

## Efecto de la combinación hoja de lima/tratamiento térmico sobre la inhibición/crecimiento de *Listeria monocytogenes*

Cerón-Mejía, J.C.<sup>1</sup>, Pérez-Vargas, J.<sup>2</sup> y Minor-Pérez, H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>División 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. Correo: hminor@tese.edu.mx

**Palabras clave:** Hoja de lima dulce, tratamientos térmicos, *Listeria monocytogenes*, temperatura de subpasteurización (TSP)

### Introducción

Los frutos cítricos son una fuente de compuestos biológicamente activos, como vitaminas, carotenoides, compuestos fenólicos, flavanonas o antocianinas [1, 2]. La mayor parte de la industrialización y uso de los cítricos se encuentra en la extracción de jugo, que representa con estas frutas de alrededor del 60% de la producción total de jugos [1]. En general el rendimiento de jugo de frutas cítricas es de menos de la mitad del peso. Los subproductos como la cáscara o la hoja de lima dulce (HDL) son una fuente importante de compuestos como los polifenoles [3]. El uso de semillas, bagazo y hojas de cítricos como fuente de polifenoles puede tener considerables beneficios económicos para los procesadores de alimentos. Algunos de estos compuestos tienen actividad/capacidad antioxidante o antimicrobiana [3, 2]. Varios estudios mencionan actividad antimicrobiana de extractos metanólicos, etanólicos o acuosos de jugo, bagazo o semilla de lima dulce (*Citrus limmeta*) y de lima (*Citrus reticulata*) sobre bacterias como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* [2, 4]. Un estudio [2] sobre los fenoles totales, flavonoides totales, hesperidina y ácido ascórbico en muestras de bagazo, jugo y semilla de lima dulce, sugiere que estos compuestos tienen actividad bactericida sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Estos subproductos pueden emplearse en combinación de temperaturas de subpasteurización (TSP). Estas temperaturas (TSP, e.g. 55°C) pueden contribuir a reducir algunos efectos indeseables en las propiedades nutricionales o sensoriales de los alimentos. En este estudio se evaluó la inhibición/crecimiento de *Listeria monocytogenes* con la combinación de diferentes concentraciones de HLD/pH (3, 5, 7 y 9) a una temperatura de 55°C.

### Metodología

*\*Preparación de la muestra de hoja de lima dulce (Citrus limmeta).* Las muestras de la lima dulce (*Citrus limmeta*) se obtuvieron en “Central de Abastos de Ecatepec” en el Estado de México, México.. Se eliminaron las impurezas y muestras de hoja de lima dulce (*Citrus limmeta*) se sometieron a un proceso de lavado y desinfección por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (5%, v/v) durante 30 s [6]; para eliminar el exceso de hipoclorito se dejaron las muestras a temperatura ambiente durante 12 h. Las muestras en base húmeda (bh) obtenidas se sometieron a secado a una temperatura de 40°C/48 h en un horno de charolas (Felisa FE-294AD, México). Posteriormente se molieron en una licuadora convencional durante 5 min. Se tamizaron, hasta obtener un tamaño de partícula de 0.42 mm y se guardaron en bolsas de polietileno estériles a una temperatura de -20°C.

\**Listeria monocytogenes* NCTC 11994 y condiciones de crecimiento. *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 pertenece a la colección microbiana de la Universidad de Murcia, España. Se preparó un cultivo de estudio a una temperatura de incubación de 37°C. El cultivo de estudio tuvo una concentración inicial de 8 ciclos logarítmicos.

\**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. Los valores de las variables fijas analizadas fueron: pH 3,5,7 y 9, concentración de hoja de lima dulce (HLD): 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 55°C. Las cuentas microbianas se realizaron a los tiempos de 0 min, 15 min y 30 min en incubación a 37°C. Se empleó la técnica de gota [5] para cuantificar las poblaciones microbianas. Además, se realizó un análisis de la inhibición (%) y el crecimiento (%) en los diferentes tratamientos evaluados.

\**Análisis estadístico.* Los resultados se sometieron a un ANOVA y a una prueba de Duncan, utilizando el paquete estadístico SAS System, Windows™ Versión 6.12, USA.

