

Efecto de dos recubrimientos antimicrobianos sobre la inhibición de *Salmonella spp.*

Díaz Méndez Rosario Berenice¹, Díaz Ramos Uriel Eduardo², Soto Téllez María de la Luz², Chávez Martínez Margarita², Hernández Martínez Leonardo², Lilia Fernández Sánchez²

¹Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Av. 1° de Mayo s/n, Col. Santa María las Torres, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

²Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco, Departamento de Ciencias Básicas
Avenida San Pablo No. 180. Colonia Reynosa Tamaulipas, México, D.F. CP 02200.

Utopic_love@hotmail.com

Fecha de aceptación: 13 de agosto de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

RESUMEN

En este trabajo se evaluaron dos recubrimientos formulados con un desinfectante de origen natural frente a su capacidad inhibitoria de *Salmonella spp.* Se determinó la actividad del desinfectante utilizando la bacteria en fase estacionaria como lo sugiere *Iturriaga et al.* (2012). Esta etapa se alcanzó en 8 horas de incubación a 37 °C/ 24 horas, con agitación a 80 rpm. Se desarrollaron dos recubrimientos antimicrobianos utilizando como matriz polimérica alginato de sodio 1% y pectina 3% con cera de candelilla 1.2%, como plastificante glicerol 1.5% , y el antimicrobiano utilizado fue un desinfectante comercial (Bioxitral®) a base de ácidos orgánicos. Con el fin de evaluar la eficacia de los recubrimientos antimicrobianos se efectuaron pruebas de inhibición "in vitro" siguiendo la norma NMX-bb-040-SCFI-1990. La concentración mínima inhibitoria del desinfectante incorporado a los recubrimientos de alginato y pectina con cera de candelilla fue de 8000 ppm y 7000 ppm, respectivamente; la actividad antimicrobiana de los recubrimientos estudiados fue bactericida.

Palabras clave: recubrimientos antimicrobianos, desinfectante natural, *Salmonella spp.*

ABSTRACT

In this work, two coatings formulated with natural disinfectant against its inhibitory capacity of *Salmonella spp.* were evaluated. Disinfectant activity was determined using bacteria in stationary phase as suggested *Iturriaga et al.* (2012). This stage was reached at 8 hours of incubation at 37 °C / 24 h. with stirring at 80 rpm. Two antimicrobial coatings used as polymer matrix 1% sodium alginate and pectin 3% Candelilla wax 1.2%, 1.5% glycerol as a plasticizer, and the antimicrobial used was a (Bioxitral®) commercial acid-based disinfectant developed organic. In order to evaluate the effectiveness of the antimicrobial coatings inhibition tests "in vitro" they were made following the NMX-bb-040-SCFI-1990 standard. The minimum inhibitory concentration of the antimicrobial incorporated into the coatings alginate and pectin candelilla wax was 8000 ppm and 7000 ppm, respectively. The antimicrobial activity was studied bactericidal coatings.

Key words: antimicrobial coatings, natural disinfectant, *Salmonella spp.*

INTRODUCCIÓN

La calidad y seguridad de los alimentos son las principales preocupaciones de la industria alimentaria, por ello se requiere reducir o eliminar microorganismos de productos alimenticios ya que esto puede conducir a la descomposición, deterioro de su calidad y posibles daños al consumidor (Mehdi *et al.*, 2014).

La *Salmonella spp.* Es un patógeno que tiene una incidencia recurrente en alimentos debido a una mala manipulación o producción. Actualmente, los casos de salmonelosis representan importantes pérdidas económicas en muchos países. Los recubrimientos están siendo utilizados en una gran variedad de alimentos con el fin de conservar sus características sensoriales y la adición de antimicrobianos es una alternativa para apoyar su inocuidad (Mani *et al.*, 2012). Se pueden formular a partir de biopolímeros tales como proteínas, polisacáridos, lípidos o una mezcla de ellos, además pueden ser utilizados como soporte de aditivos, conservadores, antioxidantes, componentes antimicrobianos capaces de retardar o inhibir el crecimiento de microorganismos en el alimento permitiendo mantener altas concentraciones de estas sustancias en las superficies de los alimentos mejorando así su conservación y apariencia (Herrera, 2011; Jun, 2014; Appendini y Hotchkiss, 2002).

