



Uso de ácidos orgánicos para la reducción de microorganismos en repollo (*Brassica oleracea*) y zanahoria (*Daucus carota*) rallados*

Use of organic acids for reduction of microorganisms in shredded cabbage (*Brassica oleracea*) and carrot (*Daucus carota*)

Dayana Ruiz-Lobo¹, Gabriela Davidovich-Young¹, Eric Wong-González¹, Shanti Ramakrishna-Loaiza¹

* Recepción: 13 de mayo, 2024. Aceptación: 21 de agosto, 2024. Este trabajo fue parte del Proyecto de Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica #C3-115 Efecto de tratamientos combinados en la calidad microbiológica, inocuidad y calidad sensorial del repollo y la zanahoria rallados.

¹ Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos y Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. San José, Costa Rica. dayana.ruizlobo@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0009-0005-9978-6924>); gabriela.davidovich@ucr.ac.cr (autor para la correspondencia; <https://orcid.org/0000-0001-6221-4141>); eric.wong@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0001-9054-130X>); shanti.ramakrishna@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0009-0007-5545-6020>).

Resumen

Introducción. En los últimos años se han buscado opciones de desinfección para los vegetales frescos y mínimamente procesados. Alternativas como el uso de ácidos orgánicos, pueden reducir microorganismos en los alimentos. **Objetivo.** Evaluar el uso de ácido cítrico y láctico en diferentes concentraciones para la reducción microbiológica de *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* en repollo y zanahoria rallados. **Materiales y métodos.** El trabajo se realizó en San José, Costa Rica, durante los meses de setiembre a noviembre de 2023. Se ralló repollo y zanahoria, se inocularon con *E. coli* y *L. monocytogenes* y se desinfectaron con ácido láctico y cítrico a concentraciones de 5, 10 y 20 g l⁻¹ durante 5 min. Se determinó la reducción logarítmica posterior a la desinfección y se evaluó con contrastes ortogonales y pruebas de Bonferroni la contribución de los ácidos a la reducción con respecto al control en agua, así como diferencias en las reducciones entre ambos ácidos y el efecto de la concentración. **Resultados.** Se determinaron en zanahoria y repollo reducciones de *E. coli* entre 2 y 5 log UFC/g. Las mayores reducciones en general se observaron a 20 g l⁻¹ en comparación con 5 g l⁻¹, para el ácido láctico en comparación con el cítrico. La determinación en zanahoria para *L. monocytogenes* no fue posible, sin embargo, en repollo se obtuvieron valores entre 1,2 y 2,4 log UFC/g con las mayores reducciones a 20 g l⁻¹ en comparación con 5 g l⁻¹ y para el ácido láctico en comparación con el cítrico. **Conclusiones.** En las condiciones estudiadas de concentración y tiempo fue posible utilizar ácido láctico y ácido cítrico para implementar procesos de desinfección de repollo y zanahoria rallados y lograr reducciones de al menos 2 log UFC/g.

Palabras clave: ácido cítrico, ácido láctico, desinfección, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*.

Abstract

Introduction. Alternative disinfection processes for fresh and minimally processed vegetables have been studied recently. Methods such as the use of organic acids can reduce microbial loads in foods. **Objective.** To evaluate the



use of citric and lactic acids at different concentrations in reducing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in shredded cabbage and carrot. **Materials and methods.** The study was conducted in San José, Costa Rica, between September and November 2023. Carrots and cabbages were shredded, inoculated with *E. coli* and *L. monocytogenes*, and then disinfected using lactic or citric acid at concentrations of 5, 10 y 20 g l⁻¹ for 5 min. After disinfection, logarithmic reductions were determined, and orthogonal contrast and Bonferroni test were applied to evaluate the effect of the acids in comparison to the water control, the differences in the reduction between acids, and effect of the acid concentration. **Results.** In both carrot and cabbage, logarithmic reductions of *E. coli* between 2 and 5 log CFU/g were determined. Greater reductions were generally found at 20 g l⁻¹ compared to 5 g l⁻¹, and for lactic acid compared to citric acid. For *L. monocytogenes* in carrots, no reduction could be determined, however, in cabbage, reductions between 1,2 and 2,4 log CFU/g were determined, with higher reductions at 20 g l⁻¹ compared to 5 g l⁻¹ and for lactic acid compared to citric acid. **Conclusions.** Under studied concentration and time conditions, lactic and citric acids can be used in disinfection processes for shredded cabbage and carrot, achieving reductions of at least 2 log CFU/g.

Key words: citric acid, lactic acid, disinfection, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*.

Introducción

El consumo de frutas y vegetales ha incrementado en los últimos años sobre todo en países con mayores ingresos (Carstens et al., 2019; do Prado Vilarin et al., 2020). Los vegetales frescos y mínimamente procesados, incluidos en ensaladas que se consumen dentro de una dieta balanceada, son populares para la población que demanda cada vez más productos listos para consumir, por conveniencia y ahorro de tiempo (De Corato, 2019; Ferreira Gomes et al., 2023). Cuando estos alimentos se consumen crudos, aumenta la probabilidad asociada con enfermedades y brotes causados por la presencia de microorganismos patógenos, por lo que su inocuidad es una preocupación (Carstens et al., 2019; Khan et al., 2017; Tzortzakis & Chrysargyris, 2017).

