflatoxin
1804 Synthesis in Corn Fields in Guanajuato, Mexico. *Revista Iberoamericana de*
1805 *Micología*, 18, 83-87.
- 1806 Can, F. O., Demirci, A., Puri, V. y Gourama, H. (2014). Decontamination of Hard
1807 Cheeses by Pulsed UV Light. *Journal of Food Protection*, 77(10), 1723-1731.
- 1808 Camargo Cortés, E. B. y González, J. E. (2020). Estudio bromatológico de cinco
1809 variedades de zapallos (*Cucurbita* spp.) cultivados en la provincia de Chiriquí.
1810 *Plus Economía*, 8(2), 57-73.
- 1811 Caminiti, I. M., Noci, F., Muñoz, A., Whyte, P., Morgan, D. J., Cronin, D. A. y Lying, J.
1812 G. (2011). Impact of selected combinations of non-thermal processing
1813 technologies on the quality of an apple and cranberry juice blend. *Food*
1814 *Chemistry*, 124, 1387-1392.

- 1815 Campos-Santos, G., Michel-Aceves, A. C., Vázquez-Ortiz, R. Obispo-González, Q.
1816 (2014). Rendimiento de tres genotipos de cacahuete en respuesta a la
1817 fertilización química y regulador de crecimiento. *Foros de Estudios sobre*
1818 *Guerrero*, 1(2), 61-65.
- 1819 Castellanos Morales, G., Sánchez de la Vega, G., Aragón Cuevas, F., Contreras, A. y Lira
1820 Saade, R. (2019). *Cucurbita argyrosperma*. Cushaw. *The IUCN Red List of Threatened*
1821 *Species*. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T20742586A20755871.en>
- 1822 Cedillo Camarena, M. C. (2013). Iniciativa orientada a locatarios para mejorar la
1823 seguridad sanitaria del mercado municipal de Villa Guerrero, Estado de México
1824 (Publicación No. 053312) [tesis de maestría, Instituto Nacional de Salud Pública].
1825 Catálogo en Línea Koha.
- 1826 Chaine, A., Levy, C., Lacour, B., Riedel, C. y Carlin, F. (2012). Decontamination of
1827 Sugar Syrup by Pulsed Light. *Journal of Food Protection*, 75(5).
- 1828 Char, C., Guerrero, S. y Alzamora, S. M. (2010). Use of high-intensity ultrasound and
1829 UV-C light to inactivate some microorganisms in fruit juices. *Food & Bioprocess*
1830 *Technology*, 3, 797-803.
- 1831 Chayjan, R. A., Salari, K., Abedi, Q. y Sabziparyar, A. A. (2013). Modeling moisture
1832 diffusivity, activation energy and specific energy consumption of squash seeds in
1833 a semi fluidized and fluidized bed drying. *Journal of Food Science and*
1834 *Technology*, 50, 667-677.
- 1835 Cheraghali, A. M., Yazdanpanah, H., Doraki, N., Abouhossain, G., Hassibi, M., Ali-
1836 abadai, S., ... y Zamanian, F. (2007). Incidence of aflatoxins in Iran pistachio
1837 nuts. *Food and Chemical Toxicology*, 45(5), 812-816.

- 1838 Chi Ucán, S. L. (2017). Caracterización de las proteínas de la semilla de calabaza
1839 (*Cucurbita argyrosperma* Huber) y determinación de su calidad nutricional [tesis
1840 de maestría, Instituto Tecnológico de Mérida].
- 1841 Crosby-Galván, M. M., Espinoza-Velasco, B. y Ramírez-Mella, M. (2018). Effect of
1842 Chihua Pumpkin Residue (*Cucurbita argyrosperma*) in Ruminant Gas Production
1843 and Digestibility in vitro. *Pakistan Journal of Zoology*, 50(3), 1-3.
- 1844 Dagnas, S. y Membré, J. M. (2013). Predicting and Preventing Mold Spoilage of Food
1845 Products. *Journal of Food Protection*, 76(3), 538-551.
- 1846 Daly, M. J. (2000). Engineering radiation-resistant bacteria for environmental
1847 biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 280-285.
- 1848 Diao, E., Li, X., Zhang, Z., Ma, W., Ji, N. y Dong, H. (2015). Ultraviolet irradiation
1849 detoxification of aflatoxins. *Trends in Food Science and Technology*, 42, 64-69.
- 1850 Díaz-Nájera, J. F., Alvarado-Gómez, O. G., Leyva-Mir, S. G., Ayvar-Serna, S., Michel-
1851 Aceves, A. C. y Vargas-Hernández, M. (2015). Identification and control of fungi
1852 causing fruits rot in pipiana pumpkin (*Cucurbita argyrosperma* Huber). *African*
1853 *Journal of Agricultural Research*, 10(11), 1150-1157.
- 1854 Díaz-Nájera, J. F., Sahagún-Castellanos, J., Vargas-Hernández, M., Ayvar-Serna, S.,
1855 Alvarado-Gómez, O. G., Villanueva-Verduzco, C. y Acosta-Ramos, M. (2018).
1856 Diagnosis and Integrated Management of Fruit Rot in *Cucurbita argyrosperma*,
1857 Caused by *Sclerotium rolfsii*. *Plant Pathology Journal*, 34(3), 171-181.
- 1858 Diba, K., Krodbacheh, P., Mirhendi, S. H., Reyaie, S. y Mahmoudi, M. (2007).
1859 Identification of *Aspergillus* species using morphological characteristics. *Pakistan*
1860 *Journal of Medical Sciences*, 23(6), 867-872.

