

1541

El limón como biocida natural para desinfectar las aguas de consumo¹

Miguel D'Aquino² y Sergio A. Teves²

Se estudió la actividad biocida natural del zumo de limón para examinar su posible uso como desinfectante e inhibidor de Vibrio cholerae en las aguas de consumo de lugares sin plantas de tratamiento.

De enero a julio de 1993 se prepararon artificialmente aguas de distinta dureza y alcalinidad y se obtuvieron muestras de aguas subterráneas y superficiales de zonas rurales y urbanas de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Después de medir su dureza y alcalinidad, se le añadió a cada una zumo de limón en diferentes concentraciones y se determinaron el grado de acidez obtenido y la actividad del limón contra V. cholerae.

Los resultados demostraron que el zumo de limón es activo contra V. cholerae, pero que esta actividad se reduce en aguas muy alcalinas. Por consiguiente, el tratamiento de las aguas de consumo subterráneas, que son las de mayor alcalinidad, puede destruir V. cholerae solo a una concentración mínima de limón de 2% y a un tiempo de acción mínimo de 30 minutos. Se recomienda, sin embargo, conocer la alcalinidad del agua local que se busca tratar antes de fijar la concentración mínima de limón.

La reaparición del cólera en distintas partes de América Latina ha generado la búsqueda de nuevos compuestos para desinfectar las aguas de consumo, que son la principal vía de contaminación con *Vibrio cholerae*. Este microorganismo, excretado en las heces de personas infectadas, sobrevive mejor en el ambiente acuático. No obstante, pueden ser fuentes de infección los alimentos, entre ellos los mariscos, vegetales y otros productos, cuando su higiene y cocción son inadecuadas (1-3).

Los compuestos comúnmente utilizados para desinfectar las aguas domiciliarias son a base de cloro y se añaden al agua hasta lograr una concentración de este elemento de 0,5 mg/l o más (4). Actualmente se procura,

sin embargo, reducir a un mínimo la ingestión de compuestos clorados por los posibles daños a la salud que conlleva la formación de trihalometanos en presencia de restos orgánicos vegetales, como el humus (5-7). De ahí que se busque sustituir a los derivados del cloro con otras sustancias químicas. En muchas partes, además, no se dispone de compuestos clorados y se torna necesario recurrir a otras sustancias más accesibles y de bajo costo, como el limón, que es un biocida natural. El objetivo del presente trabajo es estudiar la actividad desinfectante del limón en aguas contaminadas con *V. cholerae* y examinar algunas características de las aguas capaces de afectar a esta actividad.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación tuvo lugar de enero a julio de 1993 y se hizo con distintas aguas naturales superficiales y profundas obtenidas en diferentes localidades de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Estas aguas fueron de la red de distribución domiciliar de agua potable, de río y especialmente de pozo, por-

¹ La edición independiente en inglés se publica en el *Bulletin of the Pan American Health Organization*, Vol. 28, No. 4, 1994, con el título "Lemon as a natural biocidal agent for disinfecting drinking water."

² Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires, Argentina. Dirección postal: Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedra de Higiene y Sanidad, Junín 956, piso 4, Buenos Aires 1113, Argentina.

que son las más accesibles a poblaciones rurales y urbanas y porque reaccionan de manera distinta frente a las sustancias ácidas estudiadas, debido probablemente a las características de salinidad, dureza y alcalinidad de las capas acuíferas.

Con estas aguas y con varias soluciones "patrón" preparadas artificialmente hasta conseguir determinada dureza y alcalinidad se obtuvieron distintas diluciones de zumo de limón, con las cuales se efectuaron los diferentes ensayos. Las soluciones patrón fueron las siguientes:

- solución patrón de agua dura preparada con cloruro de magnesio ($MgCl_2$) y cloruro de calcio ($CaCl_2$) y equivalente a una solución de 340 a 360 mg/l de carbonato de calcio ($CaCO_3$) (8);
- solución patrón de agua alcalina, preparada con carbonato de sodio (Na_2CO_3) hasta lograr una alcalinidad equivalente a la de una solución de 400 mg/l de $CaCO_3$ (9);
- solución patrón de agua dura y alcalina, preparada añadiendo bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) a la solución patrón de agua dura hasta conseguir una alcalinidad equivalente a la de una solución de $CaCO_3$ de 400 mg/l.

