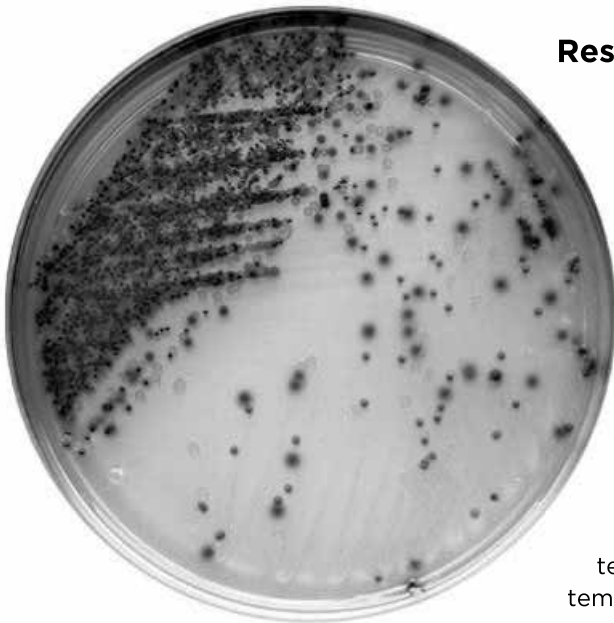


Diseño de Punto Central para Evaluar la Combinación de pH, Aceite Esencial de Citral y Temperaturas de Refrigeración o Congelación sobre la Inhibición de *Salmonella* *choleraesuis*

Santiago-Zacarías, L.¹, Caffarel-Méndez, S.¹, Rodríguez, S.², Generoso, S.² y
Minor-Pérez, H.¹



Resumen

La *Salmonella choleraesuis* puede contaminar una gran variedad de alimentos, incluso productos almacenados a temperaturas entre 2 °C a 4 °C. El objetivo de este trabajo fue evaluar la inhibición de la *Salmonella choleraesuis* utilizando un diseño de punto central: las combinaciones y repeticiones fueron para los valores de pH 5, 6 ó 7, las temperaturas de 5°C, -5°C o -15°C y las concentraciones de aceite esencial de citral de 0 Qg/mL, 1000 Qg/mL y 2000 Qg/mL. Se obtuvieron modelos matemáticos cuadráticos y 2 FI para la inhibición de *Salmonella choleraesuis* a los tiempos de almacenamiento de 0 días y 8 días, respectivamente. Se observó una disminución significativa en el crecimiento en la bacteria control a los 8 días de almacenamiento en las condiciones de combinación de aceite esencial de citral, temperatura y pH. El mayor efecto en inhibición se observó a la temperatura de -15° C y en pH ácido.

Abstrac

The *Salmonella choleraesuis* can contaminate a wide variety of foods, even stored products at temperatures of 2 °C to 4 °C. The objective of this study was to evaluate the inhibition of this bacteria using a design central point: combinations and repetitions were for pH values of 5, 6 or 7, temperatures of 5 °C - 5° C and -15 °C and concentrations of essential oil of citral: 0 Qg/

Acerca de los autores...

¹ División de Ingeniería Química y Bioquímica, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, México

² Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina



mL, 1000 Qg/mL and 2000 Qg/mL. Mathematical models were obtained: quadratic and 2FI for inhibition of *Salmonella choleraesuis* to times of storage 0 days and 8 days respectively. There was a significant reduction in bacteria growth control to 8 days of storage with the combination of essential oil of citral, temperature and pH conditions. The greatest effect on inhibition was observed at the temperature of -15 °C and at acid pH.

1.0 Introducción

Salmonella choleraesuis es una bacteria que puede contaminar diversos alimentos. Las bacterias

del género de *Salmonella sp.*, pueden tener o desarrollar mecanismos de resistencia a diferentes factores ambientales tales como las altas o bajas temperaturas usadas en los procesos de conservación de alimentos. Las bacterias de este grupo pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* (Brenner, 1984), son bacilos gram-negativos, anaerobios facultativos, de forma bacilar, con flagelos periféricos y no desarrollan cápsula (excepto la especie *Salmonella typhi*) ni esporas. Son bacterias móviles que producen ácido sulfhídrico (H₂S) y emplean glucosa, por poseer una enzima específica para metabolizarla; no utilizan lactosa, no producen ureasa, ni tienen metabolismo fermentativo (Sofos, 2013).