Se han propuesto varios compuestos para la actividad antimicrobiana en el envasado de alimentos, incluidos los ácidos orgánicos, enzimas, especias y aceites esenciales (Saucedo *et al.*, 2009). La aplicación de ácidos orgánicos en películas y recubrimientos antimicrobianos son una buena alternativa al ser eficientes en la inhibición de microorganismos patógenos, son económicos, se caracterizan por ser compuestos de origen natural reconocidos como seguros (GRAS), sin embargo es necesario tomar en cuenta si se presentan cambios en las características organolépticas al ser incorporados al alimento (Falguera *et al.*, 2011).

De ese modo la realización de este proyecto está enfocada en el fomentar la inocuidad en aguacate *Hass* para minimizar pérdidas por presencia de patógenos y lograr la aceptación del consumidor por medio del desarrollo de un recubrimiento antimicrobiano para el control de *Salmonella spp.* utilizando como matriz estructural un polisacárido, una mezcla de hidrocoloide-lípido y como agente antimicrobiano un desinfectante a base de ácidos orgánicos.

METODOLOGÍA

La cepa utilizada de *Salmonella spp.*, en este trabajo, fue proporcionada por el laboratorio de bacteriología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México. Se realizó una curva de crecimiento utilizando la cepa de *Salmonella spp.* previamente incubada a 37°C / 24 h. Para determinar su fase estacionaria como lo reportan *Maftoonazad* y *Ramaswamy* en un estudio realizado en el 2008 en el cual las células bacterianas en fase de crecimiento estacionario tienen una mayor resistencia que aquellas en cualquier otra fase de crecimiento, mediante la medición de la absorbancia (método indirecto) a 590 nm cada dos horas y conteo microbiano en cada muestra (método directo) .

Se realizó la evaluación del desinfectante para determinar la concentración mínima inhibitoria mediante una prueba cualitativa de inhibición “*in vitro*” tomando como inóculo el cultivo en etapa estacionaria.

Se desarrollaron dos recubrimientos antimicrobianos biodegradables utilizando como matriz polimérica alginato de sodio y pectina con cera de candelilla.

Para el recubrimiento de alginato se preparó una solución acuosa con alginato de sodio al 1%, agua destilada y el antimicrobiano a diferentes concentraciones (8000, 9000 y 10000 ppm) la solución se disolvió utilizando un agitador magnético a temperatura ambiente durante 1 h para dispersarlo completamente, se adicionó 1.5 % de glicerol y finalmente se dejó reposar la solución con el fin de eliminar las burbujas presentes debido a la homogeneización. El recubrimiento de pectina se preparó

mediante una solución de agua destilada con el desinfectante a las concentraciones de 7000, 8000 y 9000 ppm., se agregó la pectina al 3% y se calentó la solución a 60 °C dispersando alrededor de 2 h con ayuda de una parrilla con agitación.

Al completar la homogenización se incorporó como plastificante 1.5% de glicerol y finalmente se adicionó 1.2 % de cera de candelilla, y se dejó reposar también para eliminar las burbujas de aire presentes en la solución. La eficacia del desinfectante en los dos recubrimientos también fue evaluada mediante pruebas de inhibición “*in vitro*” por triplicado siguiendo la norma NMX-040-BB-SCFI-1990 variando solamente el tiempo de exposición de la bacteria en el recubrimiento con el desinfectante a 30 min. Como control negativo se evaluó el recubrimiento sin el desinfectante. A los dos recubrimientos se les midió la permeabilidad al agua por medio de un equipo (TANTEC, Contact Angle Meter) que mide el ángulo de contacto de una gota de agua en la superficie de la película, lo cual pone de manifiesto la humectabilidad de dicha superficie.