1861 Dorner, J. W. (2008). Relationship Between Kernel Moisture Content and Water Activity
1862 in Different Maturity Stages of Peanut. *Peanut Science*, 35(2), 77-80.

1863 D'Souza, C., Yuk, H. G., Khoo, G. H. y Zhou, W. (2015). Applications of Light-Emitting
1864 Diodes in Food Production, Postharvest Preservation, and Microbiological Food
1865 Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14, 719-740.

1866 EFSA CONTAM Panel, Knusten, H. K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M.,
1867 Brüscheiler, B, ... y Petersen, A. (2018). Statement on the effect on public
1868 health of a possible increase of the maximum level for 'aflatoxin total' from 4 to
1869 10lg/kg in peanuts and processed products thereof, intended for direct human
1870 consumption or use as an ingredient in foodstuffs. *EFSA Journal* 2018, 16(2), 32
1871 págs.

1872 Elmnasser, N., Dalgarrondo, M., Orange, N., Bakhrouf, A., Haertlé, T., Federighi, M. y
1873 Chobert, J. M. (2008). Effect of pulsed-light treatment on milk proteins and lipids.
1874 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(6), 1984-1991.

1875 Erdman, I. E., Tatcher, F. S. y MacQueen, K. F. (1961). Studies on the irradiation of
1876 microorganisms in relation to food preservation: II. Irradiation Resistant Mutants.
1877 *Canadian Journal of Microbiology*, 7(2), 207- 215.

1878 Eustice, R. F. (2017). Global Status and Commercial Applications of Food Irradiation.
1879 En *Food Irradiation Technologies* (págs. 397-424).

1880 Fatahinia, M. Zarei-Mahmoudabadi, A., Shokri, H. y Ghaymi, H. (2018). Monitoring of
1881 mycoflora in outdoor air of different localities of Ahvaz, Iran. *Journal de*
1882 *Mycologie Médicale*, 28, 87-93.

- 1883 Fatima, T., showat, U. y Hussain, S Z. (2018). Nutritional and health benefits of walnuts.
1884 *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(2), 1269-1271.
- 1885 Ferrario, M., Alzamora, S. M. y Guerrero, S. (2013). Inactivation kinetics of some
1886 microorganisms in apple, melon, orange, and strawberry juices by high intensity
1887 light pulses. *Journal of Food Engineering*, 118(3), 302-311.
- 1888 Ferrario, M., Alzamora, S. M. y Guerrero, S. (2015). Study of the inactivation of spoilage
1889 microorganisms in apple juice by pulsed light and ultrasound. *Food Microbiology*,
1890 46, 635-642.
- 1891 Ferrario, M. y Guerrero, S. (2016). Effect of a continuous flow-through pulsed light
1892 system combined with ultrasound on microbial survivability, color and sensory
1893 shelf-life of apple juice. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 34,
1894 214-224.
- 1895 Flores-Cervantes, D. X., Palou, E., y López-Malo, A. (2013). Efficacy of individual and
1896 combined UVC light and food antimicrobial treatments to inactivate *Aspergillus*
1897 *flavus* or *A. niger* spores in peach nectar. *Innovative Food Science and*
1898 *Engineering Technologies*, 20, 244-252.
- 1899 Franco-Vega, A., Fátima, R.-J., González-Albarrán, D., Ramírez-Corona, N., Palou, E. y
1900 López-Malo, A. (2021). Developments and Advances of High Intensity Pulsed
1901 Light and its Combination with Other Treatments for Microbial Inactivation in
1902 Food Products. *Food Engineering Reviews*. doi:10.1007/s12393-021-09280-1.
- 1903 Franz, C. M., Specht, I., Cho, G. S., Graef, V., & Stahl, M. R. (2009). UV-C-inactivation
1904 of microorganisms in naturally cloudy apple juice using novel inactivation
1905 equipment based on Dean vortex technology. *Food Control*, 20(12), 1103-1107.

1906 García-Aguirre, G. y Martínez-Flores, R. (2010). Especies de *Fusarium* en granos de
1907 maíz recién cosechado y desgranado en el campo en la región de Ciudad
1908 Serdán, Puebla. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 81(1), 15-20.

1909 García Carrillo, M., Ferrario, M., & Guerrero, S. (2017). Study of the inactivation of
1910 some microorganisms in turbid carrot-orange juice blend processed by ultraviolet
1911 light assisted by mild heat treatment. *Journal of Food Engineering*, 212, 213-225.

1912 García-Gómez, R., Chávez-Espinoza, J. Mejía-Chávez, A. y Durán-de Bazúa, C.
1913 (2002). Microbiological determinations of some vegetables from the Xochimilco
1914 zone in Mexico City, Mexico. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 44(1),
1915 24-30.

1916 García, S. y Heredia, N. (2006). Mycotoxins in Mexico: Epidemiology, management and
1917 control strategies. *Mycopathologia*, 162(3), 255-264.

1918 Ghorbani, M. y Hosseini, H. (2017). Determination of water activity corresponding to the
1919 proper quality of peanut kernels. *Journal of Food Processing and Preservation*,
1920 41(6), 1-8.

1921 Gölge, E. y Ova, G. (2008). The effects of food irradiation on quality of pine nut kernels.
1922 *Radiation Physics and Chemistry*, 77, 365-369.

1923 Gómez-López, A., Aberkane, A., Petrikkou, E., Mellado, E., Rodriguez-Tudela, J. L. y
1924 Cuenca-Estrella, M. (2005). Analysis of the influence of tween concentration,
1925 inoculum size, assay medium, and reading time on susceptibility testing of
1926 *Aspergillus* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), 1251-1255.

