

Combinación de la hoja de aguacate (*Persea americana*) y temperaturas de calentamiento sobre *Listeria monocytogenes*

Hernández-Cruz, V.¹, Cira-Chávez, L.A.² y Minor-Pérez, H.¹

¹División de ingeniería Química y Bioquímica, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Av. Tecnológico s/n Esq. Av. Carlos Hank González (Av. Central), Col. Valle de Anáhuac, C. P. 55210, Ecatepec de Morelos, Estado de México, México, E.mail: hminor@tese.edu.mx.

²Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 sur, Col. Centro. CP 85000 (PO Box 541), Cd. Obregón, Sonora, México

Palabras Clave: Hoja de aguacate (*Persea americana*), procesos de conservación, *Listeria monocytogenes*,

Introducción

La hoja de aguacate (*Persea americana*), es un subproducto natural con compuestos bioactivos y antioxidantes. Algunos compuestos fenólicos tienen capacidad/actividad antimicrobiana para inhibir bacterias patógenas de interés alimentario [1,2,3]. Investigaciones realizadas han demostrado que las hojas de la planta, pueden tener actividad antimicrobiana en combinación con temperaturas de calentamiento, para mejorar la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas indicadoras [4], lo cual puede contribuir a reducir el uso de conservadores químicos. La condición anterior puede ser utilizada en el diseño de procesos de conservación de alimentos sometidos a tratamientos térmicos. De esta forma se puede contribuir a satisfacer las necesidades de los consumidores relacionadas con alimentos sanos y seguros. En el estudio de la microbiología predictiva de alimentos, se han incluido en las últimas décadas, herramientas de análisis e.g. el uso de la estadística que evalúa diversos modelos. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto combinado de la hoja de aguacate (HA) a diferentes concentraciones (0 g/mL, 0.05 g/mL y 0.1 g/mL), el pH 3,5,7 y 9, sobre el control de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 a una temperatura de subpasteurización de 55°C.

Metodología

**Preparación de la hoja de aguacate.*

La HA se sometió a un proceso de secado a 40°C en un horno de charolas (Felisa FE-294AD, México) durante 48 h. La muestra se molió en una licuadora convencional por 5 min hasta obtener una harina homogénea.

**Listeria monocytogenes* NCTC 11994 y condiciones de crecimiento.

Listeria monocytogenes NCTC 11994 pertenece a la colección microbiana de la Universidad de Murcia, España. Durante este estudio la cepa se conservó en crioviales a -80°C. Ésta se sembró por estría cruzada en medio TSAYE (Tryptic Soy Broth, Bioxon, México) suplementado con 0.6% de extracto de levadura (w/v Bioxon, México) y 1.5% de agar bacteriológico (w/v Bioxon, México). La muestra se incubó a 37°C por 24 h. Una colonia de la bacteria control se utilizó para inocular en caldo TSBYE (Tryptic Soy Broth, Bioxon, México) con 0.6% de extracto de levadura (w/v Bioxon, México) y se incubó a 37°C por 12 h. Se tomaron 100 µL de este pre-cultivo para ser inoculados en 5 mL de TSBYE y la muestra se incubó durante 24 h 37°C para obtener el cultivo de estudio.

**Análisis microbiológico.* El cultivo de *Listeria monocytogenes* se diluyó en agua peptonada y se vació un volumen de 100 µL en tubos Eppendorf con 900 µL de una solución

amortiguadora de citrato-fosfato a los diferentes valores de pH. Las combinaciones y repeticiones se obtuvieron de un diseño completamente aleatorizado. Los valores de las variables fijas analizadas fueron: pH 3, 5, 7 y 9 y concentración de HA: 0 g/mL, 0.05 g/mL y 0.1 g/mL. Todos los tratamientos se mantuvieron en agitación a 350 rpm en un vortex (Labnet, EUA) durante 1 min. Las muestras se sumergieron en un baño de temperatura controlada (Polystat Temperature Controller, Cole-Parmer, USA) a una temperatura de 55°C. Las cuentas microbianas se realizaron a los tiempos de 0 min, 7.5 min, 15 min, 22.5 min y 30 min. Se empleó la técnica de gota [5] para cuantificar las poblaciones microbianas.