Finalmente se realizaron pruebas de inhibición “*in vivo*” de los recubrimientos aplicados al aguacate durante 2 semanas, se tomó el muestreo de tres aguacates (por muestra) recubiertos con pectina y tres con alginato en los días 0,3,5,7,9,12,14, se inoculó cada aguacate con 500µL de *Salmonella spp.*, en fase estacionaria, se dejó actuar el recubrimiento con el desinfectante por 1 h y posteriormente se lavó vigorosamente el fruto inoculado con solución salina fisiológica (SSF) al 85% por 2 minutos en bolsas con cierre hermético, se tomó 1 mL de la SSF del lavado y se sembró en tubos con BHI, finalmente los tubos se incubaron por 8 h a 37°C para confirmar la ausencia de *Salmonella spp.*, en los recubrimientos con respecto a los días de almacenamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se percibe que en el punto que corresponde al tiempo 0 existe crecimiento microbiano y esto se debe a la concentración inicial bacteriana empleada para estandarizar esta parte de la experimentación.

Por otro lado se aprecia que la fase de crecimiento exponencial termina a las 8 horas de incubación e inmediatamente las bacterias entran a fase de crecimiento estacionario en la cual la tasa de crecimiento disminuye y el número de muertes microbianas compensa el de células nuevas y la población se estabiliza (segmento de curva constante con respecto al aumento de población bacteriana), la actividad metabólica de las bacterias que sobreviven también se torna más lenta en esta fase.

La fase de muerte se inicia a las 10 horas de incubación esta parte no se pudo visualizar de una mejor manera por falta de datos experimentales.

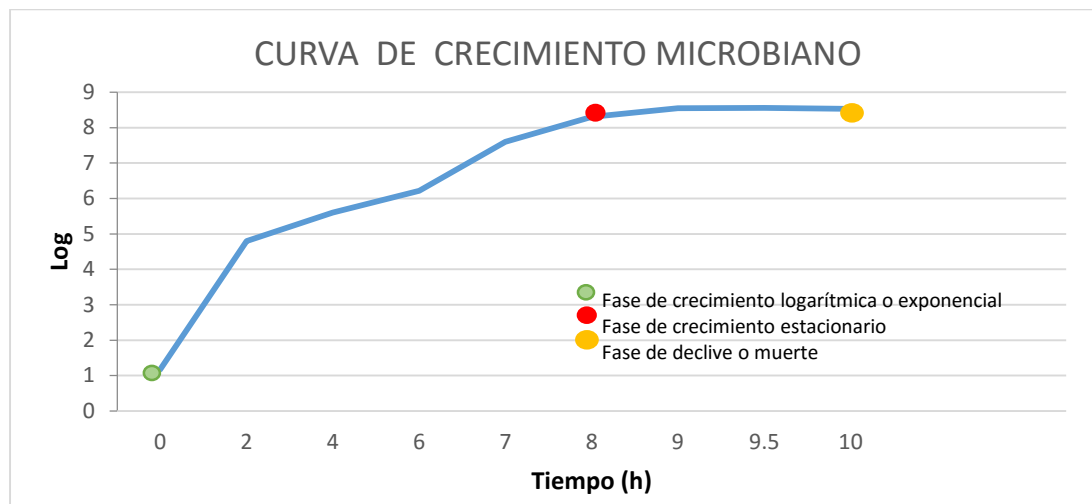


Figura 1. Curva de crecimiento microbiano por conteo utilizando la escala logarítmica contra el tiempo