- 1927 Gómez-Lopez, V. M., Devlieghere, F., Bonduelle, V., Debevere, J. (2005). Factors
1928 affecting the inactivation of micro-organisms by intense light pulses. *Journal of*
1929 *Applied Microbiology*, 99(3), 460-470.
- 1930 Gürses, M. (2006). Mycoflora and Aflatoxin Content of Hazelnuts, Walnuts, Peanuts,
1931 Almonds and Roasted Chickpeas (LEBLEBI) Sold in Turkey. *International*
1932 *Journal of Food Properties*, 9, 395-399.
- 1933 Guzmán de Peña, D. y Peña-Cabrales, J. J. (2005). Regulatory considerations of
1934 aflatoxin contamination of food in Mexico. *Revista Latinoamericana de*
1935 *Microbiología*, 47(3-4), 160-164.
- 1936 Heinrich, V., Zunabovic, M., Varzakas, T., Bergmair, J y Kneifel, W. (2016). Pulsed Light
1937 Treatment of Different Food Types with a Special Focus on Meat: A Critical
1938 Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(4), 591-613.
- 1939 Hernández-Romo, T. (2020). *México en el Mercado de la Nuez Pecana*. Obtenido de:
1940 http://comenuetz.com/assets/gcma_engalec_mx_mercado_nuez_pecana.pdf.
- 1941 Herzallah, S., Alshawabkeh, K. y Al Fataftah, A. (2008). Aflatoxin Decontamination of
1942 Artificially Contaminated Feeds by Sunlight, γ -Radiation, and Microwave Heating.
1943 *Journal of Applied Poultry Research*, 17(4), 515-521.
- 1944 Houbraken, J., Verweij, P. E., Rijs, A. J. M. M., Borman, A. M. y Samson, R. A. (2010a).
1945 Identification of *Paecilomyces variotii* in clinical samples and settings. *Journal of*
1946 *Clinical Microbiology*, 48(8), 2754-2761.
- 1947 Houbraken, J. A. M. P., Frisvad, J. C. y Samson, R. A. (2010b). Taxonomy of
1948 *Penicillium citrinum* and related species. *Fungal diversity*, 44, 117-133.

- 1949 Hussein, H. Z., Tuama, R. H. y Ali, A. M. (2015). Study the effect of ozone gas and
1950 ultraviolet radiation and microwave on the degradation of aflatoxin B1 produce by
1951 *Aspergillus flavus* on stored Maize grains. *IOSR Journal of Agriculture and*
1952 *Veterinary Science*, 8(5), 5-12.
- 1953 Hwang, H. J., Cheigh, C. I. y Chung, M. S. (2018). Comparison of bactericidal effects of
1954 two types of pilot-scale intense-pulsed-light devices on cassia seeds and
1955 glutinous millet. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 49, 170-
1956 175.
- 1957 Izquier, A. y Gómez-López, V. (2011). Modeling the pulsed light inactivation of
1958 microorganisms naturally occurring on vegetable surfaces. *Food Microbiology*,
1959 28(6),1170-1174.
- 1960 Jansen, D. H. (1977). Why Fruits Rot, Seeds Mold, and Meat Spoils. *The American*
1961 *Naturalist*, 111(980), 691-713.
- 1962 Jayashree, M. y Wesley, E. G. (2019). The impact of Weather on the Fungal
1963 Abundance and Richness in Sorghum Grains in Selected Districts of Tamil Nadu,
1964 India. *Infokara Research*, 8(11), 1985-1989.
- 1965 Jermann, C., Koutchma, T., Margas, E., Leadley, C. y Ros-Polski, V. (2015). Mapping
1966 trends in novel and emerging food processing technologies around the world.
1967 *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 31, 14-27.
- 1968 Jubeen, F., Bhatti, I. A., Khan, M. Z., Hassan, Z. U. y Shahid, M. (2012). Effect of UVC
1969 Irradiation on Aflatoxins in Ground Nut (*Arachis hypogaea*) and Tree Nuts
1970 (*Juglans regia*, *Prunus dulcis* and *Pistachio vera*). *Journal of the Chemical*
1971 *Society of Pakistan*, 34(6), 1366-1374.

- 1972 Jung K. W., Yang, D. H., Kim, M. K., Seo, H. S., Lim, S. y Bahn, Y. S. (2016).
1973 Unraveling Fungal Radiation Resistance Regulatory Networks through the
1974 Genome-Wide Transcriptome and Genetic Analysis of *Cryptococcus*
1975 *neoformans*. *mBio*, 7(6), 1-15.
- 1976 Kanapitsas, A., Batrinou, A., Aravantinos, A. y Markaki, P. (2015). Effect of γ -radiation
1977 on the production of aflatoxin B₁ by *Aspergillus parasiticus* in raisins (*Vitis vinifera*
1978 L.). *Radiation Physics and Chemistry*, 106, 327-332.
- 1979 Karaoglan, H. A., Keklik, N. M. e Işikli, N. D. (2017). Modeling inactivation of *Candida*
1980 *inconspicua* isolated from turnip juice using pulsed UV light. *Journal of Food*
1981 *Process Engineering*, 40(2), 1-9.
- 1982 Karlovsky, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G., Perrin, I., ... y
1983 Dussort, P. (2016). Impact of food processing and detoxification treatments on
1984 mycotoxin contamination. *Mycotoxin research*, 32(4), 179-205.
- 1985 Katarzyna, R., Wiktor, A., Pobiega, K., Witrowa-Rajchert, D. y Nowacka, M. (2021).
1986 Impact of pulsed light treatment on the quality properties and microbiological
1987 aspects of red bell pepper fresh-cuts. *LWT – Food Science and Technology*, 149.
- 1988 Keklik, N. M. (2019). Treatment of pastrima with pulsed UV light: Modeling of
1989 *Staphylococcus aureus* inactivation and assessment of quality changes. *Food*
1990 *Science and Technology International*, 26(2), 185-198.
- 1991 Keklik, N. M., Demirci, A., Patterson, P. H. y Puri, V. M. (2010a). Pulsed UV light
1992 inactivation of *Salmonella Enteritidis* on egg shells and its effects on egg quality.
1993 *Journal of Food Protection*, 73, 1408-1415.

