

Efectividad de tratamientos con luz ultravioleta contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 en cacahuete (*Arachis hypogaea*) crudo

E.F. Meza-Plaza¹, N.Z. Ramírez-Rojas², K. Ruiz-Hernández², C. García-Mosqueda¹ y M.E. Sosa-Morales²

1 Universidad Tecnológica del Suroeste de Guanajuato. 2 Posgrado en Biociencias, Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. msosa@ugto.mx

RESUMEN: El cacahuete es un alimento altamente valorado por su contenido de aceite (40-50 %), y se considera estable por su bajo contenido de humedad (10 %). Sin embargo, se ha reportado que patógenos como *Salmonella typhimurium* pueden sobrevivir en la superficie del cacahuete, por lo que se han propuesto tratamientos diversos para su desinfección. La irradiación con luz ultravioleta (UV-C) se considera viable para desinfección, debido a que es una tecnología no térmica, por lo que su efecto sobre las macromoléculas es mínimo. Por lo anterior, el objetivo del estudio fue evaluar la efectividad de tratamientos de desinfección con luz UV-C (254 nm) a diferentes tiempos de exposición en cacahuete contra *S. typhimurium*. Lotes de 30 g de cacahuete crudo fueron inoculados con *S. typhimurium* y posteriormente tratados con luz UV-C durante 15, 20 y 30 min en cada una de las caras del cacahuete. Entre ellos, el tratamiento con luz UV-C por 30 min logró mayor reducción logarítmica de la población de *S. typhimurium* (0.67 ciclos log) sin alterar el contenido de humedad ni generar compuestos de oxidación. Sin embargo, los tratamientos UV-C no fueron suficientes para alcanzar la pasteurización del cacahuete (5 ciclos log) bajo las condiciones probadas.

Palabras clave: Cacahuete, luz ultravioleta, *Salmonella typhimurium*.

ABSTRACT: Peanuts are highly valued foods, because of their oil content (40-50%), and stability during long storage due to their low moisture content (10%). However, it has been reported that pathogens such as *Salmonella Typhimurium* can survive on peanuts surface. Different disinfection treatments have been proposed to avoid that. Among them, ultraviolet irradiation (UV-C) is considered viable because is a non-thermal technology and, subsequently, it has a minimum effect on macromolecules. Thus, the objective of this study was to evaluate the effectiveness of ultraviolet disinfection treatments (254 nm) probed at different conditions of time, against *S. Typhimurium* in peanuts. Batches of 30 g of peanuts were used to be inoculated with *S. Typhimurium*. Later, they were treated with ultraviolet light during 15, 20 and 30 min on each side of peanuts. The treatment for 30 min achieved the highest logarithmic reduction (0.67 log-cycles), without any alteration on the moisture content neither on peroxides index. Nevertheless, the UV-C treatments were not enough to reach peanuts pasteurization (5 log-cycles) under the studied conditions.

Key words: Peanuts, *Salmonella typhimurium*, ultraviolet light.

Área: Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN

El cacahuete (*Arachis hypogaea*) es uno de los cinco vegetales más cultivados en diferentes países del mundo (Calhoun, 2013). Es apreciado por su contenido de ácidos grasos insaturados, vitaminas liposolubles y aminoácidos, además de los beneficios que brinda a la salud (Nascimento *et al.*, 2018). La semilla seca contiene 40-50% de aceite en peso y puede contener hasta el 80% de ácido oleico (Gong *et al.*, 2018). Durante muchos años, el cacahuete no se consideró un alimento capaz de provocar enfermedades por *Salmonella typhimurium*, sin embargo, en 1994 se reportaron 714 brotes de salmonelosis relacionadas con el consumo cacahuete y productos derivados de éste (Rossbach *et al.*, 2017). Posteriormente se observó que *S. typhimurium* puede sobrevivir hasta 420 días en semillas de cacahuete sin escaldar, demostrando que este producto es un vehículo de esta bacteria (Nascimento *et al.*, 2018).