Las aguas naturales subterráneas, clasificadas de "a" a "e", y las superficiales, clasificadas de "f" a "i", se obtuvieron de distintas fuentes. A continuación se indica la procedencia de cada una:

Aguas subterráneas:

- a) zona costera marina de la provincia de Buenos Aires;
- b) zona rural de la provincia de Buenos Aires (Dolores);
- c) otra zona costera marina de la provincia de Buenos Aires situada a 10 km de la fuente del agua "a";
- d) zona urbana de la provincia de Buenos Aires (Castelar);
- e) zona urbana de la provincia de Buenos Aires (Munro).

Aguas superficiales:

- f) agua de la red domiciliaria, proveniente del río de La Plata. Es un agua blanda (de dureza equivalente a la de una solución de $CaCO_3$ de 63 mg/l) sin cloro residual;
- g) río de La Plata (a 5 km de la costa);
- h) río Luján;
- i) agua destilada, preparada con agua de la red domiciliaria (para los controles).

La dureza y alcalinidad de las distintas aguas naturales y artificiales se determinaron con métodos estándar (negro de eriocromo T y titulación con HCl). Posteriormente se colocaron en una serie de tubos de ensayo 10 ml de distintas diluciones preparadas con las siguientes sustancias: 1) zumo de limones naturales cultivados en las provincias argentinas de Tucumán y Entre Ríos; 2) concentrados comerciales de limón embotellados; y ácido cítrico (marca Merck) al 7% —concentración equivalente a la del zumo de limón natural y a la de los concentrados embotellados reconstituidos— preparado en nuestro laboratorio (10). Estas diluciones se prepararon con cada una de las aguas descritas previamente. Se determinó el pH de cada una con un medidor de marca Cole Palmer, modelo 5985–80. Se anotaron los cambios de pH producidos con distintos grados de dureza y alcalinidad, puesto que estos cambios son los responsables del efecto bactericida.

Se preparó una suspensión de *V. cholerae*, biotipo El Tor, serotipo Inaba (cultivado 24 horas en caldo de agar tripticosa soja, marca Difco) en solución fisiológica hasta lograr una concentración de 2 a 3×10^9 bacterias por ml.

Para determinar la acción bactericida de las distintas sustancias ácidas se colocaron nuevamente en una serie de tubos de ensayo 10 ml de las diluciones de zumo de limón natural, zumo comercial reconstituido y ácido cítrico preparadas con cada una de las distintas aguas naturales y artificiales, y el contenido de cada tubo de ensayo se contaminó con 0,1 ml de la suspensión de *V. cholerae*. Las diluciones contaminadas se dejaron reposar en un baño de agua a una temperatura constante de 20 °C por períodos de 15 y 30 minutos —tomándose como tiempo 0 el momento

de la inoculación—, al cabo de los cuales se sembró 0,1 ml del contenido de cada tubo de ensayo en 10 ml de un caldo de cultivo (marca Difco) a base de tripticasa soja con 0,5% de Tween 80 para permitir la proliferación de microorganismos.

Los tubos se incubaron a 32–33 °C durante 48 horas y al final se anotó la ausencia o presencia de crecimiento bacteriano. El contenido de los tubos de ensayo en que hubo crecimiento bacteriano se cultivó sobre placas de agar a base de tripteína, citrato, bilis y sacarosa para comprobar la presencia de *V. cholerae*. En los cultivos positivos esta se confirmó mediante pruebas serológicas efectuadas con antisuero polivalente aglutinante, obtenido en el Instituto Nacional de Microbiología Dr. Carlos G. Malbrán, para el diagnóstico de *V. cholerae* 01 (serotipos Inaba y Ogawa).