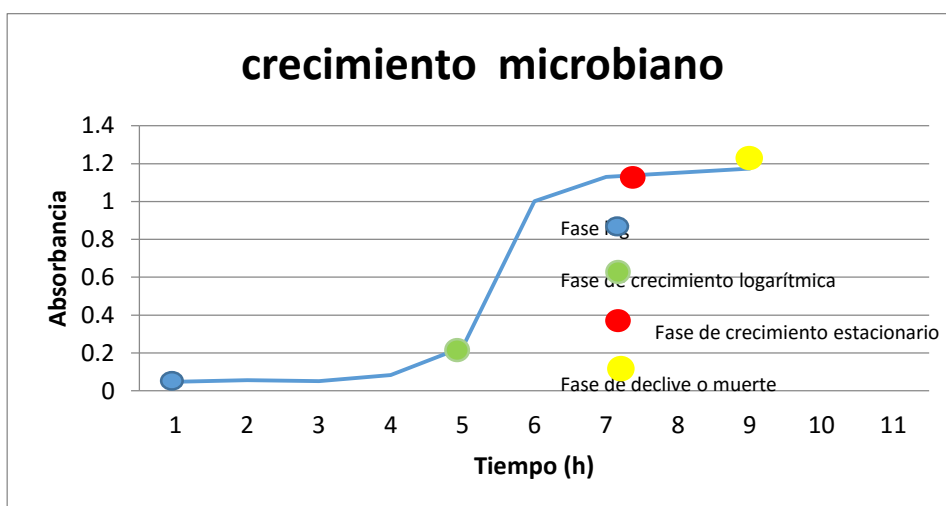


Figura 2. Curva de crecimiento bacteriano con respecto a la medición de la absorbancia.

En la curva de la figura 2 se visualiza claramente que la etapa lag según los datos obtenidos de absorbancia, dura 5 horas, lo cual es demasiado el tiempo en comparación con los datos obtenidos por conteo microbiano, esto se debe a que en la técnica empleada se mide la densidad óptica de las muestras tratándose de un método indirecto. Para que puedan visualizarse las primeras trazas de turbidez debe haber más de un millón de células por mililitro y se precisan de 10 a 100 millones por mililitro para que la suspensión se vuelva lo bastante turbia como para ser medida en un espectrofotómetro (Tortora, 2007), en este caso la turbidez en caldo BHI se observó visualmente a partir de las 5 horas de incubación de la muestra, lo cual suena lógico con la justificación planteada.

La concentración mínima inhibitoria del desinfectante (Bioxitral ®) fue de 400 ppm "in vitro".

En la figura 3 se observa que a una concentración de 200 ppm del desinfectante diluido en agua destilada no se presenta inhibición de la cepa *Salmonella spp.*, esto se debe a que la concentración del antimicrobiano es muy pequeña y la mayoría de las moléculas del desinfectante se encuentran disociadas lo cual se traduce en una menor actividad antimicrobiana; sin embargo a concentración de 400 ppm se muestra una clara inhibición de la bacteria atribuible a la ausencia de turbidez en los tubos

BHI después de 24 h de incubación lo que indica que no hubo crecimiento de la bacteria después de ser expuesta al desinfectante.



Figura 3. Prueba de inhibición “in vitro” para 200 y 400 ppm del desinfectante

Una vez elaborados los recubrimientos se realizaron pruebas de inhibición in vitro para determinar su efectividad antimicrobiana; tomando como base la concentración mínima inhibitoria del desinfectante de 400 ppm se desarrollaron recubrimientos con concentraciones mayores del antimicrobiano y de ese modo se obtuvo que la concentración inhibitoria de los recubrimientos fue de 7000 ppm en recubrimientos de pectina y 8000 ppm en recubrimientos de alginato para que permitiera la inhibición de *Salmonella spp.* El efecto antimicrobiano del desinfectante se vio reducido, esto se atribuye a que al disolver el desinfectante (compuestos por ácidos débiles) en agua, este se disocia, es decir al interaccionar con el agua dona protones que se encuentran en la solución y la porción de los ácidos que no se encuentran disociados favorecen la interacción desinfectante-bacteria, sin embargo cuando se agrega alginato de sodio o pectina (carga negativa) a la solución (carga positiva) este neutraliza el medio, viéndose reflejado en la disminución de la efectividad del antimicrobiano, sin embargo las moléculas de agua disponibles en el medio forman puentes de hidrógeno con las moléculas de los polímeros formándose una red tridimensional que capta el agua con el antimicrobiano.

La acción del desinfectante solo y combinado con los polímeros utilizados para el desarrollo de los recubrimientos fue bactericida, lo que permitió el control de *Salmonella ssp.*, en aquellos productos expuestos a un riesgo de contaminación que podrían llegar a desencadenar brotes, y así afectar el ámbito socioeconómico de los países (Mani *et al.*, 2012).