*Análisis estadístico.

Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) y una comparación múltiple de medias con la prueba de Duncan, utilizando el paquete estadístico SAS System, Windows™ Versión 6.12, USA. Además, se realizó una prueba de comparación de medias con la prueba de Bonferroni con el paquete estadístico de GraphPad PRISM, Versión 5.00, 2017. San Diego, California, USA. En esta prueba se utilizó con un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

Resultados y discusión

El análisis estadístico (Tablas 1, 2 y 3) muestra que los modelos lineales evaluados tuvieron un efecto significativo ($P<0.0001$) sobre la variable respuesta (Log UFC/mL de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994). Los modelos describen la influencia de los factores investigados en forma independiente: tiempo (A), concentración de HA(B) y pH(C), y el efecto de las interacciones (A*B), (A*C), (B*C) y (A*B*C). De las cuales se observó un efecto significativo del tiempo (A), concentración de HA (B), pH (C) y de las interacciones de (A*B), (A*C), (B*C) y (A*B*C). Los valores F_0 para los parámetros de cada modelo fueron útiles para explicar el grado de significancia de los efectos de las variables y sus interacciones (Tabla 3). A la temperatura de 55°C y en presencia de HA el parámetro que tuvo un mayor efecto significativo fue el pH (C). El segundo parámetro más significativo fue el tiempo (A). El tercer valor más significativo fue la concentración de HA. Las interacciones también tuvieron un efecto significativo teniendo con mayor significancia a la interacción de (A*C). Esto significa que los cambios de pH a la temperatura de 55°C tienen el mayor efecto sobre la inhibición de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994. Estos resultados muestran que la HA tiene actividad antimicrobiana en combinación con las variable de estudio de temperature. para tener una inhibición significativa de la bacteria control de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994.

Las Figuras 1a, b, c y d, muestran los resultados sobre inhibición de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 con la combinación de las variables de estudio a una temperatura de 55°C. En la Figura 1a (pH3), Tabla 4, se observa al comparar (0 g/mL vs 0.5 g/mL) no hubo una diferencia significativa ($P>0.05$) para ninguno de los tiempos de estudio. Se observó a los 7.5 y 15 min una diferencia significativa ($P<0.001$) al comparar el control de (0 g/mL vs 0.1 g/mL) para *Listeria monocytogenes* NCTC 11994. Al comparar el control de 0.05 g/mL vs 0.1 g/mL de HA, hubo una diferencia significativa ($P<0.001$), a los 7.5 min y 15 min. En la Figura 1b (pH5), Tabla 4, se observó una reducción significativa ($P<0.001$) de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 a los 30 min de tratamiento al comparar el tratamiento de (0 g/mL vs 0.1 g/mL). Al comparar las poblaciones de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 entre los tratamientos de [0.05 g/mL vs 0.1 g/mL] de HA, no hubo diferencia significativa ($P<0.05$). En la Figura 1c (Tabla 4), para el tratamiento de (pH 7.0) hubo una diferencia altamente significativa ($P<0.001$) entre el control y las muestras con HA de (0.05 g/mL y 0.01 g/mL) a los 15, 22.5 y 30 min. No hubo diferencia significativa entre los tratamientos de (0.05 g/mL vs 0.01 g/mL). En la mayoría de los tratamientos a (pH 9.0) en la Figura 1d, Tabla 4, no hubo diferente significativa. Sólo a los 30 min se observó diferencia significativa

($P > 0.001$) entre el control y los tratamientos de (0.05 g/mL y 0.1 g/mL) para *Listeria monocytogenes* NCTC 11994.

