



INFORME BREVE

Eficiencia de la desinfección con aceites esenciales y ultrasonido sobre *Escherichia coli* inoculada en frutos de tomate y el impacto sobre la actividad antioxidante



María L. Luna Guevara*, Juan J. Luna Guevara, Héctor Ruiz Espinosa, Lucero Leyva Abascal y Carolina B. Díaz González

Colegio de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México

Recibido el 8 de agosto de 2014; aceptado el 7 de abril de 2015

Disponible en Internet el 29 de agosto de 2015

PALABRAS CLAVE

Aceites esenciales;
Actividad antioxidante;
Ultrasonido;
Tomate;
Escherichia coli;
Desinfección asistida

KEYWORDS

Essential oils;
Antioxidant activity;
Ultrasound;
Tomato;

Resumen La creciente demanda de frutos frescos puede constituir un riesgo para la salud de los consumidores, teniendo en cuenta la gran variedad de microorganismos que estos suelen albergar. El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia de varios procedimientos de desinfección sobre *Escherichia coli* enterotoxigénica (*enterotoxigenic E. coli* [ETEC]) inoculada en tomate y la conservación de las propiedades antioxidantes de los frutos desinfectados. Los frutos fueron sumergidos durante 5 o 10 min en dispersiones de aceites esenciales de orégano o tomillo (5 o 10 ppm), combinados o no con la aplicación de ultrasonido. La actividad antioxidante se determinó por la neutralización del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y se reportó como porcentaje de inhibición (%I). Los tratamientos de desinfección más eficaces para una significativa reducción \log_{10} UFG/g (S) de ETEC fueron con 10 ppm de aceite de orégano durante 10 min, con reducciones $S=3,05$ en tratamientos individuales y $S=4,03$ en mixtos. Los %I más altos se lograron con tratamientos individuales con sonicación (69,52 y 72,48) y en tratamientos combinados con aceite de tomillo 5 ppm y ultrasonido durante 5 y 10 min, con valores de 51,27 y 53,31 %, respectivamente.

© 2015 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Efficacy of disinfection treatments using essential oils and ultrasound on tomato fruits inoculated with *Escherichia coli* and impact on antioxidant activity

Abstract Fresh produce often harbors a great number of microorganisms; hence, its growing demand may constitute a risk for consumers. The aim of this study was to evaluate the efficacy of several disinfection procedures against enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) inoculated

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: lunaguevara@yahoo.com.mx (M.L. Luna Guevara).

Escherichia coli;
Assisted disinfection

on tomato fruits and the conservation of the antioxidant properties of these disinfected fruits. Fruits were immersed for 5 or 10 min in oregano or thyme essential oil dispersions (5, 10 ppm), with or without ultrasound treatment. Antioxidant activity of disinfected fruits was determined as the ability to scavenge 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals and was reported as percentage of inhibition (%I). The most efficient disinfectant treatments showing significant differences ($p \leq .05$) between the reductions \log_{10} CFU/g (S) of ETEC were those using 10 ppm oregano for 10 min, with $S = 3.05$ in individual treatments and $S = 4.03$ in mixed treatments. The highest %I was obtained with individual sonication treatments (69.52 and 72.48), while in combined treatments the %I values increased with thyme oil 5 ppm and ultrasound for 5 min (51.27%) and 10 min (53.31%).

© 2015 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia a nivel mundial debido a su gran consumo, comercialización e industrialización. Asimismo, este fruto se reconoce por sus propiedades antioxidantes y es la principal fuente de licopeno, de vitaminas A y C y de flavonoides; varios de estos compuestos están asociados con la prevención de serias enfermedades como el cáncer y las afecciones cardiovasculares⁴. Sin embargo, el consumo de tomate también se ha relacionado con múltiples brotes de enfermedades gastrointestinales causadas por patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella*¹.

Con la finalidad de remover y/o inactivar a los microorganismos presentes en este fruto, se requieren tratamientos de lavado y desinfección efectivos que contribuyan a mejorar la inocuidad de los productos. Reportes recientes han investigado la actividad antibacteriana y antioxidante de aceites esenciales provenientes del orégano (*Origanum vulgare*) y del tomillo (*Thymus vulgaris*)^{3,6}. Asimismo, existen estudios sobre el uso del ultrasonido como un método de descontaminación de productos frescos. Este resulta poco efectivo contra la eliminación de microorganismos patógenos y, por tanto, requiere aplicarse en conjunto con otros tratamientos de desinfección¹². De acuerdo con los antecedentes mencionados, en el presente estudio se evaluaron los efectos de diferentes tratamientos de desinfección de tomate en términos de efectividad antimicrobiana y el impacto sobre la actividad antioxidante de los frutos desinfectados.