El hábitat natural de esta especie normalmente son los intestinos de animales y seres humanos. El género *Salmonella* se caracteriza por causar infecciones en el tracto gastrointestinal, debido a la ingesta de alimentos o agua contaminada (ICMSF, 1996).

Se tienen las siguientes especies: *Salmonella bongori*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella entérica*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella nyanza*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella virginia*.

La *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis* y la *Salmonella enteritidis*, son las especies que se reconocen como patógenas. Estas bacterias están clasificadas en más de 2,200 serotipos con base a los antígenos flagelares H (proteicos) y antígenos somáticos o (fracción polisacárida del lipopolosacárido bacilar) (Rodríguez y col., 2013).

Este género microbiano lleva el nombre del científico que las descubrió, el Dr. Daniel Salmon. La mayoría de los componentes de estas bacterias son similares, y a nivel del ADN, son entre 95% y 99% idénticos (Rodríguez y col., 2013).

El pH es un parámetro utilizado para el control microbiano de diversas bacterias patógenas encontradas en los alimentos. Los valores cercanos a la neutralidad son los más favorables para el crecimiento de *Salmonella*

choleraesuis. Es difícil definir el pH mínimo de crecimiento, debido a que la proliferación de la bacteria está en relación con diversos factores, tales como la naturaleza del ácido empleado para bajar el pH del medio, el serotipo microbiano o la temperatura de incubación, entre otros. Algunos valores señalados como límites para el desarrollo del microorganismo son de 4.1 a 9.0. (Rodríguez y col, 2013). Cuando el pH excede el óptimo, el crecimiento se detiene e incluso se puede provocar la muerte microbiana.

La temperatura óptima de crecimiento para *Salmonella sp.* es 37 °C aunque pueden crecer a temperaturas de 54 °C y algunas cepas tienen o desarrollan capacidad psicrófila, por lo que pueden contaminar alimentos almacenados a temperaturas de 2 °C a 4 °C (Beucat, 2009).

La capacidad para crecer a bajas temperaturas dependerá del serotipo microbiano y de las condiciones de almacenamiento de los alimentos, debido a que frecuentemente, en estos la temperatura mínima es de 2 °C (Morris y col. 2013; Doyle, 1989; ICMSF, 1996).

Muchos aceites esenciales de vegetales tienen actividad antimicrobiana, por lo que presentan alto potencial para aplicarse en la conservación de alimentos. Uno de estos aceites esenciales, es el de *Cymbopogon citratus*, una planta comúnmente conocida como lemongrass (Plazas-Tovar y col. 2010). Es originaria del este de la India y el aceite esencial tiene un alto contenido de citral (>70%), (Paranagama, 1991), un aldehído monoterpeno compuesto por la mezcla de dos isómeros, el geranial y el neral (Longyuan y col, 2010). El citral contribuye al sabor y aroma a limón. El objetivo de este estudio fue evaluar el crecimiento/inhibición de *Salmonella choleraesuis* ATCC 43890 con la combinación de aceite esencial de citral (0 Qg/mL, 1000 Qg/mL y 2000 Qg/mL, a las temperaturas de 5 °C, -5 °C y -15 °C y el pH de 5, 6 y 7. Se empleó el diseño de punto central para determinar los tratamientos de estudio y obtener las gráficas de superficie de respuesta, así como los modelos matemáticos que describan este fenómeno.

2.0 Metodología

2.1 Aceite esencial de citral

El aceite esencial de citral se adquirió en la empresa “Herbalise and Essence Oils, S.A. de C.V.”, México, con el que se preparó una solución stock de 10,000 Qg/mL y 100,000 Qg/mL en agua.