RESULTADOS

En el cuadro 1 se presentan, en términos de mg de CaCO₃ por litro, la dureza y alcalinidad de las aguas naturales superficiales y profundas (y del agua destilada que sirvió de control). Datos similares sobre las soluciones artificiales de agua dura y alcalina aparecen en el cuadro 2, que también muestra el grado en que la dureza y la alcalinidad se alteraron con las diversas diluciones de zumo

CUADRO 1. Dureza y alcalinidad (expresadas en mg/l de CaCO₃) de distintas aguas naturales superficiales y profundas

Agua*	Dureza	Alcalinidad
a	245,0	249,80
b	283,0	326,03
c	290,0	305,33
d	175,0	401,06
e	170,0	429,52
f	63,0	51,75
g	43,7	77,62
h	42,0	77,00

* Las aguas "a" a "e" fueron subterráneas y las aguas "f" a "h" fueron de superficie. La muestra "i" fue de agua destilada y sirvió de control.

de limón. Como era de esperar, la dureza del agua no afectó de forma significativa al pH ácido producido por el zumo de limón, pero sí lo afectó la alcalinidad del agua.

Los resultados obtenidos al añadir a las distintas aguas los sucedáneos comerciales del zumo de limón y el ácido cítrico al 7% fueron similares a los obtenidos con el zumo de limón natural y por lo tanto no se incluyen ni en el cuadro 2 ni en los otros cuadros.

En el cuadro 3 se dan los diferentes pH obtenidos al añadir a las aguas naturales subterráneas —cuya dureza y alcalinidad se presentan en el cuadro 1— el zumo de limón natural y el ácido cítrico al 7% hasta obtener diversas diluciones. Por otra parte, en el cuadro 4 se pueden observar los pH obtenidos al

CUADRO 2. pH obtenidos al usar aguas ajustadas artificialmente hasta obtener grados específicos de dureza y alcalinidad (expresados en mg/l de CaCO₃) para preparar las diluciones indicadas de zumo de limón. (A las muestras de control no se les añadió zumo de limón)

Agua	Diluciones de zumo de limón						Control
	1/10	1/20	1/50	1/100	1/500	1/1000	
Dureza							
360,0	2,58	2,59	2,73	2,88	3,16	3,52	6,86
180,0	2,60	2,63	2,78	2,86	3,13	3,17	6,88
90,0	2,63	2,66	2,83	2,92	3,15	3,17	6,88
45,0	2,64	2,70	2,85	2,95	3,13	3,13	6,64
22,5	2,64	2,72	2,86	2,94	3,12	3,50	6,70
Alcalinidad							
396,0	2,90	2,95	3,80	4,82	9,66	10,12	10,29
198,0	2,88	2,93	3,31	3,90	7,14	9,14	9,88
99,0	2,84	2,86	3,08	3,28	5,71	6,42	9,49
49,5	2,95	2,84	2,92	3,05	3,87	5,12	9,12
24,8	2,96	2,86	2,93	3,13	3,40	3,97	8,12

CUADRO 3. pH obtenidos al usar las aguas naturales subterráneas "a" a "e" para preparar las diluciones indicadas de zumo de limón y de ácido cítrico al 7%. (A las muestras de control no se les añadió ni jugo de limón ni ácido cítrico)

