



## EFFECTO DE SOLUCIONES ANTIMICROBIANAS EN POBLACIONES DE *Salmonella* Y COLOR DE CLADODIOS DE NOPAL VERDURA

### EFFECT OF ANTIMICROBIAL SOLUTIONS ON *Salmonella* POPULATIONS AND COLOR OF CLADODES OF NOPAL VEGETABLE

Christian A. Moreno-Rodas<sup>1</sup>, Ana Ma. Hernández-Anguiano<sup>1\*</sup>, Sergio Aranda-Ocampo<sup>1</sup>, Javier Suárez-Espinosa<sup>2</sup>, Patricia Landa-Salgado<sup>3</sup> y Javier Castro-Rosas<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados (CP), Campus Montecillo, Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. <sup>2</sup>CP, Posgrado en Socioeconomía, Estadística e Informática-Estadística, Campus Montecillo, Montecillo, Texcoco, Estado de México. <sup>3</sup>Universidad Autónoma Chapingo, Ingeniería Agroindustrial, Chapingo, Texcoco, Estado de México, México. <sup>4</sup>Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Área Académica de Química, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México.

\*Autora de correspondencia (ahernandez@colpos.mx)

#### RESUMEN

Durante la producción y manejo postcosecha del nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) existe el riesgo de contaminar el producto con microorganismos patógenos como *Salmonella*. Actualmente, se carece de un producto efectivo para eliminar a *Salmonella* de nopal verdura. Para prevenir enfermedades a los consumidores de este producto en fresco es importante contar con un desinfectante efectivo que elimine a la bacteria sin que se afecte el color del cladodio. El objetivo del estudio consistió en evaluar el efecto de diferentes compuestos orgánicos como extractos de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), mezcla de vinagre blanco y jugo de limón (*Citrus × latifolia*) 1:1 (v/v), y solución de ácido láctico 1.5 %, sobre cultivos de *Salmonella*, además de identificar su efecto sobre el color del tejido de nopal verdura fresco, sin espinas. Para las pruebas se utilizaron cladodios de nopal de las variedades Atlixco, Copena V1, Milpa alta y Villanueva, inoculados con una mezcla (7.6 log<sub>10</sub> UFC) de cepas de los serotipos S. Javiana y S. Typhimurium, resistentes a Kanamicina (Km<sup>50</sup>). Posterior al tiempo de incubación, los cladodios se pusieron en contacto con la solución desinfectante por 10 min, inmediatamente se lavaron con agua destilada estéril y se realizó la cuenta de bacterias al inocular en cajas con agar entérico Hektoen adicionado con Km<sup>50</sup> las muestras previamente tratadas. Los resultados obtenidos mostraron reducción significativa (P ≤ 0.05) de 2.4 log<sub>10</sub> mL<sup>-1</sup> en la población de *Salmonella* con todas las soluciones evaluadas (extractos de cálices de jamaica, mezcla de vinagre blanco y jugo de limón, y de ácido láctico). La luminosidad del tejido resultó afectada (P ≤ 0.05) sólo con la mezcla de vinagre y jugo de limón, por lo que se concluye que todos los desinfectantes probados son adecuados para mantener la inocuidad y la calidad del nopal verdura.

**Palabras clave:** *Hibiscus sabdariffa*, *Opuntia ficus-indica*, antibacterianos, jamaica.

#### SUMMARY

During the production and post-harvest handling of the nopal vegetable (*Opuntia ficus-indica*) there is a risk of contaminating this product with pathogenic microorganisms such as *Salmonella*. Currently, there is no effective product to eliminate *Salmonella* from fresh nopal vegetable. To prevent illnesses to consumers of this fresh product, it is important to have an effective disinfectant that eliminates the bacteria without affecting the color of the cladode. This research aimed to evaluate the effect of organic compounds such as hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) calyx extracts, a mixture

of white vinegar and lemon (*Citrus × latifolia*) juice 1:1 (v/v), and 1.5 % lactic acid solution on *Salmonella* cultures, as well as identify their effect on the color of fresh vegetable nopal tissue, without thorns. Nopal cladodes of the Atlixco, Copena V1, Milpa alta and Villanueva varieties were used for the tests, inoculated with a mixture (7.6 log<sub>10</sub> CFU) of strains of the serotypes S. Javiana and S. Typhimurium, resistant to Kanamycin (Km<sup>50</sup>). After the incubation time, cladodes were put in contact with the disinfectant solution for 10 min, they were immediately washed with sterile distilled water and the bacterial count was performed by inoculating the previously treated samples in boxes with Hektoen enteric agar added with Km<sup>50</sup>. Results obtained showed a significant reduction (P ≤ 0.05) of 2.4 log<sub>10</sub> mL<sup>-1</sup> in the *Salmonella* population with all the solutions evaluated (extracts of hibiscus calyces, a mixture of white vinegar and lemon juice, and lactic acid). The luminosity of the tissue was affected (P ≤ 0.05) only with the mixture of vinegar and lemon juice; thus, it is concluded that all the disinfectants tested are suitable to maintain the safety and quality of the nopal vegetable.

**Index words:** *Hibiscus sabdariffa*, *Opuntia ficus-indica*, antibacterials, hibiscus

#### INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, los productos hortofrutícolas frescos se han asociado con un aumento, a nivel internacional, en el número de brotes de infecciones de etiología microbiana transmitidas por alimentos (Dewey-Mattia *et al.*, 2018). Aunque diferentes bacterias enteropatógenas se han encontrado contaminando estos productos, *Salmonella* es el agente etiológico más comúnmente asociado con los brotes de enfermedades gastrointestinales por el consumo de productos hortofrutícolas frescos (Dewey-Mattia, 2018; Ramos *et al.*, 2013).