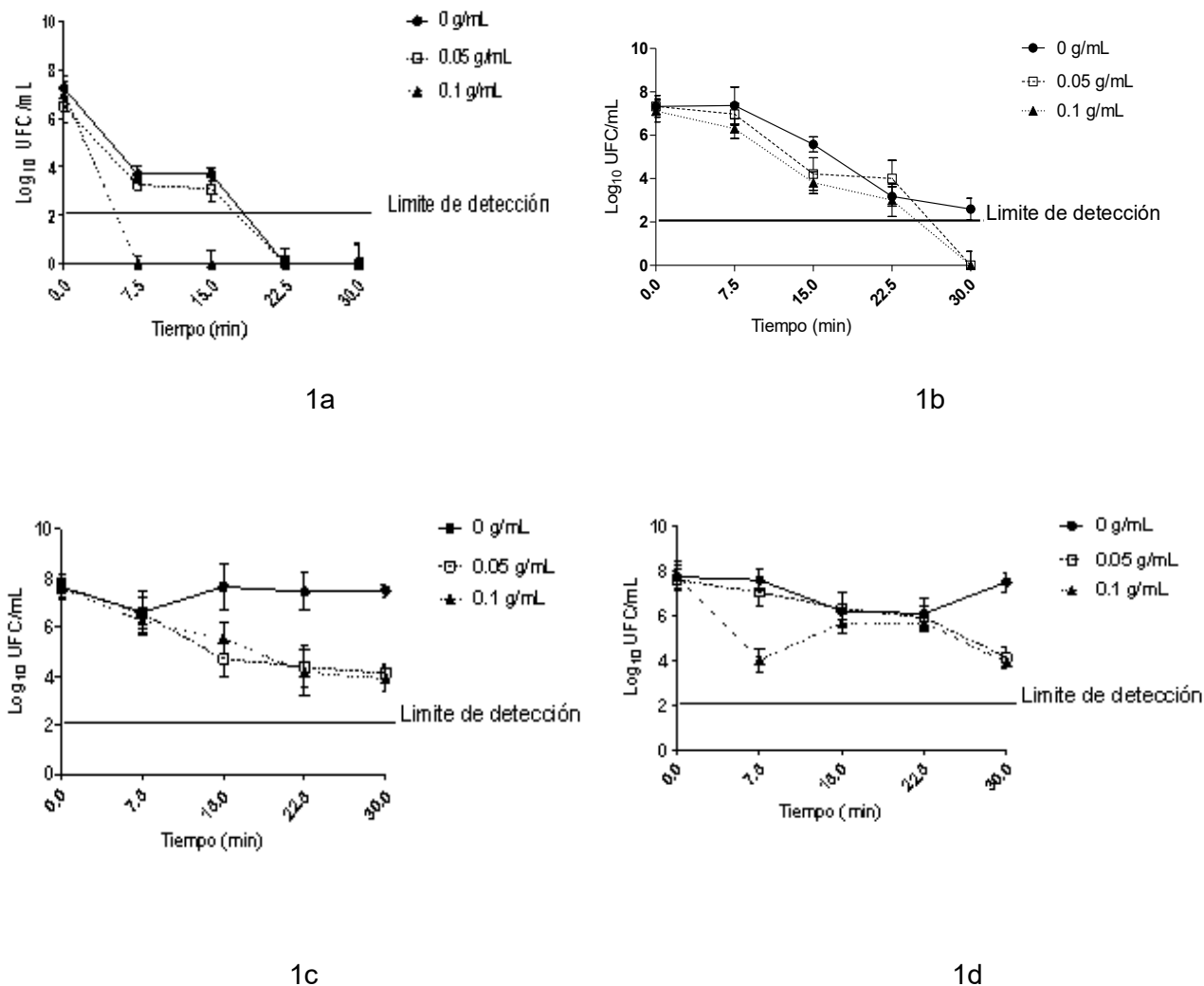


Figura 1. Efecto de la combinación del 1a(pH3), 1b(pH5), 1c(pH7), 1d(pH9), y la concentración de la hoja de aguacate (HA, *Persea americana*), (0 g/mL, 0.5 g/mL y 0.05 g/mL) a una temperatura de 55°C sobre *Listeria monocytogenes*. (*) El límite de detección para la cuenta en placa es 2 ciclos logarítmicos