### Resultados y discusión

Las Figuras 1 y 2 muestran el efecto de la HLD a diferentes concentraciones sobre *Listeria monocytogenes* a los tiempos de 0 min y 30 min. Se observó una reducción en las poblaciones de la bacteria control a los 30 min y una concentración de 0.05 g/mL. En las Tablas 1, 2 y 3 se muestra que el modelo lineal propuesto tuvo 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: pH (A), tiempo (C) y la concentración de HLD (B) y el efecto de las interacciones (A\*B, A\*C, B\*C y A\*B\*C). Se observó un efecto significativo del tiempo, concentración de HLD, pH y las interacciones en los tratamientos evaluados (Tabla 2). El coeficiente de determinación para el modelo lineal de estudio a 55°C indica que el 2.7644 de la variación total en la respuesta no puede ser explicado por el modelo desarrollado. 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 2). A la temperatura de 55°C el parámetro que tuvo un mayor efecto significativo fue el pH. El segundo parámetro más significativo fue el tiempo y la concentración de HLD. Esto significa que los cambios de pH a la temperatura de 55°C tienen el mayor efecto significativo de inhibición sobre *Listeria monocytogenes* NCTC 11994. Este comportamiento puede ser explicado debido a que conforme la cepa control es expuesta durante mayor tiempo a la temperatura de 55°C posiblemente tenga daño de estructuras celulares como su membrana, lo cual provoca inactivación. Las Figuras 3 y 4 muestran los resultados de la Inhibición (%) y el crecimiento (%) a los 30 min de estudio. Se observa inhibición en los tratamientos de 0.05 g/mL de HLD a pH de 5,7 y 9. El mayor crecimiento se observó en la concentración de HLD de 0.05 g/mL a un pH de 3.0. La prueba de Duncan (Tablas 3) que la menor población de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 se obtuvo a pH 5.0 hasta valores de 4.380 ciclos logarítmicos. La menor población de la bacteria control se obtuvo a una concentración de HLD de 0.1 g/mL con valores de 5.355 ciclos logarítmicos.

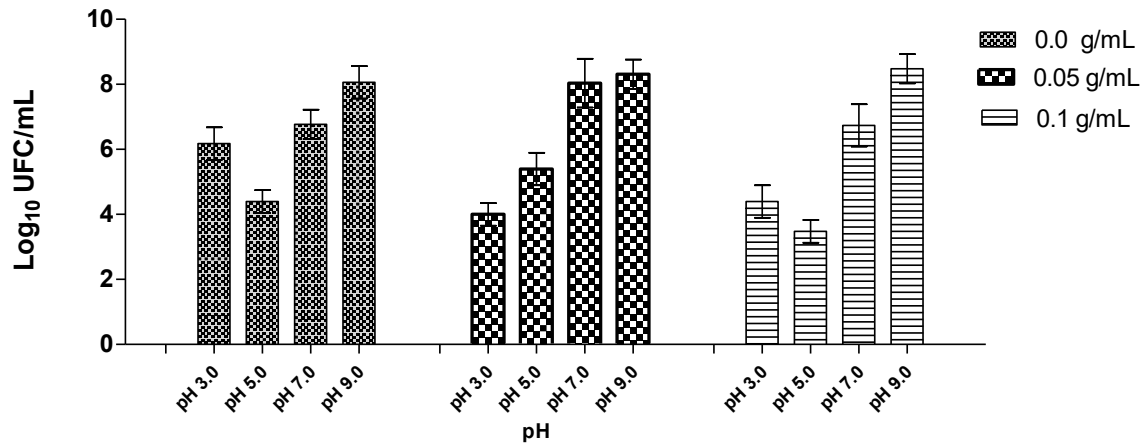


Figura 1. Efecto combinado del pH, la concentración de hoja de Lima dulce (*Citrus limmeta*, HLD) y el tiempo (0 min) sobre *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 a un tratamiento térmico de 55°C.