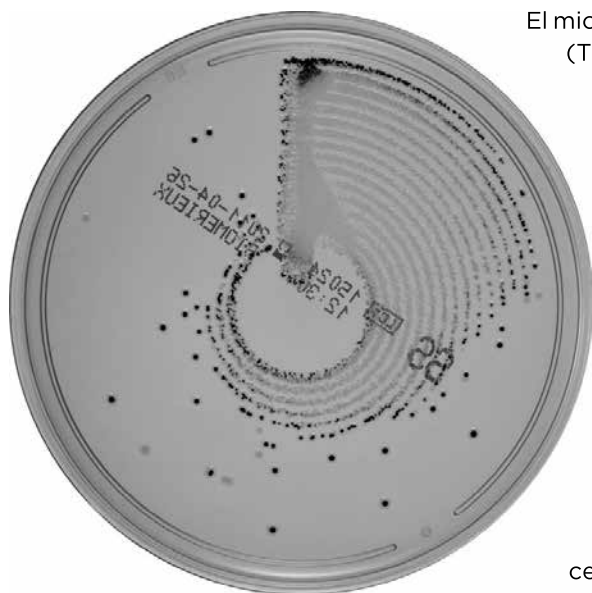
2.2 Soluciones amortiguadoras de citrato-fosfato a pH de 5, 6 y 7

Se prepararon soluciones amortiguadoras con diferentes concentraciones de ácido cítrico y fosfato dibásico para obtener los pHs de 5, 6 y 7. Se ajustó el pH con soluciones de HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N, en un potenciómetro (pH 2700 OAKTON, EUA).

2.3 Microorganismos y condiciones de crecimiento

Salmonella choleraesuis ATCC 43890 fue proporcionada por el Laboratorio de Biotecnología y Fermentaciones del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON, México). Durante este estudio la cepa control se conservó en crioviales a -80 °C.





El microorganismo se activo con una siembra por estría en medio TSAYE (Tryptic Soy Broth, Bioxon, México) adicionado 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 horas. Una colonia de la bacteria se utilizó para inocular en caldo TSBYE (Tryptic Soy Broth, Bioxon, México) adicionado con 0.6% de extracto de levadura (w/v Bioxon, México) y se incubó a 37 °C por 12 h. Se tomaron 100 QL de este precultivo para ser inoculados en 5 mL de TSBYE. La muestra se incubó durante 24 h, a 37 °C para obtener el cultivo de estudio.

2.4 Tratamientos

Todas las combinaciones y repeticiones se obtuvieron para los valores de pH 5, 6 o 7, las temperaturas de 5 °C, -5 °C ó -15°C y las concentraciones de aceite esencial de citral de 0 Qg/mL, 1000 Qg/mL y 2000 Qg/mL de acuerdo con el diseño de punto central (Design Expert). Los tratamientos de 1000 Qg/mL de aceite esencial de citral se prepararon utilizando volúmenes de 800 QL de la solución amortiguadora citrato-fosfato (con pH de 5, 6 o 7) más 100 QL de cultivo de *Salmonella choleraesuis* previamente diluido en una solución de agua peptonada y 100 QL de la solución stock de aceite esencial de 10,000 Qg/mL. Para la concentración de 2000 Qg/mL se utilizaron 880 QL de las diversas soluciones amortiguadoras citrato-fosfato, más 100 QL de inóculo de *Salmonella choleraesuis* y 20 QL de aceite esencial stock de 100,000 Qg/mL. El control fue un tratamiento sin aceite esencial de citral. Estos tratamientos fueron almacenados a las temperaturas de 5° C, - 5°C y -15°C.

La cuenta microbiana se realizó utilizando un volumen 100 QL de los tratamientos, que se diluyeron en 900 QL de agua destilada contenida en tubos Eppendorf, los cuales se agitaron en un vortex (Labnet, EUA) a 350 rpm durante 10 segundos. Se hicieron diferentes diluciones y se empleó la técnica de gota, reportada por Miles and Misra (1934) para cuantificar las poblaciones microbianas. Un volumen de 20 QL de las muestras, se vació en cajas de petri con medio TSA. Se sembraron cuatro diluciones por cada placa. Las muestras se incubaron durante 24 h a 37 °C. Se reportan las UFC/mL.