Tabla 1. ANOVA para el efecto de las variables fijas: tiempo (0.0 min, 7.5 min, 15 min, 22.5 min y 30 min). Concentración de hoja de aguacate (0 g/mL, 0.05 g/mL y 0.1 g/mL) y pH (3,5,7 y 9) sobre la variable respuesta: Log UFC/mL de *Listeria monocytogenes* a 55°C.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > f
Modelo	59	767.04440409	13.00075261	114.55	0.0001
Error	60	6.80953650	0.11349228		
Total	119	773.85394059			
R-Square=		0.991200			

*Los valores de "Prob > F" menores que 0.050 indican que los parámetros evaluados son significativos

Tabla 2. ANOVA para el efecto de las variables fijas: tiempo (0.0 min, 7.5 min, 15 min, 22.5 min y 30 min). Concentración de hoja de aguacate (0 g/mL, 0.05 g/mL y 0.1 g/mL) y pH (3,5,7 y 9) y las interacciones sobre la variable respuesta: Log UFC/mL de *Listeria monocytogenes* 55°C.

Fuente de variación	Valor de F	Pr > F
A-Tiempo	627.72	0.0001
B-Concentración de muestra	174.75	0.0001
C-pH	841.66	0.0001
A*B	21.63	0.0001
A*C	69.05	0.0001
B*C	12.64	0.0001
A*B*C	12.32	0.0001

*Los valores de "Prob > F" menores que 0.050 indican que los parámetros evaluados son significativo

Tabla 3. Prueba de Duncan para el efecto de las variables fijas: tiempo (0.0 min, 7.5 min, 15 min, 22.5 min y 30 min). Concentración de hoja de aguacate (0 g/mL, 0.05 g/mL y 0.1 g/mL) y pH (3,5,7 y 9) sobre la variable respuesta: Log UFC/mL de *Listeria monocytogenes* a la temperatura de 55°C.

Tiempo (min)	Promedio de Log UFC/mL de <i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	Prueba de Duncan*	Concentración de cáscara (g/mL)	Promedio de Log UFC/mL de <i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	Prueba de Duncan*	pH	Promedio de Log UFC/mL de <i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	Prueba de Duncan*
0	7.30967	A	0.0	5.50940	A	9	6.25430	A
7.5	5.36763	B	0.1	4.63990	B	7	5.91277	B
15	4.65496	C	0.05	4.11528	C	5	4.52900	C
22.5	3.57858	D				3	2.32337	D
30	2.86346	E						

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes con una $\alpha = 0.05$

Tabla 4. Prueba de Bonferroni para la comparación del efecto de la concentración de hoja de aguacate (HA) (0 g/mL, 0.05 g/mL y 0.1 g/mL), pH 3, 5, 7 y 9) y el tiempo sobre la variable respuesta: Log UFC/mL de la cepa de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 a la temperatura de 55°C.