En México, las infecciones por *Salmonella* son endémicas, de éstas, tan solo en el período de enero de 2019 a octubre de 2020 se notificaron cerca de 170 mil casos (Secretaría de Salud, 2020). Los vegetales frescos de donde se ha aislado *Salmonella* son diversos, entre los

que se encuentran nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) (Hernández-Anguiano *et al.*, 2009, Com. Pers.)<sup>1</sup>, zanahoria (*Daucus carota*), cilantro (*Coriandrum sativum*), lechuga (*Lactuca sativa*) y espinaca (*Spinacia oleracea*) (Quiroz-Santiago *et al.*, 2009). *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium es el serotipo que se ha aislado con mayor frecuencia en los vegetales frescos en México (Quiroz-Santiago *et al.*, 2009; Rangel-Vargas *et al.*, 2017), el serotipo Javiana de *S. enterica* es otro más que se ha aislado de cladodios frescos de nopal verdura (Hernández-Anguiano *et al.*, 2009 Com. Pers.)<sup>1</sup>.

El consumo de nopal verdura fresco en ensaladas y jugos es común por los beneficios que aporta a la salud del consumidor (Feugang *et al.*, 2006). Aunque los tallos o cladodios de 15-20 cm conocidos como nopalitos, previo a su consumo, se lavan y se les retiran las espinas, con frecuencia no se someten a ningún proceso de desinfección para eliminar microorganismos patógenos que pudieran venir adheridos a la superficie del tejido. Un estudio realizado en México refiere la capacidad de algunos serotipos de *Salmonella* para colonizar la superficie de cladodios frescos (Landa-Salgado *et al.*, 2013).

Aunque existen diferentes productos desinfectantes, en la actualidad se carece de un tratamiento efectivo para eliminar a *Salmonella* y otras bacterias enteropatógenas de cladodios frescos de nopal verdura. En ausencia de un tratamiento o producto para la desinfección de los cladodios de nopal, los alimentos como las ensaladas y los jugos preparados con nopal fresco pueden ser vehículo de infección por *Salmonella* (Hernández-Anguiano *et al.*, 2016). En México es común utilizar soluciones de hipoclorito de sodio o de plata coloidal para desinfectar productos hortofrutícolas frescos en los hogares y establecimientos para consumo de alimentos. Aunque la Secretaría de Salud en México recomienda el uso de la plata coloidal como desinfectante de productos hortofrutícolas (Secretaría de Salud, 2015), existen reportes (Hernández-Anguiano y Landa-Salgado, 2016) que refieren que el hipoclorito de sodio, la plata coloidal, así como otros productos comerciales a base de cítricos, no muestran actividad antimicrobiana contra *Salmonella* en cladodios frescos de nopal sin espinas contaminados con la bacteria. Tanto el hipoclorito de sodio como el hipoclorito de calcio pierden su efectividad al entrar en contacto con la materia orgánica debido a reacciones de oxidación y por los cambios en el pH de la solución (Ramos *et al.*, 2013). Estas reacciones y cambios pueden además afectar la calidad del producto al

modificar el color del tejido de los productos hortofrutícolas frescos durante el tratamiento (Poimenidou *et al.*, 2016).

En la actualidad, la tendencia en las preferencias entre los consumidores es hacia utilizar alternativas naturales para realizar la desinfección de los productos hortofrutícolas frescos; por lo anterior, varios compuestos orgánicos y compuestos naturales extraídos de plantas se están probando como alternativas para eliminar *Salmonella* y otros patógenos de estos productos (Zhang *et al.*, 2020). Al respecto, el ácido láctico al 1.5 % aplicado por 10 a 15 min ha mostrado actividad antimicrobiana contra *Salmonella* en la variedad Milpa Alta de nopal sin espinas (Hernández-Anguiano y Landa-Salgado, 2016). Otras soluciones orgánicas como los extractos de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) han mostrado también actividad antimicrobiana contra *Salmonella* en lechuga y espinaca (Moore *et al.*, 2011), germinado de alfalfa (*Medicago sativa*) (Jaroni y Ravishankar, 2012), zanahoria (Gutiérrez-Alcántara *et al.*, 2016) y cilantro (Rangel-Vargas *et al.*, 2017); así mismo, el vinagre de uva (ácido acético) en mezcla con jugo fresco (ácido cítrico) de limón ha mostrado efectividad en contra de esta bacteria en arúgula (*Eruca sativa*), cebolla (*Allium cepa*) y zanahoria (Sengun y Karapinar, 2004; 2005).

Los extractos de cálices de jamaica y la mezcla de vinagre y jugo de limón se han probado en productos hortofrutícolas con poca o ninguna producción de exudados vegetales, por lo que su efectividad pudiera variar en cladodios de nopal verdura fresco sin espinas. Al cortar los cladodios de la planta y retirar las espinas de éstos, el tejido de nopal secreta una sustancia mucilaginoso (heteropolisacárido soluble en agua) que pudiera afectar la actividad antimicrobiana de esas soluciones. Cabe señalar que, una solución antimicrobiana para ser considerada altamente eficiente en la desinfección de productos hortofrutícolas, debe reducir por lo menos en 3 log (99.9 %) la concentración de bacterias patógenas (AOAC, 1995; Yoon y Lee, 2018), por lo que los extractos de cálices de jamaica, aunque han mostrado efectividad antimicrobiana, no son altamente eficientes, ya que ocasionan reducción menor a 3 log, o menor a 99.9 %, en la concentración de bacterias patógenas en los vegetales.