Listeria monocytogenes, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y cepas enteropatógenas de *Escherichia coli* han sido vinculadas con vegetales mínimamente procesados. Estas bacterias pueden ser encontradas en los sitios de cultivo, aparecer como contaminación cruzada en cualquier parte de la cadena de producción, encontrarse en las superficies en contacto con el alimento o incluso en los espacios intercelulares de productos frescos (Danyluk et al., 2015; Erickson, 2019; Wirtanen & Salo, 2016). El grupo *E. coli*, se emplea como indicador de contaminación fecal en alimentos y determina si se han aplicado condiciones higiénicas durante su manipulación. Su detección implica un peligro potencial ya que se comporta similar a otros patógenos de origen entérico (Adams et al., 2016; Batt, 2014; da Silva et al., 2018; Jnani & Ray, 2024).

Los vegetales mínimamente procesados se someten a pocas operaciones poscosecha, que pueden incluir lavado, pelado, rallado o troceado, escurrido y empacado (Carstens et al., 2019; Ferreira Gomes et al., 2023). Algunas de ellas impactan su calidad sensorial y microbiológica y resultan en cambios que favorecen el crecimiento microbiano. Esto ocurre porque estas operaciones causan daño celular y se da la liberación de nutrientes y enzimas que pueden acelerar el deterioro del producto (Botondi et al., 2021; Ferreira Gomes et al., 2023; Liu et al., 2021; Ma et al., 2017) y, además, favorecen la creación de superficies donde los microorganismos se adhieren con mayor facilidad (Danyluk et al., 2015; De Corato, 2019; Erickson, 2019).

Asegurar la inocuidad de los vegetales implica mantener cuidados como buenas prácticas agrícolas y buenas prácticas de manufactura, sin embargo, su desinfección representa una operación importante para reducir los peligros microbiológicos. Algunos vegetales se lavan con agua potable, aunque la eficacia de la reducción microbiológica aumenta si se adicionan antimicrobianos como compuestos clorados, ácido peroxiacético o compuestos de amonio

cuaternario (Cruz Mendoza et al., 2022; Silveira Alexandre et al., 2022). En la actualidad, uno de los tratamientos de desinfección más utilizados en la industria de alimentos es la desinfección química con cloro, mediante la aplicación de hipoclorito de sodio en disoluciones acuosas de concentraciones que van desde los 50 a 200 mg ml⁻¹ (Ferreira Gomes et al., 2023; Sango et al., 2014).

El cloro es de bajo costo y de fácil aplicación (Liu et al., 2021); sin embargo, a 200 mg ml⁻¹, concentración máxima permitida para su aplicación en la desinfección de alimentos, su eficacia es limitada (Ferreira Gomes et al., 2023; Pinela & Ferreira, 2017; Silveira Alexandre et al., 2022; Yoon & Lee, 2018). Además, puede tener efectos nocivos para la salud y ha sido prohibido en algunos países europeos, por la posible formación de compuestos cancerígenos cuando entra en contacto con materia orgánica (Bhilwadikar et al., 2019; Meireles et al., 2016; Pinela & Ferreira, 2017; Sarron et al., 2021). También puede causar cambios en el sabor y aroma de los productos frescos (Tzortzakis & Chrysargyris, 2017).

Las desventajas relacionadas con el uso de cloro en la industria alimentaria han motivado a investigar tecnologías alternativas que permitan desinfectar los productos frescos y mínimamente procesados, y que aseguren la inocuidad de estos, con un bajo impacto negativo en la salud, en la calidad del producto y en el ambiente. Para la desinfección vegetal con soluciones antimicrobianas, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) recomienda una reducción de 2 log de los microorganismos objetivo (Beuchat et al., 2001), la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) recomienda una reducción de 5 log (Venkitanarayanan et al., 2002), mientras que otros autores consideran eficaz una reducción de 3 log (Chang, 2015).

El uso de ácidos orgánicos presenta diversas ventajas. Estos son bien aceptados por los consumidores, algunos ácidos orgánicos están aprobados como GRAS (acrónimo utilizado por agencias regulatorias federales para referirse a sustancias que son usadas en alimentos, pero que son generalmente reconocidas como seguras cuando son utilizadas de acuerdo a buenas prácticas de manufactura), están permitidos para su uso en productos etiquetados como orgánicos y su interacción con moléculas orgánicas no produce subproductos tóxicos o con potencial cancerígeno (Meireles et al., 2016; Wang et al., 2019). Otra ventaja de los ácidos orgánicos es que no se ven afectados por la dureza del agua ni por los cambios de temperatura (Chinchkar et al., 2022; Deng et al., 2020).

La aplicación de ácidos orgánicos en la desinfección de vegetales ha sido estudiada por otros autores. Se ha usado ácido cítrico y láctico en concentraciones de 5, 10, 20 y 30 g l⁻¹ por tiempos de 1 a 20 min para evaluar la reducción de *E. coli* biotipo I, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* y microbiota normal en lechuga, zanahoria, tomate, repollo, pepino y manzana. Los resultados son diversos de acuerdo con la concentración de ácido, el tiempo utilizado y el microorganismo meta que se desea reducir en el vegetal (Akbas & Ölmez, 2007; Bae et al., 2011; Bermúdez-Aguirre & Barbosa-Cánovas, 2013; Park et al., 2011; Pounraj et al., 2021; Sagong et al., 2011). Además, ninguna de estas investigaciones utiliza como matriz alimentaria el repollo o la zanahoria rallados.

