

Efecto de la cáscara de Limón, pH y temperaturas de congelación/refrigeración sobre *Listeria monocytogenes*

Jiménez Barrera, C. G.¹ 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: hminorperez@yahoo.com.mx.

²Universidad de Murcia, España.

Palabras clave: Limón persa (*Citrus latifolia*), antioxidantes, *Listeria monocytogenes*

Introducción

Actualmente México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en la producción de limón (persa y mexicano). Esta condición provoca que se generen una gran cantidad de subproductos que generalmente, son desechados empleando solamente para el consumo humano el jugo del fruto. Los subproductos como el hueso, el bagazo o la cáscara, así como las hojas de la planta, pueden ser una buena fuente de compuestos bioactivos. Los cítricos constituyen un género de plantas con alta concentración de antioxidantes [1] como los flavonoides, metabolitos secundarios que debido a su efecto antioxidante y baja toxicidad, pueden tener potencial de uso en el diseño y desarrollo de alimentos funcionales [2]. Algunos antioxidantes de naturaleza fenólica tienen actividad antimicrobiana sobre bacterias gram (+) y gram (-) [3]. Varios estudios mencionan [3] actividad bactericida de compuestos fenólicos contra *Escherichia coli* y en general sobre microorganismos coliformes psicrófilos. El limón (jugo) tiene propiedades antimicrobianas contra microorganismos patógenos, como el *Staphylococcus aureus* [4,5]. También se le han comprobado propiedades antifúngicas contra microorganismos patógenos, e.g. *Candida albicans*. La actividad antimicrobiana del limón es atribuida a un componente mayoritario: limoneno [4]. Sin embargo, otros compuestos, tales como a-pineno, p-pineno, a-terpineno, P-mirceno, trans-a-clmeno, citral, pueden ejercer efectos antagonísticos o sinérgicos en su actividad antimicrobiana [7]. En este estudio se evaluó *in vitro* la actividad antimicrobiana de la cáscara de Limón persa (*Citrus latifolia*) CLP sobre a *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 con la combinación de pH y temperaturas de congelación/refrigeración.

Metodología

***Preparación de la cáscara de limón.** La CLP 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 del programa Design-Expert, utilizando un diseño estadístico de punto central. Los valores de las variables fijas analizadas fueron: pH 4,6 y 8, concentración de CLP: 0 g/mL, 0.05 g/mL y 0.1 g/mL y la temperatura de -15°C, -5°C y 5°C. Todos los tratamientos se mantuvieron en agitación a 350 rpm en un vortex (Labnet, EUA) durante 1 min. Las cuentas microbianas se realizaron a los tiempos de 0 d y 10 d en incubación a 37°C. Se empleó la técnica de gota [6] para cuantificar las poblaciones microbianas.

*Análisis estadístico. Los resultados fueron analizados utilizando el programa estadístico Design-Expert Versión 6.0.6, 2002, Minneapolis, EUA.