Un total de 110 tomates Roma VF grado de madurez fisiológica provenientes de un invernadero con fertirrigación, ubicado en la Sierra Norte de Puebla, México, fueron colocados en bolsas de plástico estériles y transportados para su análisis.

Los frutos enteros fueron desinfectados en hipoclorito de sodio al 5% por 5 min, enjuagados con agua estéril, secados durante 5 min e inoculados con ETEC aislada previamente en suelos de invernaderos y frutos de tomate. La identificación de esta cepa se realizó mediante pruebas bioquímicas IMViC, con la adición de pruebas del sistema automatizado VITEK® (bioMérieux, México), y la confirmación se efectuó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la amplificación del gen *IngA*⁷.

Para la preparación del inóculo bacteriano se aseguró una población mayor de 10^7 UFC/ml con el ajuste a una densidad óptica (OD) de 1,1 a 620 nm. Esto fue verificado por

recuento en placa en medio agar eosina y azul de metileno (EMB, BD Bioxon, México), tras una incubación a 37 °C durante 24 h. La identidad de las colonias fue confirmada con pruebas bioquímicas clásicas IMViC.

La inoculación de los frutos se realizó por inmersión en caldo de soja tripticaseína (TSB, BD Bioxon, México) mediante agitación constante por 5 min, luego de lo cual los frutos fueron retirados de la solución y almacenados a 37 °C durante 90 min; el mencionado procedimiento permitió garantizar una población microbiana inicial de 1×10^7 UFC/g de fruto fresco.

Los frutos inoculados fueron sometidos a tratamientos de desinfección individuales (TxI) y mixtos (TxM) en dispersiones de aceites esenciales de orégano y tomillo, con ultrasonido o sin este, con tiempos de contacto de 5 y 10 min.

Los aceites fueron extraídos a partir de 100 g de hojas secas de cada especie en 1 l de agua bidestilada, y se empleó el método de hidrodestilación Clevenger con destilación durante 2 h¹⁰. Los aceites fueron dispersados en un buffer salino de fosfato, de modo de alcanzar concentraciones de 5 y 10 ppm en las soluciones desinfectantes.

Los tratamientos de desinfección TxI consistieron en introducir los frutos inoculados en bolsas de plástico estériles con agua destilada o con dispersiones de aceites de orégano y tomillo a las concentraciones y los tiempos de contacto previamente definidos. Para los tratamientos TxM, los tomates embolsados se colocaron en un baño ultrasónico Elmasonic S30H (Elma, Singen, Alemania) con una cuba de 2,75 l de capacidad máxima, que se operó a una frecuencia de 40 kHz, una potencia de 80 W y una temperatura de 40 °C durante el tiempo establecido.

Los recuentos microbianos de los frutos desinfectados se realizaron mediante diluciones decimales desde 10^{-2} hasta 10^{-7} ; de estas se sembraron 100 μ l por extensión en superficie en placas EMB, que luego fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. A partir de los recuentos microbianos se calcularon los factores de reducción logarítmica S, sobre la base de los valores \log_{10} UFC/g antes y después de la aplicación de cada tratamiento de desinfección. Se realizaron controles de frutos sin inocular que fueron sometidos a los tratamientos TxI y TxM de desinfección; en todas las muestras se confirmó la ausencia de *E. coli*.

La evaluación de la actividad antioxidante de los frutos sometidos a distintos tratamientos de desinfección se

Tabla 1 Reducción S en recuentos de *Escherichia coli* ETEC inoculada en frutos de tomate sometidos a distintos tratamientos de desinfección

Tratamiento	Concentración (ppm)	S (reducción log ₁₀ UFC/g) ^a	
		t _c = 5 min	t _c = 10 min
Sonicación	—	0,85 ± 0,07 e, H	0,84 ± 0,04 f, H
AE orégano	5	1,57 ± 0,025 d, FG	2,65 ± 0,17 c, BCD
AE orégano AE orégano + sonicación	10	2,53 ± 0,10 b, CD	3,05 ± 0,03 b, B
	5	2,58 ± 0,12 b, CD	3,82 ± 0,18 a, A
AE orégano + sonicación E tomillo	10	3,04 ± 0,083 a, B	4,03 ± 0,11 a, A
	5	0,01 ± 0,035 f, I	1,23 ± 0,03 e, GH
AE tomillo E tomillo + sonicación	10	1,57 ± 0,31 d, FG	2,26 ± 0,04 d, DE
	5	0,97 ± 0,16 e, H	1,94 ± 0,22 d, EF
AE tomillo + sonicación	10	2,10 ± 0,01 c, E	2,89 ± 0,01bc, BC

AE: aceite esencial; t_c: tiempo de contacto.