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el uso de ácido cítrico y láctico en diferentes concentraciones para la reducción microbiológica de *E. coli* y *L. monocytogenes* en repollo (*Brassica oleracea*) y zanahoria rallados (*Daucus carota*).

Materiales y métodos

Procesamiento de muestras

Las muestras de repollo (*B. oleracea*) y zanahoria (*D. carota*) se adquirieron a un mismo proveedor local del cantón de Santa Ana, provincia de San José, del país Costa Rica, durante los meses de setiembre a noviembre de 2023. Ambas eran vegetales de cultivo convencional (no orgánico) y se estandarizó un rango de peso de 250 - 300 g para la zanahoria y 700 - 850 g para el repollo, así como una longitud de 20 - 24 cm para la zanahoria.

El procesamiento de los vegetales se realizó en la Planta Piloto del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), Universidad de Costa Rica (UCR), sede Rodrigo Facio, San Pedro, Montes de Oca.

El repollo y la zanahoria se lavaron con agua y se desinfectaron con ácido peracético 150 mg ml⁻¹ durante 3 min. Se peló la zanahoria con un pelador manual y se eliminaron las hojas de la capa más externa del repollo que se cortó en seis partes iguales para eliminar el corazón (Lee et al., 2014). Para el rallado, se utilizó una rebanadora marca Hobart (modelo 4812, Hobart Manufacturing Co., Troy, OH, Estados Unidos) con cuchillas de 3 mm (rebanado para repollo y rallado para zanahoria). Después del procesamiento se tomaron 550 g de cada uno de los vegetales y se almacenaron a 4 °C por 24 h en bolsas de polietileno de baja densidad sin sello. Se realizaron tres repeticiones independientes de los experimentos.

Inoculación de muestras

La inoculación de las muestras, los tratamientos de reducción y los análisis microbiológicos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica (UCR), sede Rodrigo Facio, San Pedro, Montes de Oca.

Se usaron las cepas de *E. coli* ATCC 25922 y de *L. monocytogenes* ATCC 19116 en congelación y caldo nutritivo con glicerol a -80 °C. Se colocó una asada de cada cepa en agar tripticosa soya (ATS) que se incubó a 35 °C durante 24 horas. Luego se tomó una asada llena, se colocó en un tubo de 10 ml de caldo tripticosa soya suplementado con 0,6 % de extracto de levadura para *L. monocytogenes* y en un tubo con caldo infusión cerebro corazón para *E. coli*. Se prepararon dos tubos de cada bacteria y se incubaron a 35 °C por 24 h (Akbas & Ölmez, 2007) para luego combinar y homogenizar el contenido de ambos tubos.

Se tomaron 12,5 ml de cada inóculo y se colocaron en 2475 ml de agua destilada estéril en una bandeja para la inoculación del vegetal. Se agregó 500 g de repollo o zanahoria según fuera el caso (Akbas & Ölmez, 2007). Las muestras se dejaron en contacto con la disolución de inóculo durante una hora con agitación manual cada 10 min. Los vegetales se escurrieron de forma manual con un colador. Por último, cada vegetal se colocó en bandejas estériles para su secado en cámara de flujo laminar durante 2 h (Koseki et al., 2003). Se tomaron 25 g de repollo o zanahoria para el recuento inicial del inóculo y 50 g para cada uno de los tratamientos de reducción. En todos los casos, el recuento inicial del microorganismo inoculado en el vegetal fue de 6 - 7 log UFC/g para poder determinar si los tratamientos de desinfección lograban reducir 5 log UFC/g.

Tratamientos de desinfección

Se llevaron a cabo un total de siete tratamientos para cada combinación de microorganismo (*E. coli* o *L. monocytogenes*) y vegetal (zanahoria o repollo rallados), obtenidos por la combinación de dos ácidos (ácido cítrico y ácido láctico) y de tres concentraciones (5, 10 y 20 g l⁻¹) más un tratamiento control (inmersión en agua). Se evaluó la reducción microbiológica de *E. coli* y *L. monocytogenes* con ácido cítrico al 5, 10 y 20 g l⁻¹, ácido láctico al 5, 10 y 20 g l⁻¹, así como una inmersión en agua (siete tratamientos en total) en repollo y zanahoria rallados. Todas las disoluciones de inmersión se prepararon a diario con agua destilada estéril. Para esto, se midió el volumen necesario de ácido láctico (CAS 79-33-4 o CAS 50-21-5) y se pesó la cantidad necesaria de ácido cítrico (CAS 77-92-9) para preparar las tres concentraciones en estudio.

Se pesó 50 g de repollo o zanahoria y se colocaron en 250 ml de la disolución de inmersión (agua destilada estéril, ácido cítrico o ácido láctico en sus diferentes concentraciones). Esto corresponde a una proporción 1:5 vegetal:disolución propuesta por Alenyorege et al. (2019), y la desinfección se llevó a cabo por 5 min. Al finalizar este tiempo se escurrió el vegetal con un colador y se tomaron 25 g para realizar el recuento final tras la desinfección.