Resultados y discusión

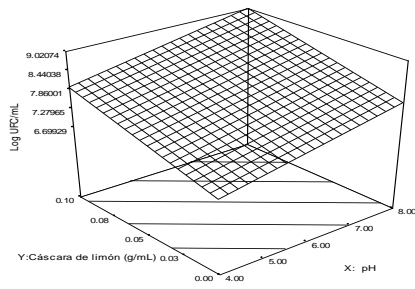
El análisis estadístico muestra que los resultados experimentales (Figura 1) se ajustaron a un modelo lineal, y cuadráticos, para los tiempos de almacenamiento de 0 d, 10 d y 30 d respectivamente. Estos modelos describen la influencia de los factores investigados en forma independiente: pH, concentración de cáscara de Limón (CLP) en g/mL y temperatura (T) °C; el efecto de las interacciones: T*pH, T*CLP y pH*CLP y el efecto de los cuadrados: T², pH² y C². La ecuación obtenida para el tiempo de 0 d es $Y(\text{Log UFC/mL}) = +7.86 + 0.54 \cdot \text{pH} - 0.12 \cdot \text{CLP}$. Para el tiempo de 10 d se obtuvo la ecuación $Y(\text{Log UFC/mL}) = -22.75865 + 7.29462 \cdot \text{pH} + 81.59927 \cdot \text{CLP} + 0.19182 \cdot T - 0.48115 \cdot \text{pH}^2 - 356.45907 \cdot \text{CLP}^2 + 0.020754 \cdot T^2 - 3.72312 \cdot \text{pH} \cdot \text{CLP} + 0.010973 \cdot \text{pH} \cdot T + 0.64610 \cdot \text{CLP} \cdot \text{Temperatura}$ y para el tiempo de almacenamiento de 30 d la ecuación es $Y(\text{Log UFC/mL}) = -2.71068 + 0.56649 \cdot \text{pH} + 177.31618 \cdot \text{CLP} - 0.075823 \cdot T + 0.046033 \cdot \text{pH}^2 - 1126.16654 \cdot \text{CLP}^2 + 7.86634 \cdot 10^{-3} \cdot T^2 - 12.03069 \cdot \text{pH} \cdot \text{CLP} + 0.034835 \cdot \text{pH} \cdot T - 0.79039 \cdot \text{CLP} \cdot T$. Los coeficientes de determinación para el tiempo de almacenamiento de 0 d y 10 d indican que el 27.6%, 10.09% y el 42.2% respectivamente de la variación total en la respuesta no se puede explicar por los modelos desarrollados. Los valores F-Modelo fueron 4.70, 17.81 y 2.74 respectivamente, estos valores indican que los modelos lineal y cuadráticos para los tiempos de 0 d, 10 d y 30 d fueron significativos ($p > 0.05$). Los valores F₀ para los parámetros de cada modelo fueron útiles para explicar el grado de significancia de los efectos de las variables y sus interacciones; para el tiempo de 0 d el parámetro que tuvo un mayor efecto significativo fue la CLP. El segundo parámetro más significativo fue el pH y no hubo efecto significativo de la temperatura. A los 10 d de almacenamiento el pH tuvo el mayor efecto significativo sobre la variable respuesta. El segundo parámetro con más significancia fue la CLP y por último el pH. Esto significa que los cambios en pH tienen un efecto significativo sobre la inactivación de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994.

A los 30 d de almacenamiento la interacción pH*CLP tuvo el mayor efecto significativo sobre la variable respuesta. No hubo un efecto significativo de los parámetros de estudio (pH, CLP y T) en forma independiente. La temperatura de -15°C y el pH a los 10 días de almacenamiento provocaron la inhibición microbiana mayor.

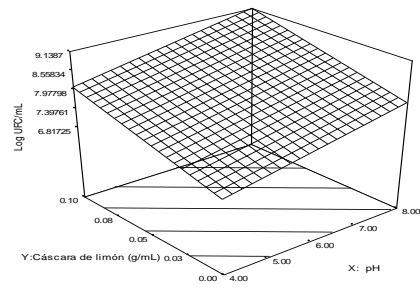
Este comportamiento puede ser explicado posiblemente a que en la temperatura de -15°C las bacteria de *Listeria monocytogenes* NCTCT 11994 puede sufrir daño subletal. La bacteria sufre daños que no la inactivan pero la hacen tener cambios como alteración en la membrana celular que las hace más sensibles a los agentes antimicrobianos.

Conclusiones

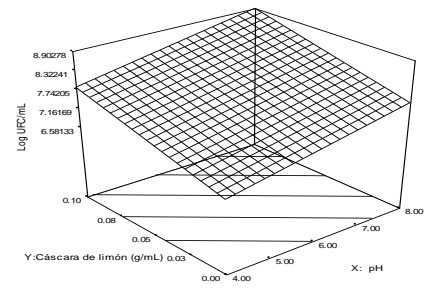
En las condiciones experimentales evaluadas se encontró un efecto significativo sobre la inhibición de *Listeria monocytogenes* en valores de pH ácido y a la temperatura de -15°C en presencia de diferentes concentraciones de CLP (g/mL). La mayor inhibición microbiana se observó a valores de pH 4.0 con reducción aproximada de 3-4 ciclos logarítmicos con respecto a una población inicial de 6 ciclos.