3.0 Resultados y discusión

Los alimentos constituyen una fuente importante en la transmisión de enfermedades a los humanos. Esta condición puede provocar un problema severo de salud pública. La presencia de bacterias del género *Salmonella sp.* es la segunda causa de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA). La bacteria se encuentra principalmente en alimentos como el huevo crudo o mal cocido, pollo y en general, en carnes mal cocidas o leche cruda. Debido a sus características biológicas *Salmonella sp.* es un microorganismo que dificulta su control biológico. En este estudio se evaluó la combinación de aceite esencial de citral, pH y temperaturas bajas de refrigeración o congelación para inhibir su crecimiento, asimismo, se obtuvieron modelos matemáticos para describir el comportamiento de *Salmonella choleraesuis* en estas condiciones de almacenamiento (Sofos, 2013).

Las Tabla 1 muestra el diseño de punto central utilizado para determinar el efecto y las interacciones de la temperatura, pH y concentración de aceite esencial de citral sobre la inactivación de *Salmonella choleraesuis*. Se

determinó la influencia de estos parámetros sobre la inactivación de la bacteria control durante el tiempo de almacenamiento de 0 y 8 días. Los resultados se analizaron aplicando la metodología de superficie de respuesta (MSR) mediante una regresión múltiple.

	T ^a	pH ^b	C ^c	Tiempo 0 días Log ₁₀ UFC/mL	Tiempo 8 días Log ₁₀ UFC/mL
1	-5.0	6.0	0	5.9	6.41
2	-5.0	6.0	1000	6.51	5.26
3	-5.0	6.0	1000	6.47	5.24
4	-15.0	5.0	2000	5.77	2.39
5	-15.0	5.0	2000	5.19	5
6	-5.0	7.0	1000	6.73	6.56
7	-15.0	7.0	2000	4.84	4.41
8	-5.0	6.0	1000	6.11	5.33
9	-15.0	7.0	2000	4.95	4.21
10	5.0	6.0	1000	6.38	5.3
11	-15.0	6.0	1000	6.13	4.47
12	-15.0	7.0	0	6.58	6.2
13	5.0	7.0	2000	5.68	3.69
14	-15.0	5.0	0	5.9	4.75
15	-15.0	7.0	0	6.81	6.16
16	-15.0	5.0	0	5.95	5.07
17	-5.0	6.0	1000	5.84	5.47
18	5.0	5.0	2000	4.92	4.21
19	-5.0	6.0	1000	6.3	5.27
20	5.0	7.0	2000	5.74	3.17
21	5.0	5.0	0	5.84	5.47
22	5.0	7.0	0	6.77	6.42
23	-5.0	6.0	1000	6.33	4.69
24	5.0	5.0	0	6	5.69
25	-5.0	6.0	2000	5.55	4.65
26	5.0	5.0	2000	4.812	5.65
27	-5.0	5.0	1000	5.81	4.23
28	5.0	7.0	0	6.27	6.44

Tabla 1

Tratamientos y resultados experimentales para la inhibición de *Salmonella choleraesuis* ATCC 43890 con la combinación de temperatura, pH y aceite esencial de citral.

^a Temperatura (°C)

^b pH del medio de tratamiento.

^c Concentración de aceite esencial de citral (Qg/mL)

^d Población microbiana en Log₁₀ UFC/mL

El análisis estadístico muestra que los resultados experimentales se ajustaron a un modelo cuadrático, al tiempo de almacenamiento de 0 días. Este modelo describe la influencia de los factores investigados en forma independiente: temperatura (T), pH y aceite esencial de citral (C) en Qg/mL y el efecto de las interacciones: T*pH, T*C y pH*C. Así como el efecto de los cuadrados: T², pH² y C². La ecuación obtenida es $Y = 4.1406 - 0.097266*T + 0.23379*pH + 1.43508*10^{-3}*C + 2.99065*10^{-5}*T^2 + 0.017991*pH^2 - 5.27009*10^{-7}*C^2 + 0.015737*T*pH + 4.76250*10^{-6}*T*C - 1.38875*10^{-4}*pH*C$, donde es Y es la variable respuesta. El coeficiente de determinación fue de 0.8197.