- 1994 Keklik, N. M., Demirci, A., Puri, V. M. y Heinemann, P. H. (2012). Modeling the
1995 Inactivation of *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, and
1996 *Salmonella* Enteritidis on Poultry Products Exposed to Pulsed UV Light. *Journal*
1997 *of Food Protection*, 75(2), 281-288.
- 1998 Keklik, N. M., Demirci, A. y Puri, V. M. (2009). Inactivation of *Listeria monocytogenes* on
1999 unpackaged and vacuum-packaged chicken frankfurters using pulsed UV-light.
2000 *Journal of Food Science*, 74, M431-M439.
- 2001 Keklik, N. M., Demirci, A. y Puri, V. M. (2010b). Decontamination of unpackaged and
2002 vacuum-packaged chicken breast with pulsed UV-light. *Poultry science*, 89, 570-
2003 581.
- 2004 Keyser, M., Müller, I. A., Cilliers, F. P., Nel, W. y Gouws, P. A. (2008). Ultraviolet
2005 radiation as a non-thermal treatment for the inactivation of microorganisms in fruit
2006 juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(3), 348-354.
- 2007 Khandaker, M., Ahmed, R., Rahim, M., Hassan, T. y Begum, M. (2019a). Determination
2008 of Mycoflora and Mycotoxins in Raw and Roasted Peanuts in Bangladesh.
2009 *International Journal of Plant and Environment*, 5(4), 259-264.
- 2010 Khandaker, M. M., Rahman, T., Rahim, M. M., Hassan, M. T., Begum, M. y Bhuiyan, M.
2011 A. B. (2019b). Mycoflora and mycotoxin detection in roasted peanut kernels of
2012 Bangladesh. *Bangladesh Phytopathological Society*, 35(1 y 2), 53-58.
- 2013 Khosravi, A. R., Shokri, H. y Zigari, T. (2007). Evaluation of fungal flora in some
2014 important nut products (pistachio, peanut, hazelnut and almond) in Tehran, Iran.
2015 *Pakistani Journal of Nutrition*, 6(5), 460-462.

2016 Kim, S. J. Kim, D. K. y Kang, D. H. (2016). Using UVC Light-Emitting Diodes at
2017 Wavelengths of 266 to 279 Nanometers to Inactivate Foodborne Pathogens and
2018 Pasteurize Sliced Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(1), 11-
2019 17.

2020 Kramer, B. y Muranyi, P. (2013). Effect of pulsed light on structural and physiological
2021 properties of *Listeria innocua* and *Escherichia coli*. *Journal of Applied*
2022 *Microbiology*, 116(3), 596-611.

2023 Kramer, B., Wunderlich, J. y Murayani, P. (2017). Impact of treatment parameters on
2024 pulsed light inactivation of microorganisms on a food simulant surface. *Innovative*
2025 *Food Science and Emerging Technologies*, 42, 83-90.

2026 Lasagabaster, A. M. y Martínez de Marañón, I. (2014). Survival and growth of *Listeria*
2027 *innocua* treated by pulsed light technology: Impact of post-treatment temperature
2028 and illumination conditions. *Food Microbiology*, 41, 76-81.

2029 Lemus-Mondaca, R., Marin, J., Rivas, J., Sanhueza, L., Soto, Y., Vera, N. y Puente-
2030 Díaz, L. (2019). Pumpkin seeds (*Cucurbita maxima*). A review of functional
2031 attributes and by-products. *Revista Chilena de Nutrición*, 46(6), 783-791.

2032 Levy, C., Aubert, X., Lacour, B. y Carlin, F. (2012). Relevant factors affecting microbial
2033 surface decontamination by pulsed light. *International Journal of Food*
2034 *Microbiology*, 152, 168-174.

2035 Lestari, B. y Meiyanto, E. (2018). A Review: The Emerging Nutraceutical Potential of
2036 Pumpkin Seeds. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 9(2), 92-101.

2037 Li, X. y Farid, M. (2016). A review on recent development in non-conventional food
2038 sterilization technologies. *Journal of Food Engineering*, 182, 33-45.

2039 Liu, K., Liu, Y. y Chen, F. (2018). Effect of gamma irradiation on the physicochemical
2040 properties and nutrient content of peanut. *LWT – Food Science and Technology*,
2041 96, 535-542.

2042 Liu, X., Guan, X., Xing, F., Ly, C., Dai, X., y Liu, Y. (2017). Effect of water activity and
2043 temperature on growth of *Aspergillus flavus*, the expression of aflatoxin
2044 biosynthetic genes and aflatoxin production in peanuts, *Food Control*, 82, 325-
2045 332.

2046 Lorenzo-Hernández, R., Torres-Salado, N., Sánchez-Santillán, P., Herrera-Pérez, J.,
2047 Mayrén-Mendoza, F. d. J., Salinas-Ríos, T., ..., Maldonado-Peralta, M. d. I. A.
2048 (2019). Evaluación de las características de calidad y bromatológicas de
2049 ensilados elaborados con residuos de calabaza (*Cucurbita argyrosperma*).
2050 *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 35(4), 957-963.