	Diluciones						Control
	1/10	1/20	1/50	1/100	1/500	1/1000	
Zumo de limón							
a	2,75	2,94	3,36	3,95	6,55	6,67	7,46
b	2,85	3,05	3,60	4,35	6,47	6,67	7,26
c	2,86	3,01	3,60	4,36	6,61	6,76	7,29
d	2,83	3,07	3,91	4,95	6,75	6,93	7,33
e	2,82	3,09	3,97	5,18	6,65	6,72	6,88
Ácido cítrico al 7%							
a	2,68	2,71	3,29	3,88	6,31	6,37	7,46
b	2,60	2,78	3,34	4,12	6,43	6,45	7,26
c	2,69	2,80	3,38	4,06	6,41	6,52	7,29
d	2,70	3,00	3,83	4,80	6,70	6,96	7,33
e	2,71	2,98	3,85	4,87	6,60	6,63	6,88

CUADRO 4. pH obtenidos al usar las aguas naturales de superficie "f" a "h" y la muestra de agua destilada "i" para preparar las diluciones indicadas de zumo de limón. (A las muestras de control no se les añadió zumo de limón)

Agua	Diluciones de zumo de limón						Control
	1/10	1/20	1/50	1/100	1/500	1/1000	
f	2,85	3,02	3,30	3,47	3,72	5,47	7,40
g	2,86	3,10	3,40	3,67	4,10	6,24	7,23
h	2,84	3,10	3,38	3,62	3,93	6,18	7,20
i	2,75	2,85	3,10	3,25	3,35	3,78	6,36

CUADRO 5. pH obtenidos al usar muestras de agua ajustadas simultáneamente hasta obtener los grados de dureza y alcalinidad indicados (expresados en mg/l de CaCO₃) para preparar distintas diluciones de zumo de limón. (A las muestras de control no se les añadió zumo de limón)

Dureza/ alcalinidad	Diluciones de zumo de limón						Control
	1/10	1/20	1/50	1/100	1/500	1/1000	
406/312	2,88	3,08	3,80	4,55	7,19	7,29	7,50
203/155	2,89	2,92	3,26	3,97	6,40	6,71	7,61
102/77	2,87	2,85	3,08	3,33	5,37	6,08	7,51
51/39	2,89	2,86	2,99	3,22	4,33	5,27	7,40
25/19	2,88	2,88	2,99	3,20	3,88	4,14	7,10

añadir distintas cantidades de zumo de limón a las aguas naturales de superficie y al agua destilada usada a manera de control.

Cuando se prepararon diferentes diluciones de zumo de limón con las aguas duras

preparadas artificialmente y alcalinizadas para simular a las aguas naturales en dureza y alcalinidad, se obtuvieron pH similares a los obtenidos con las aguas subterráneas (cuadro 5), cuya alcalinidad promedio supera los 200

CUADRO 6. Presencia (+) o ausencia (-) de *Vibrio cholerae* en aguas de distintos pH acidificadas con zumo de limón (véanse los pH indicados), al cabo de 15 y 30 minutos de su inoculación con los vibriones

Agua*	Dilución de zumo de limón/tiempo de acción (en minutos)											
	1/20		1/30		1/40		1/50		1/100		1/1000	
	15	30	15	30	15	30	15	30	15	30	15	30
Dura (patrón)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
a pH	3,1	-	3,2	-	3,5	-	3,8	-	4,5	+	7,3	+
b pH	2,7	-	2,9	-	3,0	-	3,3	-	3,9	+	6,4	+
c pH	2,9	-	3,0	-	3,3	-	3,5	-	4,4	+	6,6	+
d pH	3,0	-	3,0	-	3,2	-	3,4	-	4,2	+	6,7	+
e pH	3,0	-	3,2	-	3,5	-	3,8	+	4,8	+	7,0	+
f pH	3,0	-	3,1	-	3,6	-	3,8	-	4,9	-	6,6	+
g pH	3,0	-	3,0	-	3,2	-	3,3	-	3,5	-	5,5	+
h pH	3,1	-	3,1	-	3,4	-	3,4	-	3,7	-	6,2	+
i pH	3,1	-	3,1	-	3,3	-	3,4	-	3,6	-	6,2	-
i pH	2,8	-	2,9	-	2,9	-	3,1	-	3,2	-	3,8	-

* Las aguas "a" a "e" fueron subterráneas y las aguas "f" a "h" fueron de superficie. La muestra "i" fue de agua destilada y sirvió de control.

mg/l de CaCO₃ (cuadro 1). Obsérvese que, como indica el cuadro 6, las concentraciones de limón de menos de 2,0% no sirven para inhibir *V. cholerae* porque el pH resultante es demasiado alto. La mayor eficacia, como indica el cuadro, se logra con un pH menor de 4.