Para el tiempo de almacenamiento de 8 días, los resultados experimentales se ajustaron a un modelo 2FI (interacción de dos factores). La ecuación que describe el comportamiento de *Salmonella choleraesuis* a este tiempo de almacenamiento es $Y = 3.13683 + 0.21597 \cdot T + 0.48385 \cdot \text{pH} + 1.37233 \cdot 10^{-3} \cdot C - 0.031687 \cdot T \cdot \text{pH} - 7.06250 \cdot 10^{-6} \cdot T \cdot C - 3.75625 \cdot 10^{-4} \cdot \text{pH} \cdot C$, donde Y es la variable respuesta, ciclos logarítmicos de la población microbiana de *Salmonella choleraesuis*. El coeficiente de determinación fue de 0.6804.

Los coeficientes de determinación para el tiempo de almacenamiento de 0 d y 8 d indican que 18.03% y 31.94% respectivamente de la variación total en la respuesta no se puede explicar por los modelos desarrollados. Los valores F-Modelo fueron 9.09 y 7.45 respectivamente, estos valores indican que los modelos cuadrático y 2FI para los tiempos de 0 d y 8 d fueron significativos ($p > 0.05$). Los valores Fo para los parámetros de cada modelo fueron útiles para explicar el grado de significancia de los efectos de las variables y sus interacciones. Para los dos tiempos de tratamiento evaluados, el parámetro más significativo fue la concentración de aceite esencial de citral. Al tiempo de 0 d, el segundo parámetro más significativo fue el pH y posteriormente el cuadrado de la concentración de citral. A los 8 d de almacenamiento el segundo parámetro con más significancia fue la interacción pH*C y posteriormente la interacción T*pH. Esto significa que los cambios en concentración de aceite esencial de citral tienen un efecto significativo sobre la inactivación de *Salmonella choleraesuis*. A los 8 d de almacenamiento, las interacciones entre el pH y la concentración de aceite esencial de citral o la temperatura, también tienen un efecto significativo sobre la inactivación de la bacteria control.

Las gráficas 1 y 2 muestran las superficies de respuesta para los tiempos de almacenamiento de 0 d y 8 d de almacenamiento de los tratamientos. En

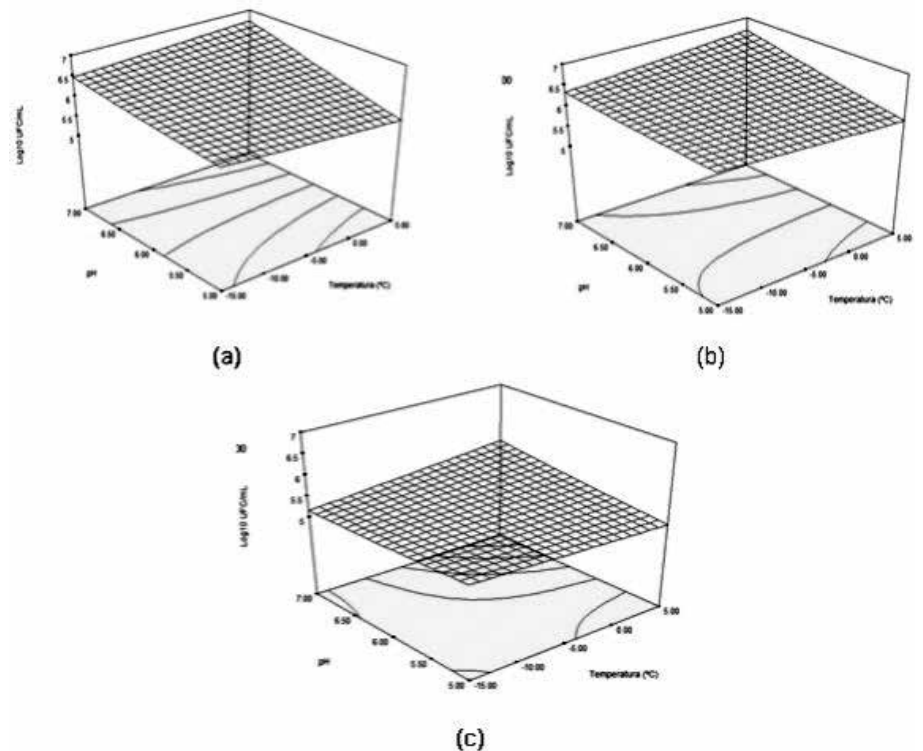


Figura 1

Gráficas de superficie de respuesta para la inactivación de *Salmonella choleraesuis* con la combinación de temperatura, pH y concentración de aceite esencial de citral al tiempo de 0 d de almacenamiento. Aceite esencial de citral (a) 0 Qg/mL, (b) 1000 Qg/mL, (c) 2000 Qg/mL.