2051 Luna-Méndez, N., Jaramillo-Villanueva, J. L., Ramírez-Juárez, J., Escobedo-Garrido,
2052 S., Bustamante-González, A. y Campos-Ríos, G. (2013). Tipología de unidades
2053 de producción de nuez de castilla en sistema de producción tradicional.
2054 *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 10(3), 283-303.

2055 Maeda Rojas, V., da Costa Baptista Marconi, L. F., Guimarães-Inácio, A., Leimann, F.
2056 V., Tanamati, A. Gozzo, Â. M., ... y Hess Gonçalves, O. (2019). Formulation of
2057 mayonnaises containing PUFAs by the addition of microencapsulated chia
2058 seeds, pumpkin seeds and baru oils. *Food Chemistry*, 274, 220-227.

2059 Malloch, D. (2009). *Moulds: Their Isolation, Cultivation and Identification*. Obtenido de:
2060 <http://website.nbm-mnb.ca/mycologywebpages/Moulds/Moulds.html>

2061 Mansor, A., Shamsudin, R., Adzahan, N. M. y Hamidon, M. N. (2014). Efficacy of
2062 ultraviolet radiation as non-thermal treatment for the inactivation of Salmonella
2063 typhimurium TISTR 292 in pineapple fruit juice. *Agriculture and Agricultural*
2064 *Science Procedia*, 2, 173-180.

2065 Mañas, P. y Pagán, R. (2005). Microbial inactivation by new technologies of food
2066 preservation. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1387-1399.

2067 Marquenie, D., Geeraerd A. H., Lammertyn, J., Soontjens C., Van Impe, J. F., Michiels
2068 C. W. y Nicolai, B. M. (2003). Combinations of pulsed white light and UV-C or
2069 mild heat treatment to inactivate conidia of *Botrytis cinerea* and *Monilia*
2070 *fructigena*. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1-2), 185-196.

2071 Martín-Diana, A. B., Rico, D., & Barry-Ryan, C. (2008). Green tea extract as a natural
2072 antioxidant to extend the shelf-life of fresh-cut lettuce. *Innovative Food Science*
2073 *and Emerging Technologies*, 9, 593-603.

2074 Martínez-Flores, R., García-Aguirre, G. y Melgarejo-Hernández. J. (2003). Inspección
2075 de aflatoxinas en maíz cultivado, almacenado y transportado en Tamaulipas,
2076 México, en 1998. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica*, 74(2), 313-
2077 321.

2078 Martínez-Padrón, H. Y., Hernández-Delgado, S., Reyes-Méndez, C. A. y Vazquez-
2079 Carrillo, G. (2012). El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México:
2080 Problemática y Perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(2), 126-146.

2081 Meletiadis, J. Meis, J. F. G. M., Mouton, J. W. y Verweij, P. E. (2001). Analysis of
2082 Growth Characteristics of Filamentous Fungi in Different Nutrient Media. *Journal*
2083 *of Clinical Microbiology*, 39(2), 478-484.

2084 Méndez-Albores, J. A., Arámbula-Villa, G., Preciado-Ortiz, R. E. y Moreno-Martínez, E.
2085 (2004). Aflatoxins in pozol, a nixtamalized, maize-based food. *International*
2086 *Journal of Food Microbiology*, 94(2), 211-215.

2087 Mexis, S. F. y Kontominas, M. G. (2009). Effect of γ -irradiation on the physicochemical
2088 and sensory properties of nuts (*Anacardium occidentale* L.). *LWT – Food*
2089 *Science and Technology*, 42, 1501-1507.

2090 Mohamed, S., Flint, S., Palmer, J., Fletcher, G. C. y Pitt, J. I. (2013). An extension of the
2091 Coconut Cream Agar method to screen *Penicillium citrinum* isolates for citrinin
2092 production. *Letters in Applied Microbiology*, 57(3), 214-219.

2093 Montero Torres, J. (2020). Importancia nutricional y económica del maní (*Arachis*
2094 *hypogaea*). *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos*
2095 *Naturales*, 7(2), 112-125.

2096 Muture B. N. y Ogana, G. (2005). Aflatoxin levels in maize and maize products during
2097 2004 food poisoning outbreak in Eastern Province of Kenya. *East African*
2098 *Medical Journal*, 82(6), 275-279.

2099 Nguyen, T. H. D. y Vu, D. C. (2021). A Review on Phytochemical Composition and
2100 Potential Health-promoting Properties of Walnuts. *Food Reviews International*, 1-
2101 28.

2102 Nieuwenhuijsen, M. J., Toledano, M. B., & Elliot, P. (2000). Uptake of chlorination
2103 disinfection by-products; a review and a discussion of its implications for
2104 epidemiological studies. *Journal of Exposure Science & Environmental*
2105 *Epidemiology*, 10(6), 586-599.

2106 Northolt, M. D. y Bullerman, L. B. (1982). Prevention of Mold Growth and Toxin
2107 Production through Control of Environmental Conditions. *Journal of Food*
2108 *Protection*, 45(6), 519-526.

2109 Ölmez, H., & Kretzschmar, U. (2009). Potential alternative disinfection methods for
2110 organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental
2111 impact. *LWT - Food Science and Technology*, 42(3), 686-693.

2112 Oteiza, J. M., Peltzer, M., Gannuzzi, L. y Zaritzky, N. (2005). Antimicrobial efficiency of
2113 UV radiation on *Escherichia coli* O157:H7 (EDL 933) in fruit juices of different
2114 absorptivities. *Journal of Food Protection*, 68(1), 49-58.