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar *typhimurium* es una bacteria entérica que puede causar daños a la salud como gastroenteritis, bacteriemia e infecciones focales, capaces de provocar la muerte

en el individuo (Song y Kang, 2016). La termoresistencia de *Salmonella* en cacahuete ha sido reportada y estudiada (Roszbach *et al.*, 2017), y se ha descubierto que una baja actividad de agua (a_w) y el alto contenido de lípidos del cacahuete, fortalecen la termoresistencia de la bacteria, protegiéndola incluso de los jugos gástricos estomacales y propiciando su incubación y sobrevivencia en el organismo (Nascimento *et al.*, 2018).

Para su desinfección, diversos tratamientos han sido aplicados a cacahuates y nueces, previniendo su contaminación, y desinfectando el alimento ya contaminado. Entre estos tratamientos se encuentra el uso de agua caliente en nueces para eliminar *Salmonella enterica* (Kharel *et al.*, 2018); vapor supercalentado para eliminación de *Salmonella enterica* y *Salmonella Typhimurium* en almendra y pistache (Ban y Kang, 2016) y el calentamiento por microondas para eliminar *Salmonella Typhimurium* en cacahuete (Song y Kang, 2016), entre otros. Sin embargo, estos tratamientos térmicos son poco factibles debido las alteraciones sensoriales, su efecto negativo en la composición lipídica y otros parámetros de calidad del cacahuete como el contenido de humedad, razón por la cual el uso de energías no térmicas como la luz ultravioleta (UV-C), representan una buena alternativa para el tratamiento. La luz UV-C es utilizada en la desinfección de aguas y descontaminación de alimentos y tiene alta efectividad contra un amplio rango de microorganismos patógenos (Zou *et al.*, 2019). Forma parte del espectro electromagnético con una longitud de onda de 100 a 400 nm y se divide en UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm), UV-C (200-280 nm) y rango UV de vacío (100-200 nm); el rango de 250-260 nm es letal para bacterias, virus, protozoarios, hongos miceliales, levaduras y algas (Yeh *et al.*, 2018), por lo que, con este fin, la luz UV-C es utilizada para desinfección. El objetivo del presente estudio fue evaluar la efectividad de tratamientos de desinfección con luz ultravioleta contra *S. Typhimurium* en cacahuete, durante 15, 20 o 30 minutos.

MATERIALES Y MÉTODOS

La bacteria *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 fue donada por la Universidad de las Américas de Puebla (UDLAP, Cholula, Puebla), mantenida en caldo nutritivo LB y trasladada en condiciones de refrigeración a la División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato. El cacahuete (*Arachis hypogaea*) sin cáscara y crudo, fue adquirido en un centro comercial de la ciudad de Salamanca, Guanajuato. Los lotes utilizados fueron desinfectados superficialmente utilizando etanol al 70% para posteriores pruebas.

Determinación de parámetros fisicoquímicos

Para la determinación de humedad, se toma en cuenta el procedimiento detallado en la Norma Mexicana NMX-F-083-1986. Se utilizaron 2 g de cacahuete totalmente molido en mortero y se determina la actividad de agua (a_w) en un AquaLab (No. Serie 1000837) previamente calibrado con agua (0.961). Finalmente, para determinar el índice de peróxidos se considera el procedimiento detallado en la Norma Mexicana NMX-F-154-1987.

Inoculación

Se inocularon 100 mL de caldo nutritivo LB con 7 mL de *Salmonella Typhimurium*, y el cultivo se mantuvo a 36 °C durante 48 h en incubadora (SheLab, Estados Unidos) para el crecimiento de la bacteria.

La inoculación de los lotes de cacahuete (30 g) se realizó siguiendo la metodología propuesta por Kuo *et al.*, (1997): Se añadieron a cada lote 10 mL del inóculo en bolsas estériles (Whirlpack, Estados Unidos) y se permitió su inmersión durante 2 min. Posteriormente los cacahuates se colocaron asépticamente en cajas de Petri y se incubaron a 36°C durante 40 min.