Análisis microbiológicos

Para los recuentos, se seleccionaron al azar y pesaron 25 g (unidad experimental) de zanahoria o repollo para colocarlos en una bolsa estéril. A los 25 g de muestra para el recuento inicial o final se agregó 225 ml de agua peptonada estéril 0,1 % y se homogenizó (Bag Mixer CC400, Interscience) durante 1 min. A partir de esta bolsa, se realizaron diluciones decimales en el mismo diluyente para transferir 1 ml a tubos con 9 ml (Petran et al., 2015).

Se realizó el recuento de *E. coli* por medio de la metodología descrita en Petran et al. (2015) con la modificación de usar agar MacConkey y el recuento de *L. monocytogenes* en agar Oxford (Law et al., 2015), ambos por la técnica de esparcimiento con incubación por 48 h a 35 °C (Law et al., 2015; Petran et al., 2015). Se contaron las colonias típicas en cada uno de los agares y se reportaron en log UFC/g, se calculó la reducción microbiológica (variable respuesta) al restar del recuento inicial el recuento final.

Diseño experimental y análisis estadísticos

Para cada combinación de microorganismo (*E. coli* o *L. monocytogenes*) y vegetal (zanahoria o repollo rallados), se utilizó un diseño irrestricto al azar de un sólo factor nominal con siete niveles, dados por los siete tratamientos. Se utilizó como variable respuesta continua la reducción logarítmica del microorganismo. En cada caso se aplicó un análisis de varianza para determinar la significancia del tratamiento aplicado. Todos los análisis se trabajaron con el programa JMP 14.3 Portable a un nivel de significancia del 5 %.

Al encontrar significancia se utilizó la prueba de contrastes ortogonales para las siguientes comparaciones: a) reducciones con ambos ácidos versus reducción con agua y b) reducción con ácido cítrico versus reducción con ácido láctico. Además, para analizar en un mismo ácido el efecto de la concentración, se utilizó la prueba de Bonferroni (se corrigió el nivel de significancia a 0,017) para comparar: a) la reducción en la concentración más baja con la de la concentración media; b) la reducción de la concentración media con la de la concentración más alta; y c) la reducción de la concentración más baja con la de la más alta.

Resultados

Las reducciones de *E. coli* observadas tras la desinfección de la zanahoria rallada con ácido cítrico o ácido láctico son mayores ($p < 0,0001$) que las observadas con agua (control) (Cuadro 1). En estas mismas condiciones las reducciones observadas con ácido láctico fueron mayores ($p = 0,0003$) que las observadas con ácido cítrico. Para ambos ácidos se determinó que la reducción observada para 20 g l⁻¹, fue mayor que para 5 g l⁻¹ ($p < 0,017$). No fue posible determinar la reducción de *L. monocytogenes* en zanahoria rallada. El nivel de inóculo recuperado nunca coincidió con el esperado.

Las reducciones de *E. coli* observadas tras la desinfección de repollo rallado con ácido cítrico o ácido láctico fueron mayores ($p < 0,0001$) que las observadas con agua (control) (Cuadro 2). No se encontró diferencia para las reducciones determinadas con ambos ácidos ($p = 0,2917$). Para ambos ácidos se determinó que la reducción observada para 20 g l⁻¹, fue mayor que para 5 g l⁻¹ ($p < 0,017$). En el caso del ácido láctico, además, la reducción para 20 g l⁻¹ fue mayor que la encontrada para 10 g l⁻¹ ($p < 0,017$).

Las reducciones de *L. monocytogenes* observadas tras la desinfección de repollo rallado con ácido cítrico o ácido láctico fueron mayores ($p = 0,0001$) que las observadas con agua (control) (Cuadro 2). Las reducciones observadas con ácido láctico fueron mayores que las observadas para el ácido cítrico ($p = 0,0014$). No se encontró un efecto de la concentración de ácido cítrico sobre la reducción de la bacteria en el vegetal ($p > 0,017$); sin embargo, para el ácido láctico se determinó que la reducción observada para 20 g l⁻¹, fue mayor que para 5 g l⁻¹ ($p < 0,017$).

Cuadro 1. Reducciones microbiológicas en zanahoria (*Daucus carota*) desinfectada con ácido cítrico y láctico a diferentes concentraciones. San José, Costa Rica, 2023.

Table 1. Microbiological reductions in carrots (*Daucus carota*) disinfected with citric and lactic acid at different concentrations. San José, Costa Rica, 2023.

Tipo de producto	Concentración (g l ⁻¹)	Reducción de <i>Escherichia coli</i> (log UFC/g) ¹	Reducción de <i>Listeria monocytogenes</i> (log UFC/g)
Ácido cítrico	5	2,0 ± 0,9	
	10	2,9 ± 0,6	ND ²
	20	3,9 ± 0,1	
Ácido láctico	5	3 ± 1	
	10	5 ± 2	ND ²
	20	5 ± 1	
Agua	No aplica	0,3 ± 0,4	ND ²

¹Se muestran los promedios (n= 3) con el respectivo intervalo de confianza ($\alpha= 0,05$). / Values shown are means (n= 3) with the corresponding confidence interval ($\alpha= 0,05$).

²No fue posible determinar la reducción para este microorganismo en este vegetal / It was not possible to determine the reduction of this microorganism in this vegetable.

Cuadro 2. Reducciones microbiológicas en repollo (*Brassica oleracea*) desinfectado con ácido cítrico y láctico a diferentes concentraciones. San José, Costa Rica, 2023.