2115 Orłowska, M., Koutchma, T., Grapperhaus, M., Gallagher, J., Schaefer, R. y Cheryl, D.
2116 (2013). Continuous and Pulsed Ultraviolet Light for nonthermal Treatment of
2117 Liquid Foods. Part 1: Effects on Quality of Fructose Solution, Apple Juice and
2118 Milk. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 1580-1592.

2119 Orona-Castillo, I., Sangerman-Jarquín, D. M., Cervantes Vázquez, M. G., Espinoza
2120 Arellano, J. d. J., Núñez Moreno, J. H. (2019). La comercialización de nuez
2121 pecanera en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(8), 1797-1808.

2122 Papoulis, A. y Pillai, U. S. (2002). *Probability, random variables, and stochastic*
2123 *processes*. Nueva York: McGraw-Hill.

2124 Patel, S. (2013). Pumpkin (*Cucurbita* sp.) seeds as a nutraceutical: a review on status
2125 quo and scopes. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 6, 183-189.

2126 Peleg, M. (1999). On calculating sterility in thermal and non-thermal preservation
2127 methods. *Food Research International*, 32, 271-278.

- 2128 Peleg, M. y Cole, M. B. (1998). Reinterpretation of Microbial Survival Curves. *Critical*
2129 *Reviews in Food Science*, 38(5), 353-380.
- 2130 Petrini, L. E. y Petrini, O. (2013). *Identifying Moulds: A Practical Guide*. Stuttgart: J.
2131 Cramer Verlag.
- 2132 Pitt, J. I. y Hocking, A. D (2009). *Fungi and Food Spoilage*. Nueva York: Springer.
- 2133 Pulsed light for the treatment of food, 21 C.F.R., §179.41 (1996).
- 2134 Rahim, S., Dawar, S., y Zaki, J. (2013). Mycoflora associated with seed samples of
2135 Cucurbita pepo collected from Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 45(6), 2173-
2136 2179.
- 2137 Ranere, A. J., Piperno, D. R., Holst, I., Dickau, R. e Iriarte, J. (2009). The cultural and
2138 chronological context of early Holocene maize and squash domestication in the
2139 Central Balsas River Valley, Mexico. *PNAS*, 106(3), 5014-5018.
- 2140 Rawat, S. (2015). Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Asian Journal of*
2141 *Plant Science and Research*, 5(4), 47-56.
- 2142 Reyes-Jurado, F., Navarro-Cruz, A. R., Méndez-Aguilar, J., Ochoa-Velasco, C. E.,
2143 Mani-López, E., Jiménez-Munguía, M. T., ... y Ávila-Sosa, R. (2019). High-
2144 Intensity Light Pulses to Inactivate *Salmonella* Typhimurium on Mexican Chia
2145 (*Salvia hispanica* L.) Seeds. *Journal of Food Protection*, 82(8), 1272-1277.
- 2146 Rico, D., Marrtín-Diana, A. B., Barat, J. M., & Barry-Ryan, C. (2007). Extending and
2147 measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends in Food*
2148 *Science and Technology*, 18, 373-386.

2149 Ringus, D. L. y Moraru, C. I. (2013). Pulsed Light inactivation of *Listeria innocua* on food
2150 packaging materials of different surface roughness and reflectivity. *Journal of*
2151 *Food Engineering*, 114, 331-337.

2152 Roberts, P. B. (2014). Food irradiation is safe: Half a century of studies. *Radiation*
2153 *Physics and Chemistry*, 105, 78-82.

2154 Romero Bernal, A. R., Contigiani, E. V., González, H. H. L., Alzamora, S. M., Gómez, P.
2155 L. y Raffellini, S. (2019). *Botrytis cinerea* response to pulsed light: Cultivability,
2156 physiological state, ultrastructure and growth ability on strawberry fruit.
2157 *International Journal of Food Microbiology*, 309. DOI:
2158 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108311.

2159 Ruiz García, J. L., Villalobos-González, A., Cetzal Ix, W., López-Hernández, M. B.,
2160 Rangel-Fajardo, M. A., García-Sandoval, J. A. (2020). Análisis proximal de
2161 accesiones de calabaza chihua en la Península de Yucatán. *Revista Mexicana*
2162 *de Ciencias Agrícolas*, 11(8), 1725-1736.

2163 Saleh, Y. G., Mayo, M. S. y Ahearn, D. G. (1988). Resistance of Some Common Fungi
2164 to Gamma Irradiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(8), 2134-
2165 2135.

2166 Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C. y Filtenberg, O. (1995). *Introduction to*
2167 *Food-Borne Fungi* (4ª edición). Baarn, Utrecht: Centraalbureau voor
2168 Schimmelcultures.

2169 Sánchez-de la Vega, G., Castellanos-Morales, G., Gámez, N., Hernández-Rosales, H.
2170 S., Vázquez-Lobo, A., Aguirre-Planter, E., ... y Equiarte, L. E. (2018). Genetic
2171 resources in the “calabaza pipiana” squash (*Cucurbita argyrosperma*) in Mexico:

2172 Genetic diversity, genetic differentiation, and distribution models. *Frontiers in*
2173 *Plant Science*, 9, 1-18.

2174 Schenk, M. Guerrero, S. y Alzamora, S. M. (2008). Response of some microorganisms
2175 to ultraviolet treatment on fresh-cut pear. *Food & Bioprocess Technology*, 1, 384-
2176 392.

2177 Secretaría de Economía. (1986). *Alimentos. Determinación de humedad en productos*
2178 *alimenticios. Foods. moisture in food products determination. Normas*
2179 *mexicanas. Dirección General de Normas. (Norma Mexicana NMX-F-083-1986).*

2180 Secretaría de Economía. (1987). *Alimentos. Aceites y grasas vegetales o animales.*
2181 *Determinación del índice de peróxido. Foods. Vegetables or animals oils and*
2182 *fats. Peroxide index determination. Normas mexicanas. Dirección General de*
2183 *Normas (Norma Mexicana NMX-F-154-1987).*

2184 Secretaría de Salud. (1995). *Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y*
2185 *levaduras en alimentos (Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994).* Ciudad
2186 de México: Diario Oficial de la Federación.