Recientemente, se desarrollaron y patentaron soluciones conteniendo extractos de cálices de jamaica en mezcla con otros compuestos, los cuales reducen microorganismos patógenos en los vegetales en al menos 4 log (99.99 %) (Castro-Rosas y Gómez-Aldapa, 2019a; b; c); sin embargo, estas soluciones se desarrollaron para desinfectar un solo tipo de producto, ya sea para tomate (*Solanum lycopersicum*) (Castro-Rosas y Gómez-Aldapa, 2019a), manzana (*Malus domestica*) (Castro-Rosas

<sup>1</sup>Hernández-Anguiano A. M., P. Landa-Salgado, G. Mora-Aguilera, C. A. Eslava-Campos, J. E. Call, A. C. S. Porto-Fett and J. B. Luchansky (2009) Characterization of *Salmonella* spp. from nopal leaves and associated soil and water samples in Morelos, México. In: IAFP 96th Annual Meeting. July 12-July 15, 2009. International Association for Food Protection. Grapevine, Texas 37:74-75.

y Gómez-Aldapa, 2019 b) o lechuga (Castro-Rosas y Gómez-Aldapa, 2019c).

Actualmente, se desconoce la efectividad antimicrobiana de las soluciones patentadas de extractos de jamaica en otros productos hortofrutícolas; es posible que estas soluciones patentadas puedan eliminar o reducir significativamente los niveles de *Salmonella* en cladodios de nopal verdura sin espinas.

Contar con un desinfectante efectivo que elimine a *Salmonella* sin alterar el color de los cladodios de nopal verdura sin espinas es deseable, para prevenir enfermedades a los consumidores de este producto en fresco o semiprocesado. Normalmente algunos desinfectantes afectan componentes de calidad como el color del tejido de los productos hortofrutícolas frescos debido al cambio de pH durante el tratamiento (Poimenidou *et al.*, 2016). Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de tres soluciones desinfectantes patentadas que contienen extractos de cálices de jamaica, de una mezcla de vinagre blanco y jugo fresco de limón y de una solución de ácido láctico, sobre la reducción de la población de *Salmonella* y el color de cladodios de nopal verdura fresco sin espinas, contaminados con esta bacteria.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Características de cladodios

Cladodios frescos de 16 a 20 cm de largo (50 a 100 g) de las variedades Atlixco, Copena V1, Milpa alta y Villanueva se cosecharon de plantas de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) crecidas en invernadero durante el ciclo primavera-invierno de 2018. Normalmente, los cladodios con esas características son los que se comercializan y consumen en fresco como "nopalitos" (Feugang *et al.*, 2006). Inmediatamente después de la cosecha, los cladodios se lavaron con agua de la llave, se les retiraron las espinas con un cuchillo estéril, se enjuagaron con agua destilada estéril y secaron con toallas estériles de papel Sanitas®.

### Preparación del inóculo de *Salmonella*

Se utilizaron cuatro cepas de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* (Beuchat *et al.*, 2001): dos cepas (N4 y N14) de *Salmonella* serotipo Javiana (*S. Javiana*) y dos cepas (N16 y Sal4) de *Salmonella* serotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*). Las cepas N4, N14 y N16 se aislaron de cladodios de nopal verdura (Hernández-Anguiano *et al.* 2009 Com. Pers.)<sup>1</sup>, y la cepa Sal4 fue una cepa certificada control de *S. Typhimurium* (ATCC23564). Todas las cepas de *Salmonella* fueron resistentes a 50 µg mL<sup>-1</sup> de

Kanamicina (Km<sup>50</sup>, Sigma-Aldrich®). Para la preparación del inóculo, por separado, cultivos de N4, N14, N16 y Sal4 se sembraron sobre agar soya tripticaseína (AST, BD Bioxon®) suplementado con Km<sup>50</sup> (AST + Km<sup>50</sup>). Transcurridas 72 h, las células bacterianas se suspendieron en 0.1 % de agua peptonada amortiguada (APA, Difco™) estéril y se transfirieron a tubos de ensayo esterilizados. Previo a la preparación del inóculo, la densidad óptica de cada suspensión se ajustó a un valor de 0.520 de absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro (Génesis® UV, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Una lectura de 0.520 correspondió a 8.6 log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup>. De cada suspensión se tomaron 2 mL, los cuales se depositaron en un tubo de ensayo esterilizado y la mezcla obtenida se agitó por 10 s en un vortex (Mixer®, Heatwrow Scientific, Vernon Hills, Illinois, EUA).

### Inoculación de cladodios con *Salmonella*

Se depositaron 100 µL (7.6 log<sub>10</sub> UFC) de mezcla bacteriana o 100 µL de APA 0.1 % en el centro del cladodio. Para esto se definió superficialmente una sección ("rodaja") de 4.5 cm de diámetro sobre la cual se distribuyó el inóculo en pequeñas gotas sobre la superficie del tejido (Beuchat *et al.*, 2001). En total se inocularon 21 cladodios con la mezcla de *Salmonella* y tres cladodios con APA 0.1 % por variedad. Después de la inoculación, los cladodios se mantuvieron en una cámara de bioseguridad (Thermo Forma® Class II Biological Safety Cabinet, Marshall Scientific, Hampton, NH, EUA) a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) por 18 h para permitir el secado y adherencia del inóculo al tejido.

### Soluciones desinfectantes y tratamientos

Se utilizaron cinco soluciones con actividad antimicrobiana. Una solución de ácido láctico (Fermont® 85 %) al 1.5 % (T1); tres soluciones que contenían extractos de cálices de jamaica: extracto metanólico seco (1 %) (T2), extracto acetónico seco (1%) (T3), y extracto acuoso seco (1 %) (T4). Cada una de estas soluciones (T2, T3 y T4) formulada con ácido acético (0.1 %), polisorbato 80 (aceite derivado de coco) (2 %), hipoclorito de sodio (50 ppm) y preparada como se describe en los documentos técnicos respectivos de cada patente (Castro-Rosas y Gómez-Aldapa, 2019a; b; c). Se evaluó además el efecto de una mezcla de vinagre blanco (La Costeña®) y jugo fresco de limón 1:1 (v/v) (T5). El vinagre fue una presentación comercial de alcohol de caña al 5 % de acidez y metabisulfito de sodio. El jugo de limón se extrajo con un exprimidor de limones lavados con agua de la llave. La solución de ácido láctico se preparó diluyendo un volumen de ácido en un volumen de agua destilada estéril. Tanto la mezcla de vinagre y jugo de limón como la solución de ácido láctico se prepararon al momento de su utilización.

