

Inactivación de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* mediante altas presiones hidrostáticas en una emulsión modelo

Iñiguez-Moreno, M.^{1,2} • Ascanio, G.¹ • Brito-Bazán, E.¹ • Calderón-Santoyo, M.²
Brito-de la Fuente, E.³ • Ragazzo-Sánchez, J. A.^{2*}

Palabras clave: Box- Behnken, optimización, emulsión lipídica, tecnología emergente
Key words: Box- Behnken design, optimization, lipid emulsion, emerging technology

Introducción

La nutrición parenteral es de vital importancia en varios grupos de pacientes. Sin embargo, también son considerados un medio de crecimiento microbiano ideal para microorganismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*. Convencionalmente, se utilizan tratamientos térmicos para garantizar su inocuidad y conservación. No obstante, estos métodos pueden causar la pérdida de compuestos activos y alterar la estructura molecular de los componentes de la emulsión disminuyendo así su vida útil. En consecuencia, las denominadas tecnologías emergentes como las altas presiones hidrostá-

ticas (APH), han sido evaluadas como una alternativa a los tratamientos térmicos. Esto con la finalidad de minimizar el efecto del calor sobre los componentes de la emulsión garantizando su inocuidad [1]. El uso de APH implica la aplicación de presión elevada (200-600 MPa) con o sin transferencia de calor simultánea, durante un período corto (≤ 10 min). El nivel de presión, el tiempo y la temperatura producen variaciones en la respuesta de los microorganismos ante el tratamiento aplicado. Por lo tanto, todos los parámetros de procesamiento deben estudiarse para cada sistema. Además, para mejorar el efecto letal de las APH sobre los

1 Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, Ciudad de México, México. Teléfono: +52(55) 5622-8602.

2 Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos, Instituto Tecnológico de Tepic/Tecnológico Nacional de México, Av. Tecnológico 2595, Lagos del Country, 63175, Tepic, Nayarit, México. Teléfono: +52(311) 211-9400.

3 Fresenius-Kabi Deutschland GmbH, D-61352 Bad Homburg, Alemania.

* jragoza@tepic.tecnm.mx



microorganismos, se ha propuesto su aplicación por ciclos, esto consiste en emplear varios pulsos de presión sucesivos con etapas de descompresión entre ellos [2].

El modelado matemático permite estimar la inactivación microbiana facilitando la optimización del proceso. El diseño *Box-Behnken* (DBB) es uno de las metodologías de superficie de respuesta (MSR) más utilizadas, que permite disminuir combinaciones de tratamientos en las condiciones extremas, facilitando la optimización en un nivel deseado [4]. Debido a que la mayoría de los estudios de inactivación bacteriana por APH han sido realizados en matrices alimentarias, el objetivo del presente trabajo fue obtener un modelo predictivo para la inactivación de *E. coli* y *S. aureus* en una emulsión modelo con fines farmacéuticos usando DBB.

Metodología

Preparación de la emulsión

Se prepararon emulsiones aceite en agua (O/W) homogeneizando aceite de soya y lecitina (fase oleosa) con agua destilada y glicerol (fase acuosa). Para la fase acuosa se mezclaron 76.6 g de agua destilada a 80 °C con 2.2 g de glicerol y se ajustó a pH 10 con NaOH 1 M. Luego, la fase acuosa se homogeneizó (IKA-T10 Basic Ultra Turrax®, Janke and Kunkel, IKA-Labortechnik, Alemania) a 5,000 rpm/5 min. Por otro lado, la fase oleosa se preparó con 20 g de aceite de soya a 80 °C y se añadió la lecitina (1.2 g). En seguida, la fase oleosa se transfirió lentamente a la fase acuosa en homogeneización constante a 10,000 rpm/15 min. La pre-emulsión se enfrió a 55-60 °C, el pH se ajustó entre 9.7 y 10 y se sonicó (Digital Sonifier® Unit, modelo S-150D, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, EE. UU.) con una micropunta (3.2 mm) a 60 kHz/5 min. La emulsión se preparó para cada ensayo.

Inoculación bacteriana

Las células bacterianas de *E. coli* y *S. aureus* previamente cultivadas a 35 °C/18 h se recolectaron por centrifugación (9390 × g/5 min, a 25 °C), se lavaron dos veces en solución salina estéril (0.85 %, p/v, pH 7.0 ± 0.2) y se centrifugaron en las mismas condiciones. Luego, se resuspendieron en la emulsión para dar una concentración final de 10⁹ Log₁₀ UFC/mL.