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio sugieren que independientemente de su dureza, ciertas características de las aguas, como la alcalinidad, interfieren con el pH obtenido al añadirles distintas sustancias ácidas. La acción ácida del limón, de sus sucedáneos comerciales concentrados, y de la solución de ácido cítrico al 7% varía según la alcalinidad de las aguas subterráneas. En estas aguas el pH aumenta y se acerca a la neutralidad a diluciones mayores de 1,0%, a diferencia de lo que sucede con las aguas preparadas artifi-

cialmente, cuya dureza y alcalinidad son más bajas. Cuando se preparan con agua destilada las diferentes diluciones ácidas, se obtiene muy poca variación de pH debido al pH ligeramente ácido del agua misma (resultado de la absorción de CO₂ atmosférico durante la destilación) y a su pobrísima capacidad amortiguadora. Si a esto se suma la predilección de *V. cholerae* por cierto tenor salino, el resultado es una gran destrucción de *V. cholerae*.

Sobre la base de todo lo anterior se infiere que cuando el zumo de limón o sus sucedáneos se añaden a un agua subterránea alcalina en concentraciones inferiores a las señaladas en este trabajo, no se consigue la destrucción de *V. cholerae*. Cabe recordar que la alcalinidad y la dureza son características de las aguas naturales subterráneas.

Los ensayos biológicos, efectuados con aguas artificiales duras y alcalinas y con aguas naturales, reafirman los resultados de las pruebas fisicoquímicas (es decir, la determi-

nación de la dureza, alcalinidad y pH), los cuales se presentan en el cuadro 6. La dureza del agua por sí sola no interfiere con el pH obtenido cuando se añade una sustancia ácida, pero sí interfiere su alcalinidad. Los resultados demuestran, asimismo, que la dureza y la alcalinidad no obran sinérgicamente.

Nuestras experiencias previas en condiciones de laboratorio han demostrado que, a concentraciones mayores de 10 y 25% y durante períodos más cortos (5 a 10 minutos), el limón desinfecta las aguas contaminadas con *V. cholerae*. Se recomienda, sin embargo, efectuar pruebas específicas con los diferentes tipos de agua al alcance de la población, teniendo en cuenta todos los factores que pueden afectar a los resultados. De lo contrario, se podría fijar equivocadamente una dosis demasiado baja de la sustancia ácida en cuestión para desinfectar el agua de consumo como parte de la profilaxis del cólera. Este error tendría consecuencias peligrosas en una población convencida de que está protegida por una acción desinfectante que en realidad no ocurre.

De lo expuesto anteriormente se deduce que el limón tiene un efecto beneficioso indiscutible, ya que puede ser un desinfectante económico y accesible para las aguas de consumo en poblaciones rurales y urbanas. Se deberá tener en cuenta, sin embargo, que no todas las aguas subterráneas admiten la misma concentración de limón. A juzgar por nuestras pruebas, las aguas subterráneas con una alcalinidad media de 200 mg/l (expresada en términos de la concentración de CaCO_3) pueden desinfectarse para destruir a *V. cholerae* con una concentración mínima de zumo de limón de 2% —equivalente a 2 cucharadas por litro de agua— y con un tiempo de acción mínimo de 30 minutos, lo que daría un margen de seguridad aun mayor frente a aguas alcalinas.