En el Cuadro 1 se indican los tratamientos (T) establecidos, así como las características de concentración y pH de los desinfectantes. Los tratamientos T1 a T6 se aplicaron por inmersión del tejido a las 18 h después de la inoculación con *Salmonella* o APA 0.1 %; para ésto, la rodaja del tejido (5 g) inoculado se extrajo con un sacabocado estéril (4.5 cm de diámetro) y se sumergió en un recipiente de plástico nuevo de 100 mL (Bosco®, México) con 45 mL de desinfectante (T1, T2, T3, T4 o T5) o agua destilada estéril (T6) por 10 min; después, el tejido tratado se sumergió en un recipiente nuevo con 45 mL de agua destilada estéril por 3 s para enjuagar el tejido. Los tratamientos T6, T7 y T8 (testigos) se incluyeron para conocer el efecto de arrastre durante el proceso de enjuague del tejido (T6), el número de células viables de *Salmonella* al momento de aplicar el desinfectante (T7) y la presencia de *Salmonella* en los cladodios previo a la inoculación (T8).

### Diseño y unidad experimental

Se estableció un diseño en bloques completos para contrastar el efecto de la variedad (bloque) y del desinfectante (tratamiento). Así mismo, se establecieron dos diseños completamente aleatorios; uno para la comparación del pH, donde se comparó el efecto de las variedades, y otro para la comparación del color, donde para cada variedad se hizo la comparación en comento. En total se establecieron dos experimentos por tratamiento y por variedad de nopal; se utilizaron tres repeticiones y la unidad experimental consistió de un cladodio. Previo a la aplicación de los tratamientos, se estimó el pH del tejido en tres diferentes puntos (punta, centro y base) del cladodio de cada variedad de nopal (n = 12), con un potenciómetro

portable (Modelo 213 HI 98230, Hanna Instruments, Nusfalau, Rumania). La efectividad del desinfectante se definió mediante la diferencia entre los valores ( $\log_{10}$  de UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) obtenidos con el tratamiento T7 sin desinfectante y el tratamiento respectivo con desinfectante (T1, T2, T3, T4 o T5).

### Cuantificación de la población de *Salmonella*

Inmediatamente después del tratamiento, cada rodaja de tejido se colocó en una bolsa de plástico Ziploc® estéril (17.7 × 19.5 cm) con 45 mL de APA 0.1 % y se maceró en un molino (Seward® 400 Circulator, Bohemia, NY, EUA) a 300 unidades g por 120 s. Del macerado obtenido se tomaron dos muestras, una de 100  $\mu\text{L}$  para siembra directa en agar entérico Hektoen (BD Bioxon®) adicionado con Km<sup>50</sup> (AEH-Km<sup>50</sup>) y otra de 1 mL para hacer diluciones seriales en APA 0.1 %. De cada dilución, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  para siembra en AEH-Km<sup>50</sup>; transcurridas 72 h a  $33 \pm 2$  °C se realizó el conteo de colonias típicas de *Salmonella*; asimismo, se tomaron muestras de los tratamientos residuales T1 a T5 y del agua de enjuague para siembra directa; sin embargo, en estas muestras no se detectaron colonias de *Salmonella* en AEH-Km<sup>50</sup>.

### Efecto de los desinfectantes en el color del tejido

Se registraron cambios en el color ( $L^*$ , índice de oscurecimiento o luminosidad) del tejido de cada cladodio, de cada variedad, con un colorímetro (Serie 5348, Modelo XE Plus No. 45, HunterLab, MiniScan™, Mentor, OH, EUA), antes y después de aplicar los tratamientos T1 a T6 (McGuire, 1992).

**Cuadro 1. Relación de tratamientos para determinar la efectividad de los desinfectantes en nopal.**

	Tratamiento (T) <sup>††</sup>	Concentración	pH
Con <i>Salmonella</i> <sup>†</sup>			
T1	Ácido láctico	1.5 %	2.2
T2	Extracto metanólico de cálices de jamaica	1.0 %	2.1
T3	Extracto acetónico de cálices de jamaica	1.0 %	2.1
T4	Extracto acuoso de cálices de jamaica	1.0 %	2.5
T5	Vinagre + jugo de limón	1:1 (v/v)	2.3
T6	Agua destilada estéril		6.5
T7	Sin desinfectante ni agua destilada estéril		
Sin <i>Salmonella</i>			
T8	Sin desinfectante ni agua destilada estéril		

<sup>†</sup>Inóculo inicial: 7.6  $\log_{10}$  UFC. <sup>††</sup>Los tratamientos T1 a T6 se aplicaron por inmersión por 10 min (n = 3 cladodios).