Tratamientos de luz ultravioleta

El prototipo de desinfección con luz UV utilizado consta de 4 lámparas de luz ultravioleta (254 nm, modelo Crob/4S, Instrumart, Cd. de México) posicionadas longitudinalmente a lo largo del equipo, con

una dosis de 10 mW/cm². La cámara cuenta con paredes de acero inoxidable y una conexión eléctrica de 110 V.

Para los tratamientos UV por duplicado, se consideraron 4 lotes de cacahuete para ser tratados durante 0 (control), 15, 20 y 30 minutos. Los lotes se colocaron en el centro del prototipo y se irradiaron durante los tiempos mencionados para cada una de las caras del cacahuete. Posteriormente éstos se enjuagaron en 11 mL de caldo nutritivo LB estéril, permitiendo su inmersión durante 2 min. Se tomó del caldo LB de enjuague una alícuota de 1 mL para posteriores diluciones y estas se sembraron en cajas de Petri de plástico con 20 mL de agar *Salmonella-Shigella* (Bioxon, México). Las cajas fueron incubadas a 36 °C durante 48 h, después de lo cual se procedió al conteo de colonias.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente con el software STATGRAPHICS Centurion. Se comprobó la normalidad de los datos con una prueba de Shapiro-Wilk W ($\alpha=0.05$). Un análisis de varianza a una vía y la prueba de Tukey fueron ejecutados posteriormente, con un 95% de confianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros fisicoquímicos

El cacahuete, además de ser consumido directamente o procesado (v.g. crema de cacahuete), es utilizado para la obtención de aceites comestibles. La calidad de aceites obtenidos de semillas como el cacahuete es un atributo de gran importancia comercial, por lo que es importante cuidar además de su inocuidad, utilizar materia prima libre de compuestos de degradación oxidativa (v.g. peróxidos). Generalmente, los aceites con niveles de peróxidos mayores que 10 meq O₂/kg son considerados menos estables y tienen vida de anaquel corta (Konuskan, Arslan y Oksuz, 2019). Aunado a esto, causan problemas de salud por el incremento de las especies reactivas de oxígeno como producto secundario de la peroxidación lipídica que promueve complicaciones en problemas inflamatorios y cardiovasculares (Lobo *et al.*, 2010). En este estudio, el cacahuete evaluado presentó valores de peróxidos de 0 meqO₂/kg, lo cual indica la frescura de la semilla utilizada, y por ello, puede considerarse como estable. Así mismo, los tratamientos de luz UV-C más largos (30 min) no causaron afectaciones en este índice en el cacahuete.

Para los valores de actividad de agua se probó la influencia que puede tener el método de inoculación del cacahuete sobre este atributo. Los resultados mostrados en Tabla I indican que existe una diferencia significativa ($p<0.05$) entre los valores de actividad de agua para cacahuete crudo e irradiado con respecto al cacahuete crudo hidratado. Generalmente, el cacahuete tiene una actividad de agua baja que oscila en un rango de 0.1 a 0.62 (ICMSE, 2011). Las muestras analizadas presentan valores dentro de estos límites y son similares a los reportados por Prestes *et al.*, (2019) para cacahuates crudos ($a_w=0.604$).

El contenido de humedad aumentó aproximadamente 1% entre el cacahuete no hidratado y el hidratado (simulando condiciones de inoculación), diferencia significativa entre ambas muestras ($p<0.05$). El cacahuete tratado con luz UV-C durante 30 min presentó una humedad significativamente diferente ($p<0.05$), que se puede atribuir al tratamiento aplicado, capaz de causar liberación de agua ligada en el alimento (Yeh *et al.*, 2018). Los valores reportados en este estudio son menores que los obtenidos por Liu *et al.* (2018), cuyas muestras de cacahuete presentaron entre un 3.65% y 4.05% de humedad, lo cual puede atribuirse a condiciones agroclimáticas del sitio de cultivo.