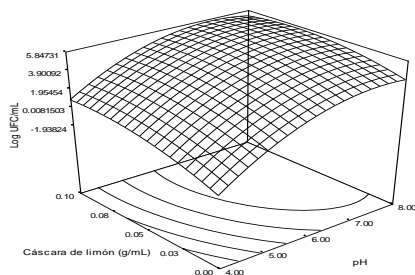
1a



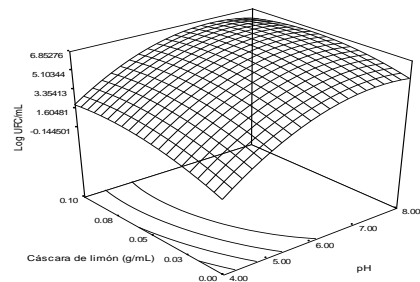
1b



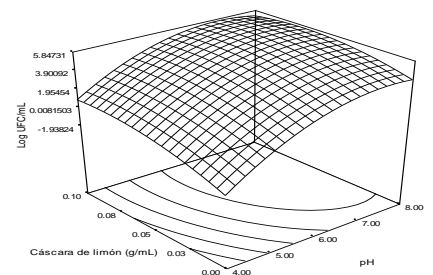
1c



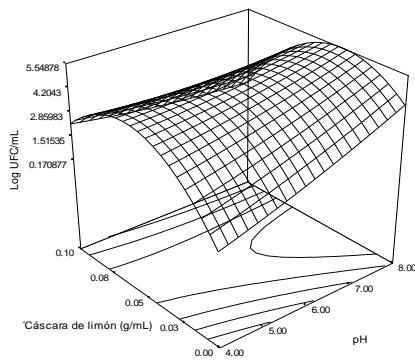
2a



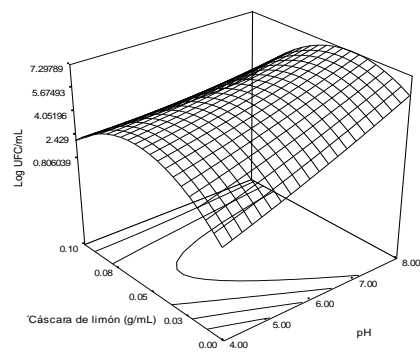
2b



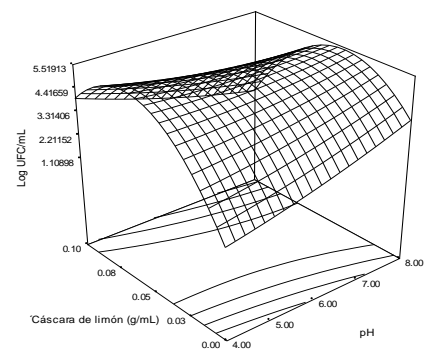
2c



3a



3b



3c

Figura 1. Gráficas de superficie de respuesta para las temperaturas de (1a, 2a y 3a) -15°C, (1b, 2b y 3b) -5°C, (1c, 2c y 3c) 5°C a un tiempo de almacenamiento de (1) 0 d, (2) 10 d y 30 d.

Referencias

1. Medina, T. N. (2017). Efecto del ultrasonido en la extracción y nanoencapsulación de polifenoles de limón persa. Merida . Obtenido de <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/447/1/Nelly%20Carolina%20Medina.pdf>
2. Herrera, S. Y. (2011). Actividad antioxidante in vitro y toxicidad frente a Artemia salina de extractos hidroalcohólicos de cinco especies de cítricos. Obtenido de <http://dspace.uclv.edu.cu/bitstream/handle/123456789/1893/Yamila%20Herrera%20Sanchez.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
3. ICMSF. 1996. Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbianos. Editorial Acribia, Zaragoza (España), pp 165-174
4. Fisher, K.; Rowe, C. y Phillips, C.A. (2007) The survival of three strains of *Arcobacter butzleri* in the presence of lemon, orange and bergamot essential oils and their components *in vitro* and on food. *Letters in Applied Microbiology*. **44**, 495-499.
5. Montero, Y. (2009). persa, Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de limón. Veracruz. Obtenido de <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/46805/MonteroCelisYanina.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
6. Miles, AA; Misra, SS, Irwin, JO (1938 Nov). "The estimation of the bactericidal power of the blood." *The Journal of hygiene*, **38** (6): 732–49.