2187 Secretaría de Salud (1995). *Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de*
2188 *alimentos para su análisis microbiológico (Norma Oficial Mexicana NOM-110-*
2189 *SSA1-1994).* Ciudad de México: Diario Oficial de la Federación.

2190 Secretaría de Salud. (2008). *Bienes y servicios. Cereales y sus productos. Cereales,*
2191 *harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales,*
2192 *semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos*
2193 *de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales.*

2194 *Métodos de prueba* (Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008). Ciudad de
2195 México: Diario Oficial de la Federación.

2196 Servicio de Información Agrícola y Pesquera (2017). *Anuario Estadístico de la*
2197 *Producción Agrícola*. Obtenido de: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>

2198 Sharma, G. y Pandey, R. R. (2010). Influence of culture media on growth, colony
2199 character and sporulation of fungi isolated from decaying vegetable wastes.
2200 *Journal of Yeast and Fungal Research*, 1(8), 157-164.

2201 Sharma, R. R. y Demirci, A. (2003). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on
2202 Inoculated Alfalfa Seeds with Pulsed Ultraviolet Light and Response Surface
2203 Modeling. *Journal of Food Science*, 68(4), 1448-1453.

2204 Shin, J. Y., Kim, S. J., Kim, D. K., Kang, D. H. (2016). Fundamental Characteristics of
2205 Deep UV Light-Emitting Diodes and Their Application to Control Foodborne
2206 Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(1), 2-10.

2207 Sidrim, J. J. C., Moreira Filho, R. E., Cordeiro, R. A., Rocha, M. F. G., Caetano, E. P.,
2208 Monteiro, A. J. y Brilhante, R. S. N. (2010). Fungal microbiota dynamics as a
2209 postmortem identification tool: focus on *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Candida*
2210 species. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1751-1756.

2211 Sommers, C. H., Cooke, P. H. y Sites, J. E. (2009). Ultraviolet Light (254 nm)
2212 Inactivation of *Listeria monocytogenes* on Frankfurters That Contain Potassium
2213 Lactate and Sodium Diacetate. *Journal of Food Science*, 74(3), M114-M119.

2214 Subedi, S. y Roopesh, M. S. (2020). Simultaneous drying of pet food pellets and
2215 *Salmonella* inactivation by 395 nm light pulses in an LED reactor. *Journal of*
2216 *Food Engineering*, 286. Doi: 10.1016/j.jfoodeng.2020.110110

- 2217 Sucar-Escamilla, D. P. (2018). *Inactivation of Salmonella Typhimurium on Sunflower*
2218 *Seeds by High Intensity Light Pulses and Lemongrass Essential Oil in Vapor*
2219 *Phase* [Tesis de licenciatura, Universidad de las Américas Puebla].
- 2220 Syed, Q. A., Akram, M., y Shukat, R. (2019). Nutritional and Therapeutic Importance of
2221 the Pumpkin Seeds. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*,
2222 *21(2)*, 15798-15803.
- 2223 Tanwar, B., Modgil, R. y Goyal, A. (2021). Nutritional and phytochemical composition of
2224 pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] and its hypocholesterolemic
2225 effect in an animal model. *British Food Journal*, *123(4)*, 1433-1448.
- 2226 Tavares, A., Carvalho, C. M. B., Faustino, M. A., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, J. P. C.,
2227 Tomé, A. C., ... y Almeida, A. (2010). Antimicrobial Photodynamic Therapy:
2228 Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance
2229 after Treatment. *Marine Drugs*, *8(1)*, 91-105.
- 2230 Taze, B. H., Unluturk, S. Buzrul, S., y Alpas, H. (2015). The impact of UV-C irradiation
2231 on spoilage microorganisms and colour of orange juice. *Journal of Food Science*
2232 *and Technology*, *52(2)*, 1000-1007.
- 2233 Temperini, C. V., Franchi, M. L., Benavides, M. E., Greco, M., Prado, A. G. y Pose, G.
2234 N. (2019). Diversity and abundance of airborne fungal spores in a rural cold dry
2235 desert environment in Argentinian Patagonia. *Science of the Total Environment*,
2236 *665*, 513-520.
- 2237 Toomer, O. T. (2018). Nutritional chemistry of peanut (*Arachis hypogaea*). *Critical*
2238 *Reviews in Food Science and Nutrition*, *58(17)*, 3042-3053.

2239 Torres Espinoza E., Acuña Askar, K., Nacha Torres, L. R., Montoya Olvera, R. y
2240 Castellón Santa Anna, J. P. (1995). Quantification of aflatoxins in corn
2241 distributed in the city of Monterrey, Mexico. *Journal of Food Additives &*
2242 *Contaminants*, 12(3), 383-386.

2243 Torres-Sánchez, L. E., Rojas-Martínez, R., Escamilla-Núñez, C., de la Vara-Salazar, E.
2244 y Lazcano-Ponce, E. (2014). Tendencias en la mortalidad por cáncer en México
2245 de 1980 a 2011. *Salud Pública de México*, 56(5), 473-491.

2246 Tournas, V. H., Niazi, N. S. y Kohn, J. S. (2015). Fungal presence in selected tree nuts
2247 and dried fruits. *Microbiology insights*, 8, 1-6.