Tabla I. Propiedades fisicoquímicas de cacahuete crudo.			
Propiedad	Crudo	Crudo hidratado	Irradiado con UV-C (30 min)
% Humedad (b.h.)	0.87±0.273 ^a	1.92±0.144 ^b	3.47±0.024 ^c

a_w	0.5505±0.058 ^a	0.888±0.017 ^b	0.651±0.092 ^a
Índice de peróxidos (meq/kg)	0	0	0

Tratamientos con luz ultravioleta

En la Tabla II se muestran los resultados de la evaluación de efectividad desinfectante de luz UV-C contra *S. typhimurium* en cacahuete expuesto a diferentes tiempos. El tiempo cero fue considerado control y como la concentración inicial en cada lote para el cálculo de la reducción de logaritmos. El tratamiento de 30 min de luz UV logró la reducción de la población de *Salmonella* 0.67 ciclos log, sin embargo, no hay diferencia significativa entre los ciclos logarítmicos reducidos con cada uno de los tratamientos estudiados ($p < 0.05$). En otros estudios donde aplican tratamientos térmicos como el secado en horno con circulación de aire (35°C por 8 h) la población disminuye 1.1 ciclos log; en procesos de escaldado con aire caliente (95°C y 100°C por 15 min) la reducción de la población fue de 1.5 y 2.1 ciclos log respectivamente (Prestes *et al.*, 2019). Estos tratamientos térmicos muestran ser más efectivos que la luz UV-C, sin embargo, la gran desventaja que presentan es el posible daño a macromoléculas como los lípidos, causando la generación de especies de oxidación y consecuentemente, alterando negativamente la calidad sensorial y nutricional del cacahuete.

De acuerdo con la FDA (Food and Drug Administration) es recomendable que las plantas de alimentos que procesan cacahuete, derivados y productos a base de cacahuete, validen sus procesos con la reducción de 5 ciclos logarítmicos de *S. typhimurium* (FDA, 2009; Prestes *et al.*, 2019).

Bajo este criterio, es apreciable que no se logró tal efectividad con los tratamientos diseñados en este estudio. Sin embargo, es importante mencionar que de acuerdo con Nascimento *et al.* (2018), dosis de 0.033 UFC/g se consideran altamente infecciosas, por lo que sería conveniente considerar factores a controlar (v.g. menor número de células en el inóculo utilizado) que pueden llevar a diseño de tratamientos similares que logren la efectividad de reducción de ciclos logarítmicos para ser considerados como tratamientos de pasteurización en cacahuete.

Tabla II. Evaluación de la efectividad desinfectante de luz UV contra <i>Salmonella</i> en cacahuete.				
	Tiempo de tratamiento UV			
	0 min	15 min	20 min	30 min
Concentración (UFC/g)	5.44±1.35 x 10 ⁷ ^a	1.36±0.05 x 10 ⁷ ^b	2.10±0.31 x 10 ⁷ ^b	1.15±0.38 x 10 ⁵ ^b
Reducción logarítmica	-	0.60±0.0932 ^a	0.41±0.173 ^a	0.67±0.257 ^a

CONCLUSIÓN

Los tratamientos con luz ultravioleta (UV-C) diseñados en este estudio no alcanzaron los valores de reducción considerados para pasteurización del cacahuete (5 ciclos log) aún en el tiempo más prolongado (30 min) y pese a que este tratamiento no afectó negativamente las propiedades fisicoquímicas estudiadas en el cacahuete, no se recomiendan tiempos de exposición largos. La eficiencia de los tratamientos pudo ser principalmente afectada por la alta dosis infecciosa utilizada como concentración inicial de la cepa (*S. typhimurium*), y la capacidad de absorción de agua que presentó el cacahuete al simular el proceso de inoculación, como se pudo observar al ver los cambios en la actividad de agua y contenido de humedad. El nivel de pasteurización (reducción de la población microbiana en 5 ciclos log) no fue alcanzado, pero sí se logró una reducción significativa en la población de *S. typhimurium* con la aplicación de luz UV-C. Por lo tanto, para lograr mayores reducciones de ciclos logarítmicos es recomendable la utilización de un número de células de *S. typhimurium* menor para probar tiempos de desinfección con luz UV-C no mayor a los estudiados en este trabajo, o bien, la combinación de UV con otras técnicas de control microbiano.