**Análisis estadístico**

Los datos en UFC mL<sup>-1</sup> se analizaron con el paquete estadístico R × 64 3.4.1, la regresión de Poisson y la comparación de efecto de tratamiento (P ≤ 0.05). Las diferencias de pH entre variedades se analizaron por Kruskal-Wallis. El efecto del desinfectante en el color del tejido se determinó con un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey (P ≤ 0.05).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Efecto del desinfectante en la población de *Salmonella***

Es práctica común utilizar mezclas de cepas de un mismo género, especie, o como en este trabajo, de diferentes serotipos de un mismo género para realizar estudios del comportamiento de los microorganismos en alimentos o para evaluar procesos de desinfección de productos hortofrutícolas (Beuchat *et al.*, 2001). La información del comportamiento de la mezcla de cepas bacterianas proporciona información robusta, con la ventaja de ahorro de tiempo y material, al realizar un estudio con la mezcla que al realizar estudios individuales. Por otro lado, la evidencia científica disponible muestra que, en diferentes casos, no es necesario realizar estudios del comportamiento de bacterias patógenas con cepas de manera individual para diferentes estudios en alimentos.

Los tratamientos por inmersión con desinfectante T1 ácido láctico, T2 extracto metanólico, T3 extracto

acetónico, T4 extracto acuoso y T5 mezcla de vinagre y jugo de limón, redujeron significativamente (P ≤ 0.05) la población de *Salmonella* en el tejido de nopal verdura fresco sin espinas en comparación con el tratamiento T6 agua destilada estéril; sin embargo, entre los tratamientos con desinfectante no se observaron diferencias (P > 0.05) (Cuadro 2). Al comparar la media de la población registrada con los tratamientos T6 agua destilada estéril y T7 sin desinfectante ni agua destilada estéril se observaron diferencias (P ≤ 0.05) (Cuadro 2). Estas diferencias entre los tratamientos T6 y T7 pueden estar relacionadas con un efecto de "arrastré" de células no adheridas (0.3 log<sub>10</sub> mL<sup>-1</sup>, en promedio) durante la inmersión del tejido en el agua destilada estéril del T6. Con el tratamiento T8 sin desinfectante ni agua destilada estéril no se detectaron células presuntivas de *Salmonella*. Estos resultados indican que los cladodios utilizados en este estudio estaban libres de células de *Salmonella* y que las poblaciones recuperadas con los tratamientos T1 a T6 corresponden a las del inóculo aplicado.

En el análisis estadístico donde se contrastaron los tratamientos T1 a T7, la regresión de Poisson y la prueba de comparación de efectos de tratamientos encontraron y diferenciaron (P ≤ 0.05) tres grupos (Cuadro 2). Los Grupos 1 y 2 conformados por los tratamientos T7 y T6, respectivamente, se caracterizaron por presentar numerosas colonias (4.05 log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup> en promedio) de *Salmonella*; en contraste, el Grupo 3, tratamientos T1 a T5, presentó menos de la mitad de las colonias (1.98 log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup>) registradas entre los Grupos 1 y 2.

**Cuadro 2. Población de *Salmonella*<sup>†</sup> (log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup>) en variedades de nopal inmediatamente después del tratamiento.**

Tratamiento (T)	Variedad / pH de tejido				Media de población por T
	Atlixco	Copena V1	Milpa Alta	Villanueva	
	4.5 ab	4.9a	4.2bc	4.1c	
T1 Ácido láctico	2.00	2.54	2.07	1.70	2.08 ± 0.3c <sup>††</sup>
T2 Extracto metanólico de jamaica	2.40	1.92	1.52	1.22	1.77 ± 0.5c
T3 Extracto acetónico de jamaica	2.12	2.18	1.92	1.82	2.01 ± 0.2c
T4 Extracto acuoso de jamaica	2.22	2.68	2.26	1.52	2.17 ± 0.5c
T5 Vinagre + jugo de limón	2.40	1.92	1.22	-	1.85 ± 0.6c
T6 Agua destilada estéril	4.02	4.07	3.57	4.07	3.93 ± 0.2b
T7 Sin desinfectante ni agua destilada estéril	4.24	4.25	4.16	4.27	4.23 ± 0.05a
Media de población por variedad	2.77 ± 0.9a	2.79 ± 1.0a	2.39 ± 0.8b	2.43 ± 1.4a	

<sup>†</sup>Inóculo inicial: 7.6 log<sub>10</sub> UFC. <sup>††</sup>Promedio de dos experimentos, cada uno con tres repeticiones (n = 3). - Sin valor, sin recuperación de células de *Salmonella* en AEH-Km<sup>50</sup>. Comparaciones de medias: 1) Medias con letras iguales en la hilera superior, debajo del nombre de las variedades, no son estadísticamente diferentes para pH del tejido (Kruskal Wallis, P ≤ 0.05). 2) Medias con letras iguales en la columna de la derecha no son estadísticamente diferentes entre tratamientos de desinfección (P ≤ 0.05). 3) Medias con letras iguales en la hilera inferior no son estadísticamente diferentes entre variedades (P ≤ 0.05)



Al estimar la media de reducción por tratamiento (T1 a T5) en la población de *Salmonella*, ésta se encontró entre  $2.06 \pm 0.5 \log_{10}$  UFC mL<sup>-1</sup> (T4 extracto acuoso de jamaica) y  $2.85 \pm 1.0 \log_{10}$  UFC mL<sup>-1</sup> (T5 mezcla de vinagre y jugo de limón) (Cuadro 3). Estos resultados contrastan con la media en reducción obtenida con el T6 agua destilada estéril ( $0.3 \log_{10}$  mL<sup>-1</sup>). Lo anterior revela la importancia de incluir un desinfectante en el proceso de lavado y enjuague de los cladodios de nopal, previo a su consumo en fresco, para reducir el riesgo de enfermedad por *Salmonella*, en caso de contaminación accidental (Zhang *et al.*, 2020).