Aplicación de tratamientos por APH

Las muestras (4 mL) selladas al vacío se colocaron en el equipo de APH (Avure Autoclave Systems®, Modelo LCIP402260NCEP1MLN, Eri, PA, EE. UU.). Las muestras se presurizaron (200, 250 y 300 MPa) durante 1, 2 o 3 ciclos de 10 min a diferentes temperaturas (25, 35 y 45 °C). Se utilizó un DBB con tres puntos centrales para optimizar los tratamientos (Tabla 1), así como el método de regresión no lineal para ajustar el polinomio de segundo orden a los datos experimentales e identificar los términos significativos del modelo (Figura 1) donde Y es la variable de respuesta; χ_i y χ_j son variables (i y j van de 1 a k); β_0 es el coeficiente de intercepción del modelo; β_j , β_{jj} y β_{ij} son coeficientes de interacción de términos lineales, cuadráticos y de segundo orden, respectivamente; k es el número de parámetros independientes ($k = 2$ en este estudio) y e_i es el error.

ENUMERACIÓN MICROBIANA. Antes y después de cada tratamiento se determinó la carga microbiana mediante cuenta en placa en agar soya tripticaseína. Las placas se incubaron a 35 °C/48 h. La reducción de los microorganismos se calculó de forma logarítmica (Ec. 2). Donde N_0 es el recuento inicial y N es el recuento de supervivencia después del tratamiento [4,5]. Cada ensayo se realizó por triplicado (Figura 2).

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \sum_i \sum_{<j=2}^k \beta_{ij} x_i x_j + e_i$$

Figura 1. Ecuación 1

$$\text{Log}_{10} (N_0/N) = \text{Log}_{10} N_0 - \text{Log}_{10} N$$

Figura 2. Ecuación 2

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de DBB se analizaron en el software Statgraphics Centurion XV® (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, EE. UU.). Se consideró un nivel de significancia de del 5% ($p \leq 0.05$) para determinar la significancia de cada término y de su interacción (de segundo orden). Además, se utilizó la prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher ($p \leq 0.05$) para la comparación de medias.

Resultados y discusión

Inactivación bacteriana

La inactivación microbiana por APH depende de varios factores, incluyendo las condiciones de tratamiento (medios, temperatura, presión, tiempo, etc.) y las características microbianas [1,5]. En la mayoría de los tratamientos derivados del DBB en los cuales se obtuvieron reducciones significativas en comparación con el control, *E. coli* mostró una mayor susceptibilidad en comparación con *S. aureus* ($p \leq 0.05$). En general la letalidad se incrementó conforme aumentaron los parámetros en las variables evaluadas ($p \leq 0.05$). La mayor sobrevivencia de *S. aureus* en com-

paración con *E. coli* está relacionada con diversos factores, en primer lugar, generalmente es aceptado que las bacterias con forma bacilar son más susceptibles a los cambios de presión en comparación con las bacterias esféricas [3,5]. Por otro lado, el mecanismo de acción de las APH se basa en la generación de poros en la pared y membrana celular de los microorganismos provocando la liberación de los componentes celulares, además, de propiciar la inactivación enzimática. La mayor resistencia de las bacterias Gram-positivas a este tipo de tratamientos en comparación con las Gram-negativas se debe a la diferencia en la composición en su pared celular. Las bacterias Gram-positivas poseen un mayor contenido de peptidoglicano (30-70%), mientras que en las Gram-negativas este componente representa menos del 10% [4,6]. Los microorganismos pueden resistir altas presiones, debido a la fluidez de la membrana, pero son incapaces de sobrevivir a las presiones alternas que se producen durante la aplicación de pulsos. A medida que aumenta el tiempo se desestabilizan la membrana externa e interna liberando los componentes intracelulares [2,5] (Tabla 1).

Tabla 1. Reducción de las cargas microbianas después de la aplicación de APH.

Temperatura (°C)	Presión (MPa)	Número de ciclos	Reducción (Log ₁₀ UFC/mL)	
			<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
25	200	2	0.05 ± 0.03 ^{Ag}	0.04 ± 0.02 ^{Ai}
45	200	2	0.24 ± 0.20 ^{Ag}	0.12 ± 0.08 ^{Agh}
25	300	2	2.32 ± 0.23 ^{Ab*}	0.11 ± 0.04 ^{Bh}
45	300	2	4.36 ± 0.03 ^{Aa*}	1.42 ± 0.03 ^{Ba*}
25	250	1	0.85 ± 0.17 ^{Ae*}	0.13 ± 0.12 ^{Bgh}
45	250	1	0.54 ± 0.18 ^{Af*}	0.25 ± 0.02 ^{Bif*}
25	250	3	2.27 ± 0.12 ^{Ab*}	0.04 ± 0.03 ^{Bi}
45	250	3	1.86 ± 0.19 ^{Ac*}	0.67 ± 0.06 ^{Bc*}
35	200	1	0.17 ± 0.07 ^{B4}	0.32 ± 0.06 ^{Ae*}
35	300	1	1.34 ± 0.03 ^{Ad*}	1.04 ± 0.02 ^{Bb*}
35	200	3	0.11 ± 0.03 ^{Bg}	0.34 ± 0.11 ^{Ae}
35	300	3	1.22 ± 0.12 ^{Ad*}	0.53 ± 0.03 ^{Bid*}
35	250	2	1.12 ± 0.08 ^{Ad*}	0.18 ± 0.01 ^{Bg}
35	250	2	1.08 ± 0.05 ^{Ad*}	0.16 ± 0.09 ^{Bgh}
35	250	2	1.11 ± 0.07 ^{Ad*}	0.13 ± 0.06 ^{Bgh}