Las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los promedios de los tratamientos para un mismo tiempo de contacto. Las letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los promedios de todos los tratamientos.

^a Valores promedios (n = 3) ± una desviación estándar.

desarrolló mediante el procedimiento de neutralización del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, Sigma, EE. UU.). Se utilizaron extractos metanólicos que consistieron en 6 g de pericarpio y pulpa en 30 ml de una solución de metanol:agua (80:20% v/v) agitados a 125 rpm durante 12 h a 40 °C. Se mezclaron 500 µl de los extractos con 2 ml de la solución DPPH (0,1 mM), y tras 30 min de incubación se leyó la absorbancia a 517 nm, empleando metanol como blanco. Con los datos obtenidos se calcularon los porcentaje de inhibición del radical DPPH (%I) mediante la siguiente expresión:

$$\%I = (A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}/A_{\text{control}}) \times 100$$

donde A_{control} corresponde a la absorbancia de la solución DPPH y A_{muestra} es la absorbancia de los extractos metanólicos. Los frutos control fueron tomates sin inocular y sin ser sometidos a tratamientos de desinfección.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado considerando un diseño completamente aleatorizado. Los resultados de S y %I fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de doble vía. Las medias de los tratamientos fueron comparadas mediante el empleo de la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). Los análisis fueron realizados con el software estadístico Statistical Analysis System, GLM, versión 6.12.

Se obtuvieron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los valores de S con los tratamientos aplicados, y se observó un incremento en el efecto inhibitorio sobre el microorganismo inoculado a mayor tiempo de contacto (t = 10 min) con ambas concentraciones, 5 y 10 ppm (tabla 1).

Los TxI con el aceite esencial de orégano presentaron valores de S mayores que los del tomillo, con reducciones cercanas a 3 log₁₀ UFC/g con 10 ppm y 10 min. Esta observación se podría relacionar con la presencia de compuestos antimicrobianos como timol, carvacrol, α-pineno, γ-terpineno y p-cimeno, ya reportados por Oyedemi *et al.*⁸, o a la acción ejercida por la hidrofobicidad de los aceites de orégano, que propician la lisis celular al alterar la disposición de los lípidos de la membrana, con efectos sobre su permeabilidad.

Con referencia a los TxI con tomillo, los valores de S observados, entre 1,57 y 2,26 log₁₀ UFC/g con 10 ppm (tabla 1), fueron similares a los obtenidos por Singh *et al.*¹³, quienes aplicaron tratamientos de desinfección con 5 ppm durante 10 min en germinados de alfalfa inoculados con *E. coli*. Las investigaciones de Sartoratto *et al.*¹⁰ y Burt² asocian los efectos antimicrobianos del tomillo con contenidos de timol, γ-terpineno y p-cimeno.

El tratamiento individual con ultrasonido como única acción desinfectante resultó poco efectivo y con reducciones (S) similares para los 2 tiempos de contacto empleados (tabla 1); los valores S obtenidos fueron comparables a los encontrados por Seymour *et al.*¹² con condiciones de 26 KHz y agua destilada (39 °C) para la desinfección de perejil. De acuerdo con lo comunicado por Scherba *et al.*¹¹, el efecto inhibitorio de la sonicación sobre *E. coli* se relaciona con el incremento en la intensidad y es independiente de la duración de los tratamientos. La pérdida de viabilidad microbiana se debe a efectos mecánicos, primordialmente por cavitación, y este fenómeno produce un incremento en la temperatura y en la presión, que dañan la pared y la membrana celular bacteriana³.

Los TxM exhibieron en ciertas condiciones de desinfección efectos sinérgicos, y en otras, aditivos (tabla 1). El efecto sinérgico se manifestó con los aceites de orégano a 10 ppm durante 10 min, mientras que el aditivo se presentó con este mismo aceite a 5 ppm durante 10 min. La eficacia de los tratamientos mencionados son comparables con los resultados de Kim *et al.*⁵, quienes reportaron valores similares con una solución clorada a 2 mM en lechuga inoculada con *E. coli* 0157:H7.