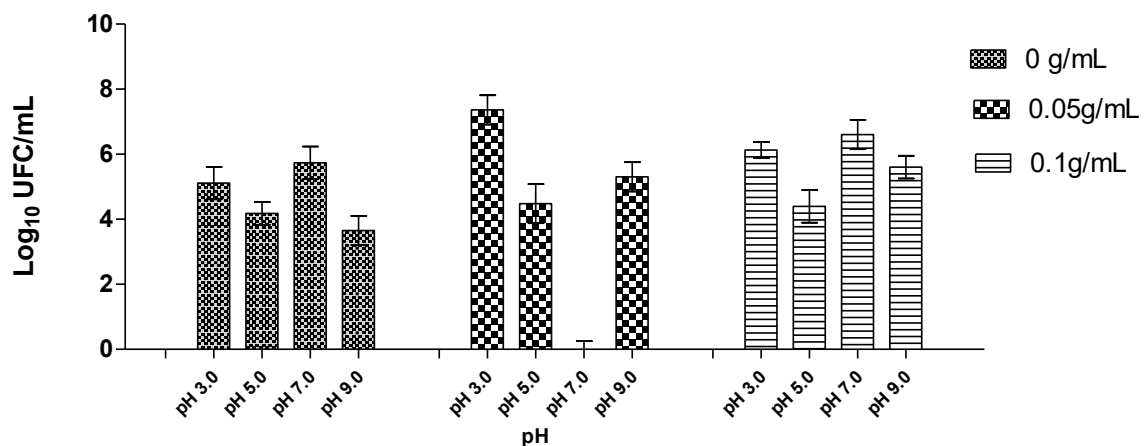
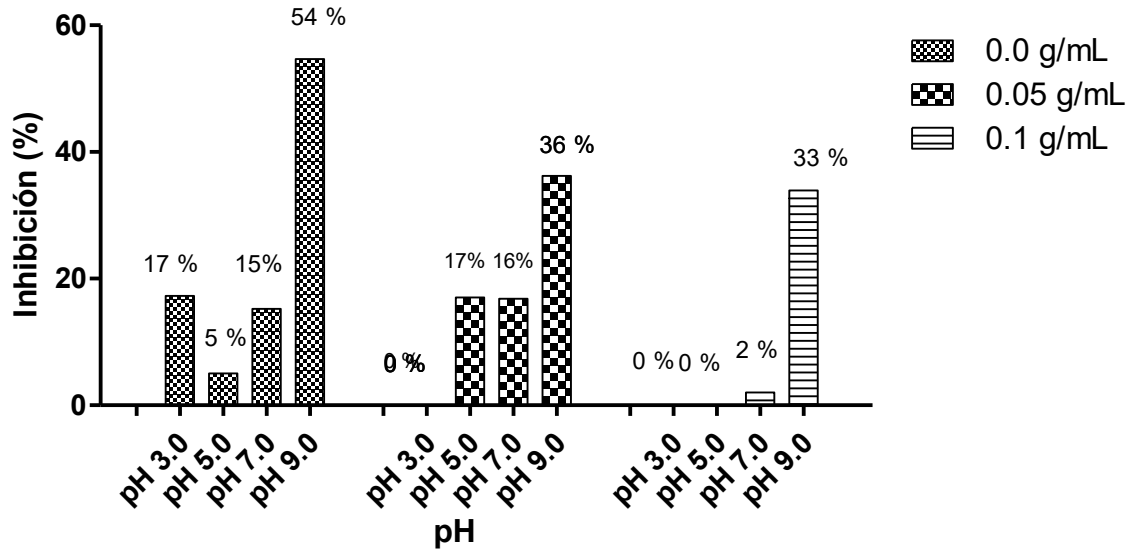
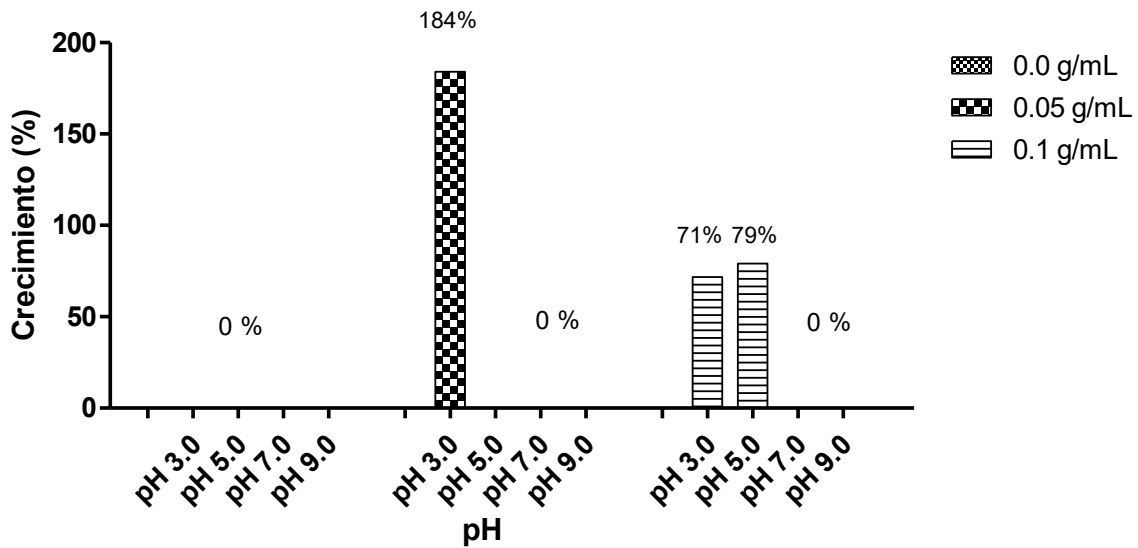


Figura 1. Efecto combinado del pH, la HLD y el tiempo (30 min) sobre *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 a un tratamiento térmico de 55°C.