Por otra parte, al comparar las medias de la población de *Salmonella* (Cuadro 2) y las medias de la reducción de la concentración de *Salmonella* (Cuadro 3), en ambos casos se encontraron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) entre variedades de nopal. Estas diferencias en la población y en la reducción de la concentración después de la desinfección entre variedades se explica principalmente por las diferencias ( $P \leq 0.05$ ) de pH (Cuadro 2). En Milpa Alta y Villanueva, con pH promedio de 4.1, se registró mayor reducción ( $0.7 \pm 0.2 \log_{10}$ ) en la población de *Salmonella* que en Atlixco y Copena V1, con pH promedio de 4.7 (Cuadro 2). Todas las soluciones desinfectantes utilizadas en el presente estudio contenían ácidos orgánicos (láctico, acético o cítrico); en éstos, la forma activa es la forma no disociada del ácido, cuya concentración se incrementa al disminuir el pH del medio (Fernández, 2008), por lo que es de esperar que a pH 4.1 se tenga mayor concentración de formas no disociadas que a pH 4.7, y en consecuencia, se registre mayor efecto antimicrobiano de las soluciones a pH 4.1 que a pH 4.7 (Cuadros 2 y 3).

En este estudio, los resultados obtenidos con el tratamiento T1 ácido láctico en la reducción en

la población de *Salmonella* son semejantes a los previamente reportados para nopal verdura fresco sin espinas (Hernández-Anguiano y Landa-Salgado, 2016); así mismo, los resultados registrados con los desinfectantes patentados de los tratamientos T2, T3 y T4 son semejantes a los obtenidos sólo con extractos de jamaica cuando se aplicaron a rodajas de zanahoria y hojas de cilantro (con poco o ningún exudado vegetal), donde la población de *Salmonella* se redujo entre 2.0 y  $2.5 \log_{10}$  mL<sup>-1</sup> (Gutiérrez-Alcántara *et al.*, 2016; Rangel-Vargas *et al.*, 2017). En el presente estudio, los tres desinfectantes patentados aplicados a los cladodios de nopal contenían cuatro veces menos concentración de extracto de jamaica (1 %) que las soluciones de extracto de jamaica (5 %) previamente utilizadas para desinfectar zanahoria y cilantro (Gutiérrez-Alcántara *et al.*, 2016; Rangel-Vargas *et al.*, 2017). Lo anterior indica que aún en tejido con alta producción de exudados vegetales, como lo es el del nopal verdura, los tres desinfectantes patentados y con mucho menor concentración de extracto de jamaica que lo reportado en otros estudios, mantuvieron su actividad antimicrobiana.

Por otra parte, con el tratamiento T5 mezcla de vinagre blanco y jugo de limón se recuperaron células de *Salmonella* ( $1.85 \pm 0.6 \log_{10}$  UFC mL<sup>-1</sup>, en promedio) en todas las variedades de nopal, con excepción de Villanueva (Cuadro 2). Se ha reportado (Sengun y Karapinar, 2005; 2004) que la mezcla de vinagre de uva y jugo fresco de limón ocasiona reducción a nivel indetectable en las poblaciones de *S. Typhimurium* en arúgula y cebolla a los 15 min de tratamiento, y en zanahoria a los 30 min. Las diferencias en la actividad antimicrobiana entre los estudios se puede atribuir al tiempo de inmersión del tratamiento, así como a las características propias del tejido tratado (con poca o ninguna producción de exudados vegetales).

**Cuadro 3. Reducción de la concentración de *Salmonella*<sup>†</sup> ( $\log_{10}$  UFC mL<sup>-1</sup>) en variedades de nopal inmediatamente después del tratamiento.**

Tratamiento (T)	Variedad				Media de reducción por T
	Atlixco	Copena V1	Milpa Alta	Villanueva	
T1 Ácido láctico	2.24 <sup>**</sup>	1.71	2.09	2.57	2.15 ± 0.3
T2 Extracto metanólico de jamaica	1.84	2.4	2.64	3.05	2.48 ± 0.6
T3 Extracto acetónico de jamaica	2.12	2.07	2.24	2.45	2.22 ± 0.2
T4 Extracto acuoso de jamaica	2.02	1.57	1.90	2.75	2.06 ± 0.5
T5 Vinagre + jugo de limón	1.84	2.33	2.94	4.27	2.85 ± 1.0
Media de reducción por variedad	2.01 ± 0.3c	2.02 ± 0.2c	2.36 ± 0.3b	3.02 ± 0.3a	

<sup>†</sup>Inóculo inicial:  $7.6 \log_{10}$  UFC mL<sup>-1</sup>. <sup>\*\*</sup>La reducción de la concentración se determinó mediante la diferencia entre el valor obtenido con T7 (sin desinfectante ni agua destilada estéril) y el valor de T1, T2, T3, T4 o T5 indicado en el Cuadro 2. Medias con letras iguales en la hilera inferior no son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

### Efecto del desinfectante en el color del tejido de nopal

Con excepción del tratamiento T5 mezcla de vinagre y jugo de limón, los tratamientos T1 a T4 no afectaron significativamente ( $P \leq 0.05$ ) la luminosidad o el índice de oscurecimiento del tejido de nopal verdura, en comparación con la luminosidad registrada en el testigo T6 agua destilada estéril (Figura 1).

En contraste, el tratamiento T5 afectó significativamente ( $P \leq 0.05$ ) la luminosidad del tejido en comparación con la luminosidad registrada en los tratamientos con desinfectante T1 a T4 y T6 agua destilada estéril (Figura 1). La superficie del tejido de los cladodios con T5 se observó con aspecto blanquecino. Es sabido que tiempos prolongados de sanitización pueden afectar componentes de calidad como son el color, textura y sabor de los productos hortofrutícolas frescos (Sagong *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2013). El problema de la alteración del color del tejido con el tratamiento T5 se podría superar si se reduce el tiempo de exposición o bien se exploran otras concentraciones de la mezcla sin afectar su efecto antimicrobiano, debido a que la mezcla de vinagre y jugo de limón resultó ser una solución antimicrobiana natural y de fácil preparación para la desinfección de los cladodios de nopal verdura sin espinas.