Table 2. Microbiological reductions in cabbage (*Brassica oleracea*) disinfected with citric and lactic acid at different concentrations. San José, Costa Rica, 2023.

Tipo de producto	Concentración (g l ⁻¹)	Reducción de <i>Escherichia coli</i> (log UFC/g)	Reducción de <i>Listeria monocytogenes</i> (log UFC/g)
Ácido cítrico	5	2 ± 2	1,3 ± 0,1
	10	3 ± 4	1,2 ± 0,2
	20	4 ± 2	1,6 ± 0,4
Ácido láctico	5	2,9 ± 0,4	1,5 ± 0,4
	10	3 ± 1	1,9 ± 0,4
	20	5,0 ± 0,9	2,4 ± 0,3
Agua	No aplica	0,3 ± 0,8	0,6 ± 0,1

Se muestran los promedios (n=3) con el respectivo intervalo de confianza ($\alpha=0,05$). / Values shown are means (n=3) with the corresponding confidence interval ($\alpha=0,05$).

Discusión

Lo resultados obtenidos en las pruebas preliminares indicaron que es imposible obtener recuentos altos (5 log UFC/g o mayores) de *L. monocytogenes* al inocular este microorganismo en zanahoria rallada. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios similares (Bolten et al., 2023; Ma et al., 2015; Noriega et al., 2010) e impide realizar los experimentos de reducción de *L. monocytogenes* con ácidos de esta investigación específicamente en zanahoria. De acuerdo con estos estudios, la zanahoria ejerce un efecto antimicrobiano natural contra este microorganismo, el cual, al menos a la fecha, no ha sido documentado en zanahoria producida en Costa

Rica. Dado que para medir reducciones es importante lograr un nivel de inóculo alto, no fue posible completar el estudio con este microorganismo en este vegetal.

En cuanto a los resultados donde se pudo determinar la reducción microbiológica con las diferentes concentraciones de ácidos, otros estudios realizados en diversos vegetales coinciden con la presente investigación en cuanto al beneficio de aplicar ácido cítrico y ácido láctico (en comparación con agua) para obtener mayores reducciones. Así se demostró en lechuga (Akbas & Ölmez, 2007; Sagong et al., 2011), tomate, pepino, zanahoria y lechuga (Pounraj et al., 2021), repollo (Bae et al., 2011) y manzana y lechuga (Park et al., 2011). En este estudio las reducciones con agua fueron de 0,1 a 0,7 log UFC/g, similares a las obtenidas por otros autores de 0,3 log UCF/g en repollo troceado (Lee et al., 2014) y de 0,54 log UFC/g en zanahoria rallada (Petri et al., 2015).

Las reducciones microbiológicas obtenidas en respuesta al uso de los ácidos orgánicos se deben a que estos alteran la estructura de las unidades de la membrana celular, como las proteínas y los fosfolípidos, afectan a la permeabilidad de la membrana celular y provocan la fuga de los metabolitos internos de la célula, pueden penetrar en la célula y afectar actividades intracelulares como la replicación del ADN y la síntesis de proteínas, procesos que culminan con la muerte celular (Chinchkar et al., 2022; Coban, 2020) mientras que el agua arrastra a los microorganismos a la disolución acuosa (Sagong et al., 2011).

Se observó que el ácido láctico permitió mayores reducciones de *L. monocytogenes* en repollo y de *E. coli* en zanahoria que el ácido cítrico, estos resultados coinciden con lo obtenido por Akbas & Ölmez (2007) en lechuga. Lo anterior puede deberse a que el ácido láctico presenta una constante de disociación mayor a la del ácido cítrico (pKa de 3,85 y de 3,09, respectivamente), por lo que el ácido láctico tiene una mayor habilidad de liberar protones al medio ambiente y ejercer su efecto antimicrobiano (Coban, 2020; Wijayasinghe et al., 2019). Las reducciones para *E. coli* en repollo fueron de similar magnitud al utilizar ácido láctico y ácido cítrico.

En repollo y zanahoria no se vio beneficio al aumentar la concentración de ácido cítrico de 5 a 10 g l⁻¹ para reducir *E. coli*, mientras que la concentración de 20 g l⁻¹ resulta en una mayor reducción, lo cual coincide con el estudio de Akbas & Ölmez (2007) de desinfección de lechuga, mientras que, en otro estudio, concentraciones de 5 a 15 g l⁻¹ no lograron reducir *E. coli* en zanahoria (Bermúdez-Aguirre & Barbosa-Cánovas, 2013). Es importante considerar la calidad microbiológica y sensorial del vegetal, ya que se ha reportado que usar concentraciones de ácidos orgánicos mayores a 10 g l⁻¹ podrían afectar sus características (Akbas & Ölmez, 2007).

En el caso de la reducción de *L. monocytogenes* con ácido cítrico, estas son de baja magnitud (1 – 2 log UFC/g) y aumentar la concentración del ácido no ofreció mayores reducciones del microorganismo. Este mismo resultado se observó al desinfectar lechuga con ácido cítrico (10 g l⁻¹ por 5 min) donde las reducciones son cercanas a 1 log UFC/g (Akbas & Ölmez, 2007); sin embargo, en otra investigación sobre lechuga las reducciones aumentan de manera significativa al modificar la concentración del ácido de 5 a 20 g l⁻¹, aunque permanecen en magnitudes similares a las de este estudio (0,51 a 1,64 log UFC/g) (Sagong et al., 2011).