Se ha demostrado que el uso del ultrasonido en forma conjunta con agentes desinfectantes o antimicrobianos incrementa la letalidad microbiana. Yu *et al.*¹⁵ comunicaron un incremento en la actividad bactericida de antibióticos con la aplicación de ultrasonido de baja intensidad (70 KHz), y atribuyen el efecto al fenómeno de sonoporación, el cual afecta la permeabilidad de la membrana celular y facilita el flujo de antimicrobianos hacia el interior de la célula.

Para los TxM con aceite de tomillo y sonicación, las reducciones más significativas se obtuvieron con 10 ppm de

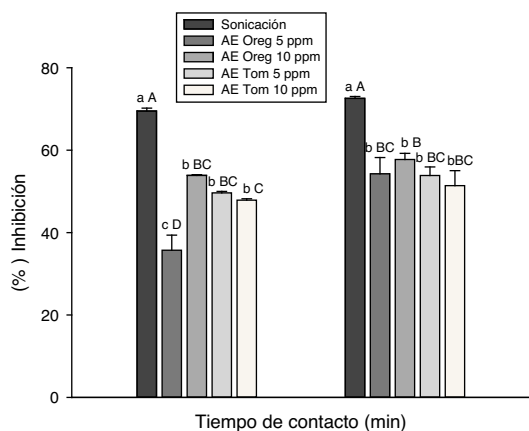


Figura 1 Actividad antioxidante expresada como % de inhibición del radical DPPH en frutos de tomate sometidos a tratamientos individuales de desinfección.

Las columnas representan valores promedios. Las barras verticales muestran \pm una desviación estándar ($n=3$). Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los promedios de los tratamientos para un mismo tiempo de contacto. Las letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los promedios de todos los tratamientos.

concentración de aceite aplicado durante 5 y 10 min (tabla 1). El valor máximo ($S = 2,89$) obtenido para este tratamiento fue comparable con el tratamiento individual de aceite de orégano a 5 y 10 ppm durante 10 min de contacto. Estos resultados fueron similares a los comunicados por Ruiz-Cruz *et al.*⁹, quienes aplicaron ácido peracético en concentraciones de 80 ppm para alcanzar valores de S de 2 y 3 con *E. coli* y *Salmonella*, respectivamente.

Por otra parte, el tratamiento combinado con 5 ppm de tomillo solo manifestó reducciones logarítmicas significativas con un mayor tiempo de contacto (tabla 1).

La mayor actividad antioxidante se verificó con la aplicación de sonicación, que fue significativamente mayor ($p \leq 0,05$) respecto de los frutos sometidos a los TxI con aceites (fig. 1). Estos resultados son congruentes con lo reportado por Vilku *et al.*¹⁴, quienes mencionan que la aplicación del ultrasonido favorece la extracción y la disponibilidad de los compuestos antioxidantes en vegetales. Los %I de los aceites esenciales presentaron diferencias significativas entre sí, y en general, la mejor actividad antioxidante se observó con el aumento del tiempo de contacto. Entre los frutos tratados con aceites, aquellos expuestos a 10 ppm de aceite esencial de orégano mostraron la mayor actividad antioxidante (fig. 1). Sin embargo, los %I obtenidos con los TxI con orégano y tomillo fueron menores en comparación con la aplicación de sonicación, con lo cual se podría inferir que si bien existen varios reportes que mencionan las propiedades antioxidantes de estas especias, los tratamientos con los aceites evaluados *per se* no permitirían incrementar la actividad antioxidante de los frutos desinfectados.

Se hallaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) al comparar los %I de los frutos expuestos a TxM en relación con la concentración de aceite esencial empleada; la mayor actividad antioxidante se verificó en frutos desinfectados con

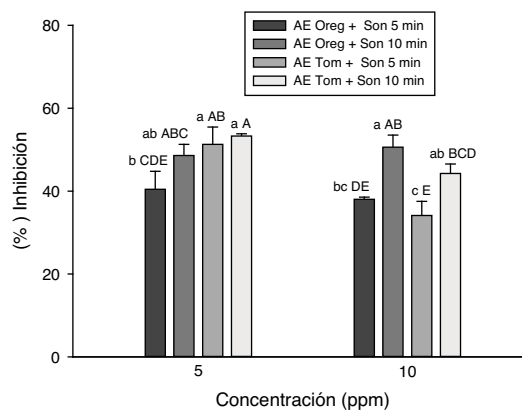


Figura 2 Actividad antioxidante expresada como % de inhibición del radical DPPH en frutos de tomate sometidos a tratamientos mixtos de desinfección.