2248 Turtoi, M. y Nicolau, A. (2007). Intense light pulse treatment as alternative method for
2249 mould spores destruction on paper-polyethylene packaging material. *Journal of*
2250 *Food Engineering*, 83, 47-53.

2251 Uesugi, A. R., Woodling, S. E. y Moraru, C. E. (2007). Inactivation kinetics and factors
2252 of variability in the pulsed light treatment of *Listeria innocua* cells. *Journal of*
2253 *Food Protection*, 70, 2518-2525.

2254 Urban, L., Charles, F., Alcântara de Miranda, M. R. y Aarrouf, J. (2016). Understanding
2255 the physiological effects of UV-C light and exploiting its agronomic potential
2256 before and after harvest. *Plant Physiology and Biochemistry*, 105(1), 1-11.

2257 Valdés Restrepo, M. P., Ortiz Grisales, S., Vallejo Cabrera, F. A. y Baena García, D.
2258 (2014). Variabilidad en frutos y semillas de *Cucurbita moschata* Duch. y
2259 *Cucurbita argyrosperma* subsp. *sororia* L. H. Bailey Merrick & D. M. Bates. *Acta*
2260 *Agronómica*, 63(3), 1-18.

- 2261 Valdez-Arjona, L. P. & Ramírez-Mella, M. (2019). Pumpkin waste as Livestock Feed:
2262 Impact on Nutrition and Animal Health and on Quality of Meat, Milk, and Egg.
2263 *Animals*, 9, 1-16.
- 2264 Valle-García, M., Machado Moraes, V., Oliver Bernardi, A., Schneider Oliveira, M.,
2265 Mallmann, C. A., Boscardin, J y Venturini Copetti, M. (2019). Mycological quality
2266 of pecan nuts from Brazil: absence of aflatoxigenic fungi and aflatoxins. *Ciência*
2267 *Rural*, 49(96), 1-8.
- 2268 Varga, J., Frisvad, J. C. y Samson, R. A. (2007). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus*
2269 section *Candidi* based on molecular, morphological and physiological data.
2270 *Studies in Mycology*, 59, 75-88.
- 2271 Walker, C. Muniz, M. F. B., Rolim, J. M., Martins, R. R. O., Rosenthal, V. C., Maciel, G.,
2272 ... y Reiniger, L. R. S. (2016). Morphological and molecular characterization of
2273 *Cladosporium cladosporoides* species complex causing pecan tree leaf spot.
2274 *Genetics and Molecular research*, 15(13), 1-11.
- 2275 Wuytack, E. Y., Phuong, D. T., Aertsen, A., Reyns, K. M. F., Marquenie, D., De
2276 Ketelaere, B., ... y Michiels, C. W. (2003). Comparison of Sublethal Injury
2277 Induced in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium by Heat and by Different
2278 Nonthermal Treatments. *Journal of Food Protection*, 66(1), 31-37.
- 2279 Zenklusen, M. H., Coronel, M. B., Castro, M. A., Alzamora S. M. y Lucas González, H.
2280 H. (2018). Inactivation of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus flavus* in
2281 malting barley by pulsed light and impact on germination capacity and
2282 microstructure. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 45, 161-168.

2283 Zhang, Z. H., Wang, L. H., Zeng, X. A., Han, Z. y Brennan, C. S. (2018). Non-thermal
2284 technologies and its current and future application in the food industry: a review.
2285 *International Journal of Food Science and Technology*. DOI:
2286 <https://doi.org/10.1111/ijfs.13903>

2287 Zuki-Orozco, B. A., Batres-Esquivel, L. E., Ortiz-Pérez, M. D., Juárez-Flores, B. I. y
2288 Díaz-Barriga, F. (2018). Aflatoxins Contamination in Maize Products from Rural
2289 Communities in San Luis Potosi, Mexico. *Annals of Global Health*, 84(2), 300-
2290 305.
2291

- 2292 **9. Anexos**
- 2293 *9.1. Anexo 1: Fórmulas de medios de cultivo*
- 2294 **9.1.1. Concentrado Czapek**
- 2295 - 30 g NaNO₃
- 2296 - 5 g KCl
- 2297 - 5 g MgSO₄ · 7H₂O
- 2298 - 0.1 g FeSO₄ · 7H₂O
- 2299 - Aforar con agua destilada a 100 ml
- 2300 **9.1.2. Concentrado CS**
- 2301 - 5 g KCl
- 2302 - 5 g MgSO₄ · 7H₂O
- 2303 - 0.1 g FeSO₄ · 7H₂O
- 2304 - 0.1 g ZnSO₄ · 7H₂O
- 2305 - 0.05 g CuSO₄ · 5H₂O
- 2306 - Aforar con agua destilada a 100 ml
- 2307 **9.1.3. Agar nitrato con 25% de glicerol**
- 2308 - 0.75 g K₂HPO₄
- 2309 - 0.75 g K₂HPO₄
- 2310 - 7.5 ml Concentrado Czapek
- 2311 - 3.7 g Extracto de levadura

2312 - 250 g Glicerol anhidro

2313 - 12 g Agar

2314 - 750 ml Agua destilada

2315 **9.1.4. Agar neutro de creatina sacarosa**

2316 - 10 ml Concentrado CS

2317 - 10 g Sacarosa

2318 - 5.0 g Creatina

2319 - 1.0 g KH_2PO_4

2320 - 0.05 g Púrpura de bromocresol

2321 - 15 g Agar

2322 - Aforar con agua destilada a 1 L

2323 **9.1.5. Agar de leche de coco**

2324 - 500 g Leche de coco comercial sin conservadores

2325 - 500 ml Agua destilada

2326 - 15 g Agar

2327