La reducción de *L. monocytogenes* con ácido láctico es considerada baja (1,1 – 2,7 log UFC/g), aunque fue mayor a la obtenida por Zhang y Farber (1996) en vegetales frescos cortados, donde la reducción fue de 0,5 log UFC/g (concentración de 5 g l⁻¹ y tiempo de 10 min), pero similar a la de Bae et al. (2011) y Pounraj (2021), quienes obtuvieron resultados de 1,73 log UFC/g en repollo y 1,8 log UFC/g en zanahoria (20 g l⁻¹ y 2,5 g l⁻¹ respectivamente por 10 min). Las bajas reducciones de *L. monocytogenes* observadas, tanto en este estudio como en la literatura, podrían deberse a que se han descrito mecanismos de adaptación al ácido en este microorganismo que lo hacen resistente a desinfecciones con ácidos orgánicos (Giaouris et al., 2014). Además, el obtener menores reducciones para este microorganismo que para *E. coli* puede atribuirse también a que se ha descrito que los Gram negativos son más susceptibles a los ácidos que los Gram positivos (Amrutha et al., 2017; Deng et al., 2020).

Al desinfectar el repollo y la zanahoria con ácido láctico se observó que en todos los casos las reducciones microbiológicas mejoran al aumentar la concentración de 5 a 20 g l⁻¹ y que para el caso de *E. coli* las reducciones con 20 g l⁻¹ son de una magnitud de 4 – 6 log UFC/g, resultado que se acerca a la meta establecida por la FDA de reducción microbiológica de 5 log UFC/g (Venkitanarayanan et al., 2002). La comparación anterior entre

concentraciones del ácido utilizado es importante debido a que el objetivo es lograr la máxima reducción de los microorganismos mientras que se utilice la menor concentración de ácido posible y que esta sea efectiva (Akbas & Ölmez, 2007).

Con respecto a las metas de desinfección establecidas por diferentes referencias, contrastan los resultados obtenidos para ambos microorganismos. Esto debido a que la reducción de *L. monocytogenes* en repollo no cumple con la meta más baja de reducción establecida por EPA al ser menor a 2 log UFC/g (Beuchat et al., 2001), mientras que la reducción de *E. coli* en este alimento con ácido cítrico y láctico al 2 % sí la cumple.

Conclusiones

Las reducciones microbiológicas de *E. coli* determinadas en esta investigación validan el uso de procesos de desinfección con ácido cítrico o ácido láctico (en los niveles de concentración y tiempo estudiados) para desinfectar repollo o zanahoria rallados y alcanzar reducciones meta de al menos 2 log UFC/g y en algunos casos hasta de 5 log UFC/g. En el caso de *L. monocytogenes* es necesario evaluar otros agentes o sus combinaciones para alcanzar las reducciones meta en repollo rallado.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado con fondos del Proyecto C3-115 “Efecto de tratamientos combinados en la calidad microbiológica, inocuidad y calidad sensorial del repollo y la zanahoria rallados” inscrito en la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica a quien se le agradece su contribución económica.

Referencias

- Adams, M. R., Moss, M. O., & McClure, P. (2016). *Food microbiology* (4th ed.). The Royal Society of Chemistry.
- Akbas, M. Y., & Ölmez, H. (2007). Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. *Letters in Applied Microbiology*, 44(6), 619–624. <https://doi.org/10.1111/J.1472-765X.2007.02127.X>
- Alenyorege, E. A., Ma, H., Ayim, I., Aheto, J. H., Hong, C., & Zhou, C. (2019). Reduction of *Listeria innocua* in fresh-cut Chinese cabbage by a combined washing treatment of sweeping frequency ultrasound and sodium hypochlorite. *LWT*, 101, 410–418. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.048>
- Amrutha, B., Sundar, K., & Shetty, P. H. (2017). Effect of organic acids on biofilm formation and quorum signaling of pathogens from fresh fruits and vegetables. *Microbial pathogenesis*, 111, 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.042>
- Bae, Y. M., Choi, N. Y., Heu, S., Kang, D. H., & Lee, S. Y. (2011). Inhibitory effects of organic acids combined with modified atmosphere packaging on foodborne pathogens on cabbage. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 54(6), 993–997. <https://doi.org/10.1007/BF03253191>
- Batt, C. (2014). ESCHERICHIA COLI | *Escherichia coli*. In C. A. Batt, & M. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of food microbiology* (2nd ed., pp. 688–694). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00100-2>
- Bermúdez-Aguirre, D., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2013). Disinfection of selected vegetables under nonthermal treatments: chlorine, acid citric, ultraviolet light and ozone. *Food Control*, 29(1), 82–90. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2012.05.073>