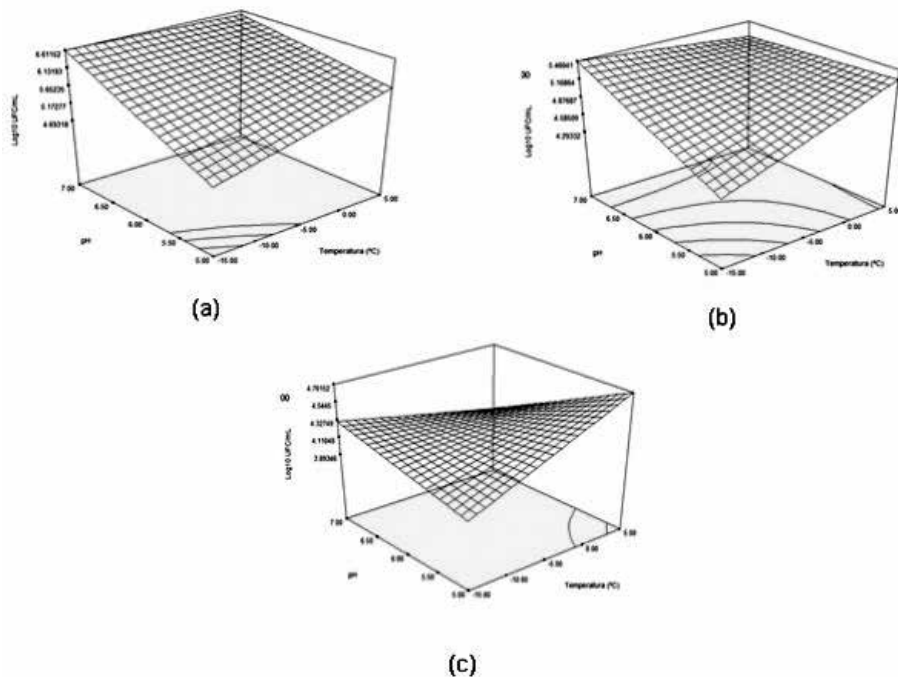
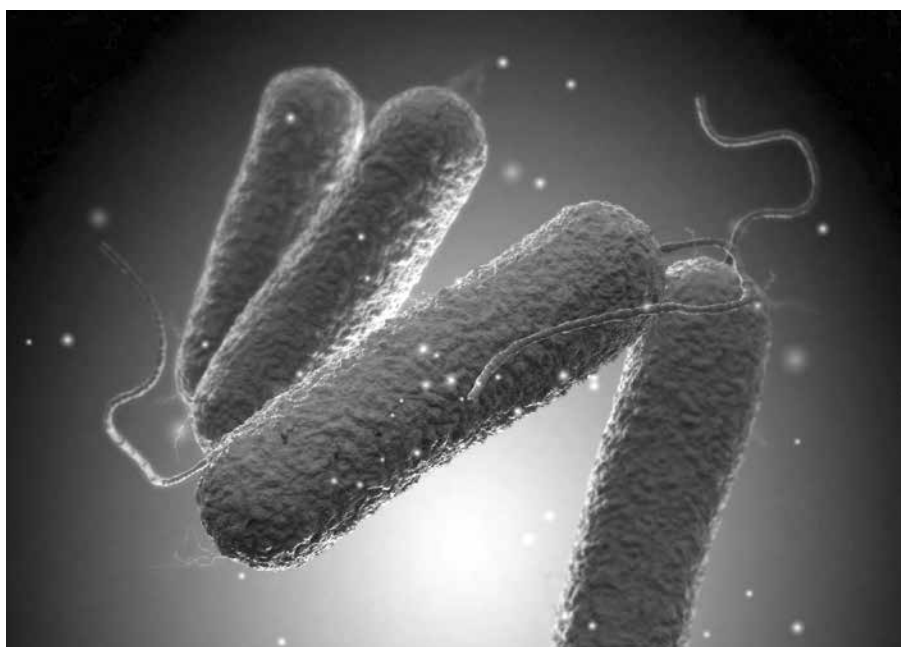