Por otro lado los resultados obtenidos en la prueba de ángulo de contacto realizada con el equipo TANTEC, Contact Angle Meter (figura 4) para conocer la naturaleza (hidrofílica, hidrofóbica) de los recubrimientos mostraron que el recubrimiento formulado con pectina fue más estable que el de alginato de sodio debido a que este presentó una mayor permeabilidad al agua.

La película antimicrobiana de alginato de sodio muestra una tendencia altamente hidrofílica ya que existe afinidad entre el líquido empleado y la superficie de la muestra, esto se observa claramente al efectuar la prueba ya que no se formaba ningún ángulo y la superficie de la película absorbía la gota al contacto (Vera, 2014).

Los datos obtenidos en las películas de pectina mostraron una tendencia no muy alejada a la de las películas de alginato, ya que también presentan un comportamiento hidrofílico sin embargo en la composición se encuentra presente un lípido lo que hace que el ángulo de contacto muestre valores más elevados (Tabla 1) en comparación con las muestras de alginato.

En las películas de pectina el ángulo de contacto medido en las formulaciones no existió una gran variación entre las formulaciones sin embargo se observó que la concentración del desinfectante influía directamente en la permeabilidad al agua esto es atribuible a la formación de un gel de pectina de alto metoxilo más fuerte al disminuir el pH del medio dispersante.

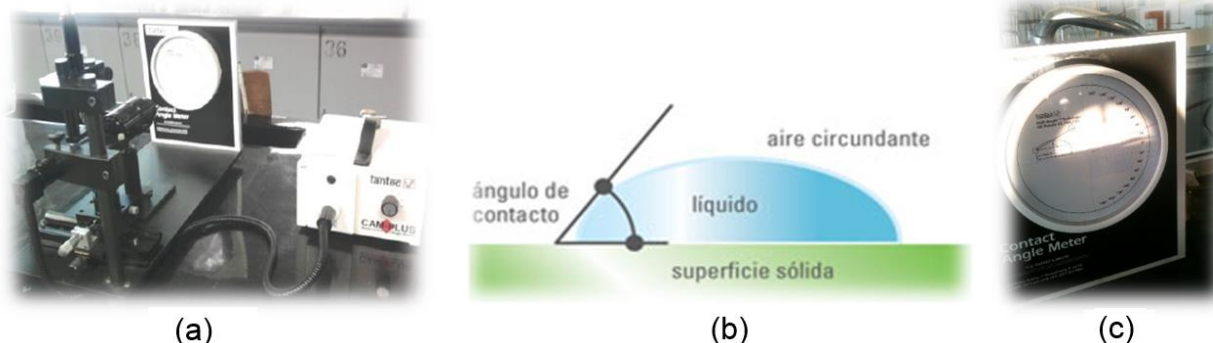


Figura 4. a) Equipo TANTEC, Contact Angle Meter; b) Ángulo de contacto que forma una gota de agua al depositarse en una muestra sólida; c) medidor del ángulo de contacto que se forma en la superficie de la película.

Tabla 1. Resultados de la prueba de ángulo de contacto para las películas de pectina

| Muestra | Extremo 1 | Centro | Extremo 2 |
|--|-----------|--------|-----------|
| Control Pectina(sin desinfectante) | 20° | 20° | 20° |
| 7000 ppm | 22° | 22° | 22° |
| 8000 ppm | 24° | 24° | 25° |
| 9000 ppm | 28° | 28° | 28° |

Una vez elaborados y evaluados los recubrimientos se procedió a aplicarlos en aguacate Hass con el fin de efectuar la prueba de inhibición "in vivo", a lo largo de 2 semanas, los resultados fueron los siguientes:

Las muestras de los días 0 a 9 dieron negativas a *Salmonella* spp, y sin crecimiento bacteriano alguno, además presentaron efecto bactericida (cabe mencionar que los tubos BHI se incubaron 8 días a 37°C para corroborar el efecto) y se llevó a cabo la confirmación por medio de la siembra de las muestras por el método de gota ya que los recubrimientos son solubles en agua y se pudo confundir la turbidez atribuida a residuos del recubrimiento con posible crecimiento microbiano.