- Beuchat, L. R., Farber, J. M., Harris, L. J., Parish, M. E., Suslow, T. V., Busta, F. F., & Garrett, E. H. (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*(7), 1079–1084. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.7.1079>
- Bhilwadikar, T., Pounraj, S., Manivannan, S., Rastogi, N. K., & Negi, P. S. (2019). Decontamination of microorganisms and pesticides from fresh fruits and vegetables: a comprehensive review from common household processes to modern techniques. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *18*(4), 1000–1038. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12453>
- Bolten, S., Mowery, J., Gu, G., Redding, M., Kroft, B., Luo, Y., & Nou, X. (2023). *Listeria monocytogenes* loss of cultivability on carrot is associated with the formation of mesosome-like structures. *International Journal of Food Microbiology*, *390*, Article 110121. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110121>
- Botondi, R., Barone, M., & Grasso, C. (2021). A review into the effectiveness of ozone technology for improving the safety and preserving the quality of fresh-cut fruits and vegetables. *Foods*, *10*(4), Article 748. <https://doi.org/10.3390/FOODS10040748>
- Carstens, C. K., Salazar, J. K., & Darkoh, C. (2019). Multistate outbreaks of foodborne illness in the United States associated with fresh produce from 2010 to 2017. *Frontiers in microbiology*, *10*, Article 2667. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02667>
- Chang, J. (2015). *Food safety research for fresh produce* [Master of science thesis, Purdue University]. Purdue Open Access Thesis. https://docs.lib.purdue.edu/open_access_theses/1098
- Chinchkar, A. V., Singh, A., Singh, S. V., Acharya, A. M., & Kamble, M. G. (2022). Potential sanitizers and disinfectants for fresh fruits and vegetables: A comprehensive review. *Journal of Food Processing and Preservation*, *46*, Article e16495. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16495>
- Coban, H. B. (2020). Organic acids as antimicrobial food agents: applications and microbial productions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *43*, 569–591. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02256-w>
- Cruz Mendoza, I., Ortiz Luna, E., Dreher Pozo, M., Villavicencio Vásquez, M., Coello Montoya, D., Chuchuca Moran, G., Galarza Romero, L., Yépez, X., Salazar, R., Romero-Peña, M., & Coronel León, J. (2022). Conventional and non-conventional disinfection methods to prevent microbial contamination in minimally processed fruits and vegetables. *LWT*, *165*, Article e113714. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113714>
- da Silva, N., Taniwaki, M., Junqueira, V., Silveira, N., Okazaki, M., & Romeiro Gomes, R. (2018). *Microbiological examination methods of food and water: A laboratory manual* (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315165011>
- Danyluk, M. D., Fatica, M. K., Brar, P. K., McEgan, R., Valadez, A. M., Schneider, K. R., & Trinetta, V. (2015). 50. Fruits and Vegetables. In Y. Salfinger, & L. Tortorello (Eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (5th ed., pp. 687–696). American Public Health Association. <https://doi.org/10.2105/MBEF.0222.055>
- De Corato, U. (2019). The market of the minimally processed fresh produce needs of safer strategies for improving shelf life and quality: a critical overview of the traditional technologies. *Open Access Journal of Agricultural Research*, *4*(1), Article 000216. <http://doi.org/10.23880/oajar-16000216>
- Deng, L. Z., Mujumdar, A. S., Pan, Z., Vidyarthi, S. K., Xu, J., Zielinska, M., & Xiao, H. W. (2020). Emerging chemical and physical disinfection technologies of fruits and vegetables: a comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(15), 2481–2508. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1649633>

- do Prado Vilarin, S., Rocha Teixeira, T. M., Gonçalves Lima, C. M., Pamplona Pagnossa, J., Mendonça de Figueiredo, R., Cardoso Medeiros, U. B., & Ferreira Santana, R. (2020). Effect of sanitization on minimally processed cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Research, Society and Development*, 9(6), Article e59963467. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i6.3467>
- Erickson, M. C. (2019). Microbiological issues associated with fruits, vegetables, nuts, and grains. In M. P. Doyle, F. Diez-Gonzalez, & C. Hill (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (pp. 179–206). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555819972.ch7>
- Ferreira Gomes, B. A., Silveira Alexandre, A. C., Vieira de Andrade, G. A., Pereira Zanzini, A., Araújo de Barros, H. E., dos Santos Ferraz e Silva, L. M., Aparecida Costa, P., & de Barros Vilas Boas, E. V. (2023). Recent advances in processing and preservation of minimally processed fruits and vegetables: a review – part 2: physical methods and global market outlook. *Food Chemistry Advances*, 2, Article e100304. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100304>
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., & Nychas, G. J. (2014). Acquired acid adaptation of *Listeria monocytogenes* during its planktonic growth enhances subsequent survival of its sessile population to disinfection with natural organic compounds. *Food Research International*, 64, 896–900. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.044>
- Jnani, D., & Ray, S. D. (2024). *Escherichia coli*. In P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of toxicology* (4th ed., pp 357–367). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00190-1>
- Khan, I., Tango, C. N., Miskeen, S., Lee, B. H., & Oh, D. H. (2017). Hurdle technology: A novel approach for enhanced food quality and safety – A review. *Food Control*, 73, 1426–1444. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.010>
- Koseki, S., Yoshida, K., Kamitani, Y., & Itoh, K. (2003). Influence of inoculation method, spot inoculation site, and inoculation size on the efficacy of acidic electrolyzed water against pathogens on lettuce. *Journal of Food Protection*, 66(11), 2010–2016. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-66.11.2010>
- Law, J. W.-F., Ab Mutalib, N.-S., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Frontiers in Microbiology*, 6, Article 1227. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01227>
- Lee, H. H., Hong, S. I., & Kim, D. (2014). Microbial reduction efficacy of various disinfection treatments on fresh-cut cabbage. *Food Science and Nutrition*, 2(5), 585–590. <https://doi.org/10.1002/fsn3.138>
- Liu, C., Chen, C., Jiang, A., Zhang, Y., Zhao, Q., & Hu, W. (2021). Effects of aqueous ozone treatment on microbial growth, quality, and pesticide residue of fresh-cut cabbage. *Food Science and Nutrition*, 9(1), 52–61. <https://doi.org/10.1002/FSN3.1870>
- Ma, T., Luo, J., Tian, C., Sun, X., Quan, M., Zheng, C., Kang, L., & Zhan, J. (2015). Influence of technical processing units on chemical composition and antimicrobial activity of carrot (*Daucus carrot* L.) juice essential oil. *Food Chemistry*, 170, 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.018>
- Ma, L., Zhang, M., Bhandari, B., & Gao, Z. (2017). Recent developments in novel shelf-life extension technologies of fresh-cut fruits and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 64, 23–38. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.005>
- Meireles, A., Giaouris, E., & Simões, M. (2016). Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry. *Food Research International*, 82, 71–85. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2016.01.021>