Figura 2

Figura 2. Gráficas de superficie de respuesta para la inactivación de la *Salmonella choleraesuis* mediante la combinación de temperatura, pH y concentración de aceite esencial de citral al tiempo de 8 d de almacenamiento. Aceite esencial de citral (a) 0 Qg/mL, (b) 1000 Qg/mL, (c) 2000 Qg/mL

la primera gráfica se observa el efecto que tiene la concentración de aceite esencial de citral con una reducción significativa de la población de *Salmonella choleraesuis* a 2000 Qg/mL. En la Figura 2 se muestra que la interacción temperatura*pH tiene un efecto significativo sobre la reducción de las poblaciones de la bacteria control. La temperatura de -15°C y el pH de 5.0 provocan la inhibición microbiana mayor. Este comportamiento puede ser explicado posiblemente por que en la temperatura de -15°C las bacteria de *Salmonella choleraesuis* puede sufrir daño subletal. La bacteria sufre daños que no la inactivan pero la hacen tener cambios como alteración en la membrana celular vuelven más sensible a los agentes antimicrobianos (Booth, 2002).



Conclusiones

A través del efecto de la combinación de aceite esencial de citral, temperatura de refrigeración o congelación y pH se obtuvieron modelos matemáticos para la inhibición de *Salmonella choleraesuis*. Se observó una disminución significativa en el crecimiento en la bacteria control a los 8 d de almacenamiento en las condiciones de almacenamiento, combinando aceite esencial de citral, temperatura y pH. El mayor efecto en inhibición se observa a la temperatura de -15 °C y en pH ácido.

Bibliografía

- Beuchat, L.R. 1989. *Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review*, WHO/ESF/FOS/98.2.
- Booth, I.R. Stress and the single cell: Intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *International Journal of Food Microbiology*. 78:19-30. 2002.
- Borboa-Flores, J., Rueda-Puente, E.O., Acedo-Félix, E., Ponce, J.F., Cruz-Villegas, M., García-Hernández, J.L. y Ortega-Nieblas, M.M. Evaluation of antibacterial activity *in vitro* of essential oils vs *Clavibacter michigaensis* subespecie michiganensis. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 12, 539-547. 2010.
- Doyle, M.P. 1989. *Foodborne bacterial pathogens*. Marcel, Dekker, Inc. New York
- ICMSF. 1996. *Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbianos*. Editorial Acribia, Zaragoza (España), pp 165-174
- Longyuan, M., Seung J. C., Alamed, A., Henson, L., Popplewell, M., McClements, D.J. y Decker, E. 2010. Citral Stability in Oil-in-Water Emulsions with Solid or Liquid Octadecane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58.1 533-536.
- Miles, A.A, Misra, S.S. e Irwin, J.O. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of Hygiene*, 38 (6): 732-49
- Morris, G.J. y Potter, M.E. 2013. *Foodborne infections and intoxications*. Academic Press. 4th Edición. USA
- Paranagama, P.A., Adhikari, A.A.C., Abeywickrama, K.P.A. y Premarathne-Bandara. 2002. Toxicity and repellent activity of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. And *Murray koenigii* Sprang against *Callosobruchuchus maculatus* (F.) (Coleoptera; Bruchidae). *Tropical and Subtropical Agroecosystem*. 5:24-28.
- Plazas-Tovar, L., Wolf-Maciel, R.M., Ferreira-Pinto, G., Macial-Filho, R. y Ramalho-Gomez, D. 2010. Factorial design applied to concentrate bioactive component of *Cymbopogon citratus* essential oil using short path distillation. *Chemical Engineering Research and Design*. 88:239-244.
- Rodríguez-García, M.O., Márquez-González, M. y Hernández-Mireles, C. 2013. "Salmonella". En: *Riesgos asociados al consumo de alimentos*. Torres-Vitela, M.R. (Editor). Universidad de Guadalajara. ISBN 978-607-450-641-9.
- Sofos, J. 2013. *Advances in microbial food safety*. Woodhead Publishing. USA. Volumen I.