Las columnas representan valores promedios. Las barras verticales muestran \pm una desviación estándar ($n=3$). Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los promedios de los tratamientos para una misma concentración. Las letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los promedios de todos los tratamientos.

tomillo 5 ppm (fig. 2). Estos valores fueron 21% (5 min) y 8,8% (10 min) más altos en comparación con los frutos sometidos a desinfección asistida con orégano, en las mismas condiciones (fig. 2).

Los resultados obtenidos en esta investigación permiten concluir que los TxI y TxM con aceites esenciales de orégano exhibieron la mayor actividad antimicrobiana sobre *E. coli* ETEC, que se manifestó con valores de reducciones logarítmicas entre 3 y 4. En relación con la actividad antioxidante, el tratamiento individual con sonicación fue el más eficaz; sin embargo, exhibió un efecto antimicrobiano mínimo ($S < 1$). Los %I más altos con desinfecciones combinadas se lograron con aceite de tomillo 5 ppm y ultrasonido durante 5 min (51,27%) y 10 min (53,31%).

Los resultados de este trabajo alientan el interés en la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento pos-cosecha de tomate que consideren de forma conjunta las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de tratamientos con aceites esenciales de ciertos vegetales, asistidos con sonicación.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Los autores agradecen al Programa para el Mejoramiento del Profesorado, perteneciente a la Secretaría de Educación Pública de México, por haber financiado este estudio a través de la convocatoria de apoyo a exbecarios N.º de Folio BUAP-EXB-768.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Berger C, Sodha SV, Shaw RK, Griffin PM, Pink D, Hand P, Frankel G. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ Microbiol.* 2010;12:2385–97.
- Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *Int J Food Microbiol.* 2004;94:223–53.
- Butz P, Tauscher B. Emerging technologies: Chemical aspects. *Food Res Int.* 2002;35:279–84.
- Juroszek P, Lumpkin H, Yang R, Ledesma D, Ma C. Fruit quality and bioactive compounds with antioxidant activity of tomatoes grown on farm: Comparison of organic and conventional management systems. *J Agric Food Chem.* 2009;57:1188–94.
- Kim J, Yousef A, Chism G. Use of ozone to inactivate microorganisms on lettuce. *J Food Saf.* 1999;19:17–34.
- Kulicic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem.* 2004;85:633–40.
- Luna Guevara ML, Delgado Alvarado A, Torres A, Avelino F.A., Navarro Ocaña A, Parada Guerra F. Diversity of enterobacteria associated with tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits and greenhouse soils. *Scientia Agropecuaria.* 2012;2:161–9.
- Oyedemi S, Okoh A, Mabinya L, Pirochenna G, Afolayan J. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, γ -terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *African J Biotechnol.* 2009;8:1280–6.
- Ruiz-Cruz S, González-Aguilar GA, Ornelas-Paz JJ, Cira-Chávez LA, Ayala-Zavala JF. Effect of Sanitizers and Oregano Essential Oils to Reduce the Incidence of *Salmonella* and Other Pathogens in Vegetables. En: Kumar Y, editor. *Salmonella – A Diversified Superbug.* Immunology and Microbiology. 2012. [On-line] [consultado 31 Jul 2014]. Disponible en: <http://www.intechopen.com/bugs/Salmonella-a-diversified-superbug/effect-of-sanitizers-and-oregano-essential-oils-to-reduce-the-incidence-of-salmonella-and-other-path>.
- Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian J of Microbiol.* 2004;35:275–80.
- Scherba G, Weigel R, O'Brien W. Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. *J Appl Environ Microbiol.* 1991;57:2079–84.
- Seymour I, Burfoot D, Smith RL, Cox LA, Lockwood A. Ultrasound decontamination of minimally processed fruits and vegetables. *J Food Sci Technol.* 2002;37:547–57.
- Singh N, Singh RK, Bhunia AK. Sequential disinfection of *Escherichia coli* O157:H17 inoculated alfalfa seeds before and during sprouting using aqueous chlorine dioxide, ozonated water, and thyme essential oil. *Lebensm-WissU-Technol.* 2003;36:235–43.
- Vilkhu K, Mawson R, Simons L, Bates D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry. *Innov Food Scie Emerg Technol.* 2008;9:161–9.
- Yu H, Chen S, Cao P. Synergistic bactericidal effects and mechanisms of low intensity ultrasound and antibiotics against bacteria: A review. *Ultrason Sonochem.* 2012;19:377–82.