El efecto antibacteriano de los recubrimientos de pectina y alginato fue efectivo hasta el día 12, ya que los tubos BHI se aprecian turbios en comparación con los demás tubos, y en la muestra tomada el día 14 se observa la presencia de un precipitado blanco, lo que indica presencia bacteriana. Las cajas de agar Mac Conkey dieron positivas a la siembra de *Salmonella* spp., en las muestras 12 y 14.

En esta etapa de la experimentación también se muestran los cambios aparentes de los recubrimientos aplicados a aguacate Hass en el transcurso de las 2 semanas (tabla 2).

Tabla 2. Observaciones del recubrimiento de alginato a lo largo de 2 semanas















| Día de Almacenamiento e Imagen | Observaciones | Día de Almacenamiento e Imagen | Observaciones |
|---|---|---|---|
| día 0  | El recubrimiento le confirió al aguacate brillo externo y presentó buena adherencia al fruto. | Día 9  | El fruto muestra un ligero deterioro en la superficie ya que se observa una ligera deshidratación del fruto. |
| día 3  | El recubrimiento perdió ligeramente su brillo en el tercer día de almacenamientos, sin embargo se encontró en óptimas condiciones en cuanto a apariencia externa. | Día 12  | El recubrimiento se desprendió con mucha facilidad del fruto, y el aguacate perdió su firmeza, ya que al tacto se sentía blando. |
| Día 5  | No existió cambio visible en cuanto al fruto o recubrimiento. | Día 14  | El recubrimiento se desprendió por completo y la firmeza del fruto se deterioró aún más, hay una |
| Día 7  | El aguacate aparentemente continuó con su maduración y el recubrimiento no presentó cambios. | Día 14  | El recubrimiento se desprendió por completo y la firmeza del fruto se deterioró aún más, hay una deshidratación excesiva en el fruto. |

Tabla 5. Observaciones del recubrimiento de pectina a lo largo de 2 semanas

| Día de almacenamiento | Observaciones | Imagen |
|-----------------------|--|---|
| 0 | El recubrimiento le confirió brillo al fruto, se adhiere eficazmente al fruto. |  |
| 3 | El recubrimiento y el fruto conservan las mismas condiciones en apariencia externa. |  |
| 5 | Tanto el recubrimiento como el fruto presentan buenas características, tanto como las iniciales. |  |

| | | |
|----|--|--|
| 7 | Existe una ligera deshidratación en la superficie del fruto, el recubrimiento continua en óptimas condiciones. |  |
| 9 | Se presentó descenso en la calidad superficial acompañada de una ligera deshidratación en la superficie, el recubrimiento no muestra ningún desprendimiento. |  |
| 12 | El recubrimiento conservó sus características iniciales, sin embargo el aguacate continua perdiendo firmeza |  |
| 14 | Existe una mayor deshidratación del fruto, sin embargo el recubrimiento continua adherido al aguacate, la pérdida de firmeza es visible. |  |

La pérdida de agua del fruto a lo largo del almacenamiento se debe a la naturaleza hidrofílica de los polímeros usados, ya que como lo reporta *Avendaño et al.*, (2013), la naturaleza de la película empleada desempeña un papel muy importante ya que a mayor naturaleza hidrofílica de los componentes usados, mayor permeabilidad al vapor de agua.

Las películas elaboradas a partir de polímeros naturales tales como la pectina y el alginato, muestran una baja resistencia a la pérdida de agua y poseen pobres propiedades de barrera al agua, sin embargo poseen una barrera idónea ante el O₂ y CO₂, aceites y grasas (Aguilar, 2005).

Según *Herrera*, (2011) los cambios fisicoquímicos y bioquímicos que ocurren en los alimentos durante el almacenamiento, se deben principalmente a la migración de agua entre componentes alimenticios o entre el medio ambiente (pérdida o ganancia de humedad), por eso es importante mantener al producto a una humedad relativa adecuada, ya que esta puede ocasionar pérdida de masa, reducción del tamaño (debido a que el agua es uno de los principales componentes de las frutas y hortalizas para realizar sus procesos vitales, los frutos pierden una gran cantidad de agua mediante la transpiración) y en consecuencia pérdida de la calidad del fruto (*Quintero*, 2010).