En general, estos resultados solo se aplican a aguas de consumo, y ni las diluciones ni los períodos propuestos sirven para

desinfectar vegetales u otros alimentos en la profilaxis del cólera, ya que las concentraciones de limón necesarias serían mucho mayores debido a la posible presencia de sustancias que protegen al microorganismo (11).

REFERENCIAS

1. Pan American Health Organization. *Risks of transmission of cholera by food: health programs development*. Washington, D.C.: PAHO; 1991.
2. Barua D. Supervivencia del vibrión colérico en los alimentos, el agua y los fomites. En: Organización Mundial de la Salud. *Principios y práctica de la lucha contra el cólera* Ginebra: OMS; 1970.
3. Swaddiwudhhipong W, Akarasewi P, Chayaniyayodhin T, Kunusol P y Foy HM. A cholera outbreak associated with eating uncooked pork in Thailand. *J Diarrhoeal Dis Res* 1990;8:94.
4. Organización Panamericana de la Salud. Actividades y datos recientes sobre el cólera. *Bol Oficina Sanit Panamá* 1992;112:173-179.
5. Vogt C, Regli S. Controlling trihalomethanes while attaining disinfection. *J Am Waste Water Assoc* 1981;73:1-33.
6. Joyce WS, Di Giano FA, Uden PC. THM precursors in the environment. *J Am Waste Water Assoc* 1984;76:102-107.
7. D'Aquino M. Sobre las medidas químicas de profilaxis. *Ciencia hoy* 1991;3:17.
8. Rump HH, Krist H. *Laboratory manual for the examination of water, waste water, and soil*. 2a. ed. New York: VCH Publishers, Inc.; 1992.
9. *Código Alimentario Argentino Actualizado*. Cap XII 331. Buenos Aires: De La Canal y Asociados S.R.L.; 1992.
10. American Public Health Association. *Standard methods for examination of water and wastewater*. 16a. ed. Washington, D.C.: APHA; 1986.
11. Hager. *Volumen 1: Tratado de farmacia práctica*. Barcelona: Editorial Labor; 1950.
12. Amako K, Shimodori S, Imoto T, Miake S, Umeda A. Effects of chitin and its soluble derivatives on the survival of *V. cholerae* O1 at low temperature. *Appl Environ Microbiol* 1987;53:603-605.

ABSTRACT

Lemon as a Natural Biocidal Agent for Disinfecting Drinking Water

We studied the natural biocidal action of lemon juice in order to assess its possible use as a disinfectant and inhibitor of *Vibrio cholerae* in drinking water in places without treatment plants.

From January to July of 1993 we prepared water samples with differing degrees of hardness and alkalinity and obtained samples of underground and superficial waters from various rural and urban areas in the province of Buenos Aires, Argentina. After measuring its hardness

and alkalinity, we added to each water lemon juice in different concentrations and determined the resulting degree of acidity and the action of the lemon against *V. cholerae*. We simultaneously followed the same steps using artificially prepared control waters of differing hardness and alkalinity.

Our results showed that lemon juice is effective against *V. cholerae*, but that its activity is reduced in waters that are very alkaline. Therefore, treatment of subterranean drinking waters, which are the most alkaline, can destroy *V. cholerae* only when the concentration of lemon juice is at least 2% and the time of action at least 30 minutes. We recommend, however, that the alkalinity of local waters to be treated be determined before fixing the minimum concentration of lemon juice.

Corrección

Rogamos a nuestros lectores tomar nota de que en el artículo de A. Palloni et al, "Efectos de la lactancia natural y del espaciamiento de los embarazos sobre la mortalidad en la primera infancia en México", que se publicó en el *Boletín* de agosto (117(2):104) de 1994, debe hacerse la siguiente corrección:

En la columna de la derecha, línea 16, donde dice "...natural de la razón de las posibilidades...", debe decir "...natural de las posibilidades...".

Lamentamos esta corrección, que obedece a un error de edición.