Cepa control	Variables fijas	Tiempo (min)	Tratamientos a comparar con la prueba de Bonferroni	Valor de P	Significancia	
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	pH 3.0	0	0 g/mL vs 0.05 g/mL	P>0.05	ns	
		7.5		P>0.05	ns	
		15		P>0.05	ns	
		22.5		P>0.05	ns	
		30	0 g/mL vs 0.1 g/mL	P>0.05	ns	
		0		P>0.05	ns	
		7.5		P<0.001	***	
		15		P<0.001	***	
		22.5	0.05 g/mL vs 0.1 g/mL	P>0.05	ns	
		30		P>0.05	ns	
		0		P>0.05	ns	
		7.5		P<0.001	***	
	15	0 g/mL vs 0.05 g/mL	P<0.001	***		
	22.5		P>0.05	ns		
	30		P>0.05	ns		
	0		P>0.05	ns		
	pH 5.0	pH 5.0	0	0 g/mL vs 0.05 g/mL	P>0.05	ns
			7.5		P>0.05	ns
			15		P<0.01	**
			22.5		P>0.05	ns
		30	0 g/mL vs 0.1 gm/L	P<0.001	**	
		0		P>0.05	ns	
		7.5		P>0.05	ns	
		15		P<0.01	**	
		22.5	0.05 g/mL vs 0.1 g/mL	P>0.05	ns	
		30		P<0.001	***	
		0		P>0.05	ns	
		7.5		P<0.05	*	
	15	0 g/mL vs 0.05 g/mL	P>0.05	ns		
	22.5		P>0.05	ns		
	30		P>0.05	ns		
	0		P>0.05	ns		
	pH 7.0	pH 7.0	0	0 g/mL vs 0.05 g/mL	P>0.05	ns
			7.5		P>0.05	ns
			15		P<0.001	***
			22.5		P<0.001	***
		30	0 g/mL vs 0.1 gm/L	P<0.001	***	
		0		P>0.05	ns	
		7.5		P>0.05	ns	
		15		P<0.001	***	
		22.5	0.05 g/mL vs 0.1 g/mL	P<0.001	***	
		30		P<0.001	***	
		0		P>0.05	ns	
		7.5		P<0.05	ns	
	15	0 g/mL vs 0.05 g/mL	P>0.05	ns		
	22.5		P>0.05	ns		
	30		P>0.05	ns		
	0		P>0.05	ns		
pH 9.0	pH 9.0	0	0 g/mL vs 0.05 g/mL	P>0.05	ns	
		7.5		P>0.05	ns	
		15		P>0.05	ns	
		22.5		P>0.05	ns	
	30	0 g/mL vs 0.1 gm/L	P>0.001	***		
	0		P>0.05	ns		
	7.5		P<0.001	***		
	15		P>0.05	ns		
	22.5	0.05 g/mL vs 0.1 g/mL	P>0.05	ns		
	30		P>0.05	ns		
	0		P<0.001	***		
	7.5		P>0.05	ns		
15	0 g/mL vs 0.05 g/mL	P<0.001	***			
22.5		P>0.05	ns			
30		P>0.05	ns			
0		P>0.05	ns			
7.5	0.05 g/mL vs 0.1 g/mL	P<0.001	***			
15		P>0.05	ns			
22.5		P>0.05	ns			
30		P>0.05	ns			

*Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes con una $\alpha = 0.05$ ns: no significativo; *** altamente significative

Conclusiones

En las condiciones experimentales evaluadas a pH 3,5,7 y 9 se encontró un efecto significativo sobre la inhibición de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 y a la temperatura de 55°C en presencia de diferentes concentraciones de HA (g/mL). La mayor inhibición microbiana se observó a valores de pH ácidos de 3, hasta una reducción a 2 ciclos logarítmicos con respecto a una población inicial 8 ciclos.

Referencias

- [1] Barrientos-Priego A. F., López-López, L. (2000). Historia y genética del aguacate. el aguacate y su manejo integrado. Téliz, D.; González, H, 19-31.
- [2] García Moreno, M. Á. (2017). *Efecto de los polifenoles de las hojas de aguacate mexicano (Persea americana var. Drymifolia) en la expresión génica de Staphylococcus aureus resistente a metilina* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León). eprints.uanl.mx/14127/1/1080226627.pdf
- [3] García J., Morales L. L. J., Mendoza A. R. M., Coria M. M. V., Aguirre P. L. J., Sánchez F. J. L., Alcántar, J. J. (2013). Tecnología Produce Aguacate en Michoacán.
- [4] Bastida-Murrieta A. L., Marin-Iniesta F., Minor-Pérez, H. 2017. Efecto de la combinación de la hoja de aguacate (*Persea americana*), pH (4,6 y 8) y temperaturas de congelación/refrigeración sobre el control de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994. *Investigaciones en Ciencia e Inocuidad de Alimentos*. Primera Edición. ISBN 978-607-8490-35
- [5] Miles A. A., Misra S.S., Irwin J.O. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg*, 38, 732-749.