BIBLIOGRAFÍA

- Ban, G.H. & Kang, D.H. (2016). Effectiveness of superheated steam for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis phage type 30, and *Listeria monocytogenes* on almonds and pistachios. *International Journal of Food Microbiology*, 220, 19-25.
- Calhoun, S. (2013). Improving the quality and safety of peanuts, En *American Peanut Council*, USA, Woodhead Publishing Limited, 330-349.
- Gong, A. Shi, A. Liu, H., Yu, H. Liu, L., Lin, W. & Wang, Q. (2018). Relationship of chemical properties of different peanut varieties to peanut butter storage stability. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(5), 1003-1010.
- Food and Drug Administration. (2009). Guidance for industry : measures to address the risk for contamination by *Salmonella* species in food containing a peanut derived product as an ingredient. Recuperado de: <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ProducePlantProducts/ucm115386.htm>
- Nascimento, M.S., Carminati, J.A., Silva, I.C.R.N., Silva, D.L., Bernardi, A.O. & Copetti, M.V. (2018). *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Enterobacteriaceae* in the peanut supply chain: From farm to table. *Food Research International*, 105, 930-935.
- Norma Mexicana (NMX-F-083-1986). Alimentos. Determinación de humedad en productos alimenticios. Secretaría de Economía, Gobierno de México.
- Norma Mexicana (NMX-F-154-1987). Alimentos. Aceites y grasas vegetales o animales. Determinación del índice de peróxidos. Secretaría de Economía, Gobierno de México.
- Kharel, K., Yemmireddy, V.K., Graham, C.J., Prinyawiwatkul & Adhikari, A. (2018). Hot water treatments as kill-step to inactivate *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecium* on in-shell pecans. *LWT-Food Science and Technology*, 97, 555-560.
- Konuskan, M., Arslan, M. & Oksuz, A. (2019). Physicochemical properties of cold pressed sunflower, peanut, rapeseed, mustard and olive oils grown in the Eastern Mediterranean region. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26, 340-344.
- Kuo F-L., Carey J.B., & Ricken S.C. (1997). UV Irradiation of Shell Eggs: Effect on Populations of Aerobes, Molds, and Inoculated *Salmonella*. *Journal of Food Protection*, 60, 639-643.
- Liu, K., Liu, Y. & Chen, F. (2018). Effect of gamma irradiation on the physicochemical properties and nutrient contents of peanut. *LWT- Food Science and Technology*, 96, 535-542.
- Lobo, V., Patil A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy*, 4, 188-126.
- Prestes, F.S., Pereira A.A.M., Silva, A.C.M, Pena, P.O. & Nascimento, M.S. (2019). Effects of peanut drying and blanching on *Salmonella* spp. *Food Research International*. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.017>
- Roszbach, J.D., Fink, R.C., Sadowsky, M.J., Tong, C. & Diez-Gonzalez, F. (2017). Factors influencing the *Salmonella* internalization into seedpods and whole plants of *Arachis hypogaea* (L). *Food Microbiology*, 66, 184-189.
- Son, W.J. & Kang, D.H. (2016). Inactivation of *Salmonella* Senftenberg, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Tennessee in peanut butter by 915 MHz microwave heating. *Food Microbiology*, 53, 48-52.
- Yeh, Y., de Moura, F.H., Van Den Broek, K. & de Mello, A.S. (2018). Effect of ultraviolet light, organic acids, and bacteriophage on *Salmonella* populations in ground beef. *Meat Science*, 139, 44-48.
- Zou, X., Lin, Y., Xu, B., Cao, T., Tang, Y., Pan, Y., Gao, Z. & Gao, N. (2019). Enhanced inactivation of *E. coli* by pulsed UV-LED irradiation during water disinfection. *Science of The Total Environment*, 650, 210-215.