**Figura 2.** Efecto combinado del pH, la HLD y el tiempo (30 min) sobre la Inhibición (%) de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 a un tratamiento térmico de 55°C.



**Figura 3.** Efecto combinado del pH, la HLD y el tiempo (30 min) sobre el Crecimiento (%) de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 a un tratamiento térmico de 55°C.

**Tabla 1.** ANOVA para el efecto del pH, la concentración de hoja de lima dulce (*Citrus limmeta*) y el tiempo (min) sobre el control de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 con un tratamiento térmico a 55°C. \*\*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > f*
Modelo	22	102.0387	4.6381	36.77	0.0001
Error	23	2.0009	0.1261		
Total	45	104.9397			
R-Square= 0.972356					

\*Los valores de "Prob > F" menores que 0.0001 indican que los parámetros evaluados son significativos

\*\*La ANOVA se realizó comparando los promedios de Log UFC/mL para los diferentes tratamientos

**Tabla 2.** ANOVA para el efecto de los factores: pH, concentración de HLD (g/mL) y tiempo (min) sobre el control de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 con un tratamiento térmico a 55°C. \*\*

Fuente de variación	Valor de F	Pr > f*
<b>Temperatura: 55°C</b>		
<b>A</b> -pH	89.96	0.0001
<b>B</b> -- HLD	15.49	0.0001
<b>C</b> - Tiempo	49.64	0.0001
<b>A*B</b> – pH*HLD	3.03	0.0249
<b>A*C</b> – pH*Tiempo	104.86	0.0001
<b>A*B*C</b> –	14.36	0.0001
pH*HLD*Tiempo	26.98	0.0001
<b>B*C</b> - HLD*Tiempo		

\*Los valores de "Prob > F" menores que 0.0001 indican que los parámetros evaluados son significativos

\*\*La ANOVA se realizó comparando los promedios de Log UFC/mL para los diferentes tratamientos

**Tabla 3.** Prueba de Duncan para la comparación del efecto del pH, la concentración de HLD y el tiempo (min) sobre *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 con un tratamiento térmico a 55°C.\*\*

pH (3,5,7 y 9)	Promedio (Log UFC/mL)	Prueba de Duncan*	Temperatura: 55°C		Prueba de Duncan*	Tiempo (0 min y 30 min)	Promedio (Log UFC/mL)	Prueba de Duncan*
			Concentración de HLD (g/mL)	Promedio (Log UFC/mL)				
7	6.598	A	0.05	6.033	A	0	5.995	A
9	6.308	A	0	5.503	B	30	5.257	B
3	5.441	B	0.1	5.355	B			
5	4.380	C						

\*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes con una  $\alpha = 0.0$

\*\*La ANOVA se realizó comparando los promedios de Log UFC/mL para los diferentes tratamientos

## Conclusiones

En las condiciones experimentales evaluadas se encontró un efecto significativo sobre el control de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 con los parámetros de estudio. Se observó en una reducción significativa de las poblaciones de la bacteria control a la de temperatura de subpasteurización de 55°C en los tratamientos con 0.05 g/mL de la HLD a los 30 min.

## Bibliografía

- [1] Pérez-Nájera V. C., Lugo-Cervantes E. C., Gutiérrez-Lomelí M., Del-Toro-Sánchez, C. L. (2013). Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta* Risso) y determinación de su actividad antioxidante. *Biotecnia*, 15(3), 18-22. <https://doi.org/10.18633/bt.v15i3.153>
- [2] Damián-Reyna A.A., González-Hernández J. C., Maya-Yescas R. de J., Cortés-Penagos C. del C., Chávez-Parga Ma. (2017). Polyphenolic content and bactericidal effect of Mexican *Citrus limetta* and *Citrus reticulata*. *J. Food Sci. Technol.*, 54(2), 531–537. doi:10.1007/s13197-017-2498-7
- [3] Ordoñez-Gómez E.S., Reátegui-Díaz D., Villanueva-Tiburcio J.E. (2018). Polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y hojas de doce cítricos. *Scientia Agrope.*, 9(1):113-121. doi: <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.01.13>
- [4] Unnisa, N., Tabassum, H., Ali, M. N., & Ponia, K. (2012). Evaluation of antibacterial activity of five selected fruits on bacterial wound isolates. Pomegranate (*Punica granatum* L.), 10(11), 12. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.642.4120&rep=rep1&type=pdf>
- [5] Miles A.A., Misra S.S., Irwin J.O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg*, 38 (6): 732–49.
- [6] Fukuzaki, S. (2006). Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Bioc. Scien.*, 11(4), 147-157.