- Noriega, E., Newman, J., Sagers, E., Robertson, J., Laca, A., Díaz, M., & Brocklehurst, T. M. (2010). Antilisterial activity of carrots: Effect of temperature and properties of different carrot fractions. *Food Research International*, 43(10), 2425–2431. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.012>
- Park, S. H., Choi, M. R., Park, J. W., Park, K. H., Chung, M. S., Ryu, S., & Kang, D. H. (2011). Use of organic acids to inactivate *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh apples and lettuce. *Journal of Food Science*, 76(6), 293–298. <https://doi.org/10.1111/J.1750-3841.2011.02205.X>
- Petri, E., Rodríguez, M., & García, S. (2015). Evaluation of combined disinfection methods for reducing *Escherichia coli* O157:H7 population on fresh-cut vegetables. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(8), 8678–8690. <https://doi.org/10.3390/ijerph120808678>
- Pinela, J., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Nonthermal physical technologies to decontaminate and extend the shelf-life of fruits and vegetables: Trends aiming at quality and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(10), 2095–2111. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1046547>
- Petran, R. L., Grieme, L. E., & Foong-Cunningham, S. (2015). 6. Culture methods for enumeration of microorganisms. In Y. Salfinger, & M. L. Tortorello (Eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (5th ed.). American Public Health Association. <https://doi.org/10.2105/MBEF.0222.011>
- Pounraj, S., Bhilwadikar, T., Manivannan, S., Rastogi, N. K., & Negi, P. S. (2021). Effect of ozone, lactic acid and combination treatments on the control of microbial and pesticide contaminants of fresh vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(8), 3422–3428. <https://doi.org/10.1002/JSFA.10972>
- Sagong, H. G., Lee, S. Y., Chang, P. S., Heu, S., Ryu, S., Choi, Y. J., & Kang, D. H. (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(1), 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.010>
- Sango, D. M., Abela, D., McElhatton, A., & Valdramidis, V. P. (2014). Assisted ultrasound applications for the production of safe foods. *Journal of Applied Microbiology*, 116(5), 1067–1083. <https://doi.org/10.1111/JAM.12468>
- Sarron, E., Gadonna-Widehem, P., & Aussenac, T. (2021). Ozone treatments for preserving fresh vegetables quality: a critical review. *Foods*, 10(3), Article 605. <https://doi.org/10.3390/foods10030605>
- Silveira Alexandre, A. C., Ferreira Gomes, B. A., Nayara Duarte, G., Fabiane Piva, S., Barros Zauza, S., & de Barros Vilas Boas, E. V. (2022). Recent advances in processing and preservation of minimally processed fruits and vegetables: a review – part 1: fundamentals and chemical methods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(8), Article e16757. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16757>
- Tzortzakakis, N., & Chrysargyris, A. (2017). Postharvest ozone application for the preservation of fruits and vegetables. *Food Reviews International*, 33(3), 270–315. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1175015>
- Venkitanarayanan, K. S., Lin, C. M., Bailey, H., & Doyle, M. P. (2002). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytogenes* on apples, oranges, and tomatoes by lactic acid with hydrogen peroxide. *Journal of food protection*, 65(1), 100–105. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-65.1.100>
- Wang, J., Wang, S., Sun, Y., Li, C., Li, Y., Zhang, Q., & Wu, Z. (2019). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and naturally present microbes on fresh-cut lettuce using lactic acid and aqueous ozone. *RSC Advances*, 9, 22636–22643. <https://doi.org/10.1039/C9RA03544C>

- Wijayasinghe, R., Bogahawaththa, D., Huppertz, T., Chandrapala, J., & Vasiljevic, T. (2019). Influence of lactic, citric and phosphoric acids on the properties of concentrated lactose solutions. *Food Chemistry*, 293, 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.065>
- Wirtanen, G., & Salo, S. (2016). Chapter 5 - Biofilm risks. In H. Lelieveld, J. Holah, & D. Gabrić (Eds.), *Handbook of hygiene control in the food industry* (2nd ed., pp 55–79). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100155-4.00005-4>
- Yoon, J. H., & Lee, S. Y. (2018). Review: 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, S., & Farber, J. M. (1996). The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. *Food Microbiology*, 13(4), 311–321. <https://doi.org/10.1006/fmic.1996.0037>