Para la inocuidad del nopal verdura es importante contar con un desinfectante efectivo como medida preventiva; sin embargo, la implementación de buenas prácticas

agrícolas y de manejo durante la producción, cosecha y empacado o en la distribución y comercialización de este cultivo es altamente recomendable para la prevención de enfermedades ocasionadas por microorganismos patógenos que pudieran alojarse en este producto de consumo en fresco (Angeles-Núñez *et al.*, 2014).

### CONCLUSIONES

Todos los desinfectantes evaluados pueden emplearse como alternativa para mantener la inocuidad microbiana del nopal verdura fresco sin espinas. Los tres desinfectantes que contenían extractos de cálices de jamaica, la mezcla de vinagre blanco y jugo de limón, y el ácido láctico redujeron significativamente las poblaciones de *Salmonella* en cladodios fresco de nopal verdura sin espinas, artificialmente inoculados con la bacteria. Con excepción de la mezcla de vinagre blanco y jugo de limón, las soluciones no afectaron el color del tejido de nopal cuando se aplicaron por inmersión por 10 min; la mezcla afectó la luminosidad del tejido.

### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca 461807 otorgada al primer autor para realizar sus estudios de posgrado. Al Dr. Serafín Cruz Izquierdo por el apoyo para conseguir las variedades de nopal y por el espacio otorgado para el crecimiento de las plantas.

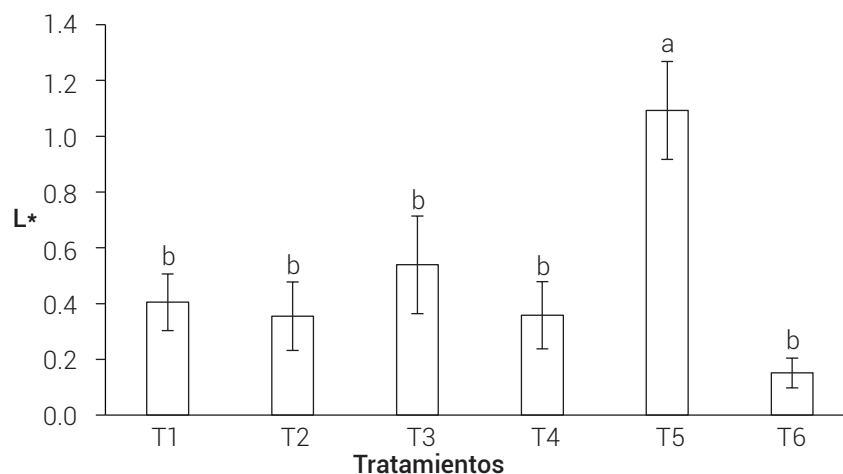


Figura 1. Luminosidad del tejido de nopal verdura después del tratamiento con desinfectantes (T1 a T5) o agua destilada estéril (T6). Las barras refieren la media de la diferencia ( $\pm$  D.E.) de los valores de  $L^*$  antes y después de la aplicación del tratamiento: (T1) ácido láctico 1.5 %, (T2) extracto metanólico, (T3) acetónico, y (T4) acuoso de cálices de jamaica, (T5) mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) y (T6) agua destilada estéril. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