Los valores representan la media de la prueba ± desviación estándar (n = 3). Los valores en la misma fila con letras mayúsculas diferentes y valores en la misma columna seguidos por letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes. Mientras que * indica una disminución significativa respecto a la cuanta inicial. Las tres determinaciones de acuerdo a la prueba de Fisher en $p \leq 0.05$. La carga microbiana inicial fue de 9.56 ± 0.08 y 9.79 ± 0.19 Log₁₀ UFC/mL para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente. El límite de detección fue de 1.00 Log₁₀ UFC/mL.

Modelo de superficie de respuesta para la inactivación de *E. coli* y *S. aureus*

El DBB es un diseño cuadrático giratorio e independiente sin puntos factoriales o factoriales fraccionarios incrustados, en el que las combinaciones de variables son los puntos medios y los puntos medios de los bordes de la variable [4]. Después de los tratamientos, la máxima reducción para *S. aureus* fue 1.04 Log₁₀ UFC/mL, mientras que para *E. coli* osciló entre 0.05 y 4.36 Log₁₀ UFC/mL, incrementándose conforme aumentaron los valores de los parámetros evaluados. El análisis de los datos experimentales generó las ecuaciones cuadráticas para calcular la reducción

de *E. coli* y *S. aureus* (Figura 3 y 4, respectivamente) donde T es la temperatura (°C), P es la presión (MPa) y C es el número de ciclos (número de veces que la temperatura y la presión se mantuvieron durante 10 min). En la Figura 3 los términos significativos fueron T, P, C, T², TP y C². Mientras que en la Figura 4 lo fueron T, P, T², TP, TC, P², PC y C². El valor del coeficiente de correlación y la prueba de falta de ajuste no fue significativa (p = 0.1628 y p = 0.2887, para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente) revelan que los modelos se ajustan adecuadamente a los datos experimentales.

$$\begin{aligned}
 E. coli \text{ reducción} = & 6.69698 - 0.64591 \cdot T + 0.00205 \cdot P + 2.16833 \cdot C - \\
 & 0.00625417 \cdot T^2 + 0.00092333 \cdot T \cdot P - 0.00258333 \cdot T \cdot C - 0.0000241667 \cdot P^2 - \\
 & 0.0003 \cdot P \cdot C - 0.42125 \cdot C^2 \qquad R^2 = 0.7548
 \end{aligned}$$

Figura 3. Ecuación 3

$$\begin{aligned}
 S. aureus \text{ reducción} = & 2.52135 + 0.05575 \cdot T - 0.0253 \cdot P - 0.809167 \cdot C - \\
 & 0.00137083 \cdot T^2 + 0.000118333 \cdot T \cdot P + 0.0125 \cdot T \cdot C + 0.0000591667 \cdot P^2 - \\
 & 0.0026 \cdot P \cdot C + 0.25041 \cdot C^2 \qquad R^2 = 0.8439
 \end{aligned}$$

Figura 4. Ecuación 4

Las curvas de superficie de respuesta se pueden utilizar para explicar la interacción de las variables y determinar el nivel óptimo de cada variable para una letalidad máxima prevista [4]. Los modelos matemáticos predictivos visualizados como gráficos de respuesta tridimensional obtenidos tanto para *E. coli* como para *S. aureus* muestran como interaccionan dos variables presión y número de ciclos (Figura 5A y D); temperatura y presión (Figura 5B y E) y temperatura y número de ciclos (Figura 5C y F) cuando la tercer variable se fija en el nivel medio evaluado: temperatura (35 °C), número de ciclos (2) y presión (250 MPa); respectivamente. El análisis canónico indicó que los

valores de los tres factores evaluados para alcanzar una reducción de 5.0 Log₁₀ UFC/mL de *E. coli* es a 45 °C, 300 MPa y 2.37 ciclos. Esta reducción se considera como el valor mínimo para considerar a un tratamiento no térmico como efectivo [5]. La evaluación estos parámetros, permitió alcanzar una reducción de 4.85 ± 0.45 Log₁₀ UFC/mL. Dicho valor se encuentra dentro de una ±10% del valor estimado, por lo que se puede considerar que el modelo permite estimar satisfactoriamente las condiciones necesarias para la reducción de *E. coli*. Sin embargo, para *S. aureus* no fue posible estimar estos valores debido a la baja reducción alcanzada en las condiciones de prueba.