La menor permeabilidad al agua de las películas de pectina permite una aplicación mayor en alimentos como frutos y hortalizas, ya que los frutos pierden agua debido a los procesos fisiológicos y de ese modo la pérdida de la firmeza del fruto se ve altamente afectada y en consecuencia la calidad del fruto, de esa manera se requiere de películas o recubrimientos con una moderada permeabilidad al agua.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos se establece que el tiempo de incubación necesario de la bacteria para obtener la fase estacionaria es de 8h a 37°C en agitación, por otro lado se establece que la concentración mínima inhibitoria del desinfectante es de 400 ppm mientras que la concentración mínima inhibitoria en los recubrimientos fue 7000 ppm para pectina y 8000 ppm para películas de alginato. Las dos formulaciones probadas fueron bactericidas, sin embargo la película de pectina cuenta con características más apropiadas para ser aplicadas en frutos y hortalizas. Esto permitiría fomentar la inocuidad después de la cosecha y durante su comercialización.

RECOMENDACIONES

Evaluar el antimicrobiano a base de ácidos orgánicos con diferentes patógenos presentes en alimentos.

Se sugieren la incorporación de otros agentes antimicrobianos en las matrices poliméricas empleadas en este proyecto.

Se recomienda ampliar la investigación dando seguimiento a la evaluación del efecto del recubrimiento de pectina sobre los parámetros de calidad del fruto.

Optimizar el recubrimiento de pectina que permita mantener en óptimas condiciones al aguacate para determinar la vida de anaquel del alimento con el recubrimiento, así como el cambio en propiedades texturales, organolépticas y sensoriales del fruto.

Evaluar el efecto de los recubrimientos aplicado a otros alimentos.

REFERENCIAS

Aguilar M. (2005). Propiedades físicas y mecánicas de películas biodegradables y su empleo en el recubrimiento de frutos de aguacate. Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional, México.

Avendaño R., López M., Palou E. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos, *Temas selectos de ingeniería en alimentos*. 7: 87-96

Appendini P., Hotchkiss J. H., (2002). Review of antimicrobial food packaging, *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 5: 113-126.

-Falguera V., Quintero J. P., Jimenez A., Aldemar M., Albert I. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use, *Food Science & Technology* 22: 299-303.

Herrera D. (2011). Desarrollo de dos recubrimientos comestibles con antimicrobianos naturales para carne no procesada. Tesis de licenciatura en Ingeniería en Alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Iturriaga L., Olabarrieta I., Martínez de Marañón I. (2012). Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. *International Journal of Food Microbiology* 158: 58-64

Jung H. Han (2014). Edible Films and Coatings: A Review, *Innovations in Food Packaging* 9: 213-255.

Maftoonazad N., Ramaswamy H. S. (2008). Effect of pectin-based coating on the kinetics of quality change associated with stored avocados, *Journal of Food Processing and Preservation*, 13: 621-643.

Mani L., García L., (2012). Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International*, 34: 713-721

Mehdi A., Masoud R., Hedayat H., Mehdi A., (2014). Antimicrobial activity of alginate/clay nanocomposite films enriched with essential oils against three common foodborne pathogens. *Food control*, 50: 1-7

NMX-bb-040-SCFI-1990, MÉTODOS GENERALES DE ANÁLISIS: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN PRODUCTOS GERMICIDAS, consultado: Mayo 15 del 2015, disponible en:<http://es.scribd.com/doc/235504261/nmx-bb-040-scfi-1999#scribd>

Quintero, C. J., & Aldemar, M. (2010). Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola. *Ciencias químicas*, 5: 93-118.

Saucedo S., Rojas M. R., Antonio A., Aide S., de La Garza H., Jasso C. ,(2009) Edible film based on candelilla wax to improve the shelf life and quality of avocado, *Food Research International*, 42: 511-515.

Tortora G., Funke B., Case C., (2007). Microbiology and introduction, 9 th Ed., Pearson education, p. 233-485.

Vera M. (2014). Desarrollo de un recubrimiento comestible antimicrobiano en el Jitomate variedad Saladette para control de *Salmonella*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, FES Cuautitlán México.