## BIBLIOGRAFÍA

- Angeles-Núñez J. G., J. L. Anaya-López, M. L. Arévalo-Galarza, G. Leyva-Ruelas, S. Anaya-Rosales y T. O. Martínez-Martínez (2014) Análisis de la calidad sanitaria de nopal verdura en Otumba, Estado de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5:129-141, <https://doi.org/10.29312/remexca.v5i1.1016>
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists (1995) AOAC official method 960.09. Germicidal and detergent sanitizing action disinfectants. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, MD, USA. pp:9-11.
- Beuchat L. R., J. M. Farber, E. H. Garret, L. J. Harris, M. E. Parish, T. V. Suslow and F. F. Busta (2001) Standardization of a method to determine the efficacy of sanitizers in inactivating human pathogenic microorganisms on raw fruits and vegetables. *Journal of Food Protection* 64:1079-1084, <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.7.1079>
- Castro-Rosas J. y C. A. Gómez-Aldapa (2019a) Desinfectantes fitoquímicos para lechuga (*Lactuca sativa*). Patente No. MX 369180 B. México. <https://patentimages.storage.googleapis.com/36/88/9d/68146b332819da/WO2015088309A1.pdf> (Diciembre 2020).
- Castro-Rosas J. y C. A. Gómez-Aldapa (2019b) Desinfectantes para manzana (*Malus domestica*) a base de plantas. Patente No. MX 369179 B. México. <https://patentimages.storage.googleapis.com/9c/a7/9c/653f2a19bd097e/WO2015088310A1.pdf> (Diciembre 2020).
- Castro-Rosas J. y C. A. Gómez-Aldapa (2019c) Soluciones fitoquímicas útiles como desinfectantes de tomates (*Solanum lycopersicum*). Patente No. MX 369177 B. México. <https://patentimages.storage.googleapis.com/16/70/9f/cf59feaa254fa9/WO2015088308A1.pdf> (Diciembre 2020).
- Dewey-Mattia, D., K. Manikonda, A. J. Hall, M. E. Wise and S. J. Crowe (2018) Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 2009–2015. *Morbidity and Mortality Weekly Report—Surveillance Summaries* 67:1-11.
- Fernández E. E. (2008) Preservación de alimentos, ácido orgánico. In: Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Segunda edición. E. Fernández E. (ed.). Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México pp:719-722.
- Feugang J. M., P. Konarski, D. Zou, F. C. Stintzing and C. Zou (2006) Nutritional and medicinal use of cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Frontiers in Bioscience* 11:2574-2589, <https://doi.org/10.2741/1992>
- Gutiérrez-Alcántara E. J., C. A. Gómez-Aldapa, A. D. Román-Gutiérrez, E. Rangel-Vargas, L. G. González-Olivares and J. Castro-Rosas (2016) Antimicrobial activity of roselle *Hibiscus sabdariffa* calyx extracts on culture media and carrots against multidrug resistant *Salmonella* strains isolated from raw carrots. *Journal of Food Safety* 36:450-458, <https://doi.org/10.1111/jfs.12259>
- Hernández-Anguiano A. M. and P. Landa-Salgado (2016) Effectiveness of commercial sanitizers for reducing *Salmonella* on tender cactus pads (*Opuntia ficus-indica*). In: Proceedings of IAFP 5<sup>th</sup> Latin American Symposium in Food Safety and 7<sup>th</sup> Food Science, Biotechnology and Safety Meeting. . 9-11 November, 2016. G. V. Nevárez-Moorillón (ed.). Asociación Mexicana de Ciencias de los Alimentos A.C. Cancún, Quintana Roo, Mexico. pp: 709-714.
- Hernández-Anguiano A. M., P. Landa-Salgado, C. Eslava-Campos, M. Vargas-Hernández and J. Patel (2016) Microbiological quality of fresh nopal juice. *Microorganisms* 4:46, <https://doi.org/10.3390/microorganisms4040046>
- Jaroni D. and S. Ravishankar (2012) Bactericidal effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) against foodborne pathogens *in vitro* and on romaine lettuce and alfalfa sprouts. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods* 4:33-40, <https://doi.org/10.1111/j.1757-837X.2011.00117.x>
- Landa-Salgado P., A. M. Hernández-Anguiano, M. Vargas-Hernández, C. A. Eslava-Campos, C. Chaidez-Quiroz y J. Patel (2013) Persistencia de *Salmonella* Typhimurium en nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) *Revista Fitotecnia Mexicana* 36:147-153, <https://doi.org/10.35196/rfm.2013.2.147>
- McGuire R. G. (1992) Reporting of objective color measurements. *HortScience* 27:1254-1255, <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.27.12.1254>
- Moore K. L., J. Patel, D. Jaroni, M. Friedman and S. Ravishankar (2011) Antimicrobial activity of apple, hibiscus, olive, and hydrogen peroxide formulations against *Salmonella enterica* on organic leafy greens. *Journal of Food Protection* 74:1676-1683, <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-174>
- Poimenidou S. V., V. C. Bikouli, C. Gardeli, C. Mitsi, P. A. Tarantilis, G. J. Nychas and P. N. Skandamis (2016) Effect of single or combined chemical and natural antimicrobial interventions on *Escherichia coli* O157:H7, total microbiota and color of packaged spinach and lettuce. *International Journal of Food Microbiology* 220:6-18, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.013>
- Quiroz-Santiago C., O. R. Rodas-Suárez, C. R. Vázquez Q., F. J. Fernández, E. I. Quiñones-Ramírez and C. Vázquez-Salinas (2009) Prevalence of *Salmonella* in vegetables from Mexico. *Journal of Food Protection* 72:1279-1282, <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.6.1279>
- Ramos B., F. A. Miller, T. R. Brandão, P. Teixeira and C. L. M. Silva (2013) Fresh fruits and vegetables—An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 20:1-15, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.07.002>
- Rangel-Vargas E., E. J. Gutiérrez-Alcántara, C. A. Gómez-Aldapa, R. N. Falfán-Cortés, J. A. Segovia-Cruz, L. P. Salas-Rangel and J. Castro-Rosas (2017) Antibacterial activity of roselle calyx extracts, sodium hypochlorite, colloidal silver and acetic acid against multidrug resistant *Salmonella* serotypes isolated from coriander. *Journal of Food Safety* 37:e12320, <https://doi.org/10.1111/jfs.12320>
- Sagong H. G., S. Y. Lee, P. S. Chang, S. Heu, S. Ryu, Y. J. Choi and D. H. Kang (2011) Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *International Journal of Food Microbiology* 145:287-292, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.010>
- Secretaría de Salud (2015) Plata coloidal, características, peligros y aplicación. Secretaría de Salud. Ciudad de México. <https://www.gob.mx/salud/articulos/plata-coloidal-caracteristicas-peligros-y-aplicacion>. (Julio, 2019).
- Secretaría de Salud (2020) Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Vol. 37, Semana 51 del 13 al 19 de diciembre del 2020. Secretaría de Salud. Ciudad de México. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/602657/Boletin\\_2020\\_SE51.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/602657/Boletin_2020_SE51.pdf) (diciembre de 2020).
- Sengun I. Y. and M. Karapinar (2004) Effectiveness of lemon juice, vinegar and their mixture in the elimination of *Salmonella typhimurium* on carrots (*Daucus carota* L.). *International Journal of Food Microbiology* 96:301-305, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.010>
- Sengun I. Y. and M. Karapinar (2005) Effectiveness of household natural sanitizers in the elimination of *Salmonella typhimurium* on rocket (*Eruca sativa* Miller) and spring onion (*Allium cepa* L.). *International Journal of Food Microbiology* 98:319-323, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.07.011>
- Yoon J. H. and S. Y. Lee (2018) Comparison of the effectiveness of decontaminating strategies for fresh fruits and vegetables and related limitations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58:3189-3208, <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1354813>
- Zhang H., R. V. Tikekar, Q. Ding, A. R. Gilbert and S. T. Wimsatt (2020) Inactivation of foodborne pathogens by the synergistic combinations of food processing technologies and food-grade compounds. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19:2110-2138, <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12582>