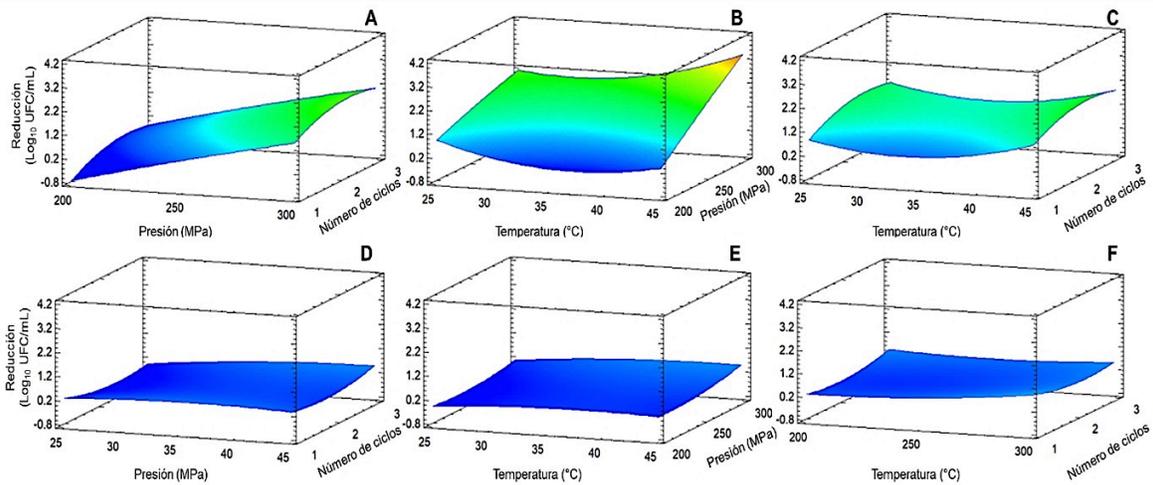


Figura 5. Gráficas de superficie de respuesta para la reducción de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. El gráfico indica el efecto de A y D) presión y número de ciclos; B y E) temperatura y presión; y C y F) temperatura y número de ciclos en la reducción logarítmica de *E. coli* (A-C) y *S. aureus* (D-F), manteniendo fijo el parámetro restante temperatura (35 °C, A y D), número de ciclos (2, B y E) y presión (250 MPa, C y F).

Conclusión

El DBB y la MSR permitieron desarrollar un modelo predictivo para estimar la reducción de *E. coli* en una emulsión modelo. Este modelo permitió establecer las condiciones para reducir 5 Log₁₀ UFC/mL, las cuales fueron validadas experimentalmente. Sin embargo, para *S. aureus* no fue posible obtener un modelo que pudiera estimar una reducción de 5 Log₁₀ UFC/

mL debido su resistencia a la temperatura y presión, asociada a la composición de su pared celular. No obstante, el procesamiento por APH es alternativa para inactivar microorganismos Gram-negativos como *E. coli*, mientras que para bacterias Gram-positivas y/o esporuladas puede aplicarse como parte de un conjunto de tecnologías de barreras múltiples.

Referencias

1. Levy R, Okun Z, Shpigelman A. High-pressure homogenization: Principles and applications beyond microbial inactivation. *Food Eng Rev.* 2020. doi:10.1007/s12393-020-09239-8
2. Bulut S, Karatzas KAG. Inactivation of *Escherichia coli* K12 in phosphate buffer saline and orange juice by high hydrostatic pressure processing combined with freezing. *LWT - Food Sci Technol.* 2021;136:110313. doi:10.1016/j.lwt.2020.110313
3. Kaavya R, Pandiselvam R, Abdullah S, et al. Emerging non-thermal technologies for decontamination of *Salmonella* in food. *Trends Food Sci Technol.* 2021;112:400-418. doi:10.1016/j.tifs.2021.04.011
4. Fekraoui F, Ferret É, Paniel N, et al. Cycling versus continuous high pressure treatments at moderate temperatures: Effect on bacterial spores? *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2021;74:102828. doi:10.1016/j.ifset.2021.102828
5. Zhu H, Xu Y, Qi G, Wang S, Wang H. Modeling the combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the sub-lethal injury of *Listeria monocytogenes* by Box-Behnken design. *J Food Process Eng.* 2020;43:1-8. doi:10.1111/jfpe.13480
6. Serment-Moreno V, Barbosa-Cánovas G, Torres JA, Welti-Chanes J. High-pressure processing: Kinetic models for microbial and enzyme inactivation. *Food Eng Rev.* 2014;6:56-88. doi:10.1007/s12393-014-9075-x